

**Edice
Chemické
Lístky**



Michal JURÁŠEK a Pavel DRAŠAR,

hlavní autoři a editoři,

sborníku

ORAGANICKÉ

PŘÍRODNÍ LÁTKY

v zrcadle časopisu

CHEMICKÉ LISTY

2006-2010

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).

Vážení čtenáři, citujte prosím informace z tohoto sborníku jako původní článek v Chem. Listy, jak je uvedeno v horní části první stránky každého příspěvku, např.

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



Organické přírodní látky v zrcadle časopisu Chemické listy, 2006-2010

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

Seznam autorů jednotlivých příspěvků je uveden na str. 321.

Typografická úprava: Ing. Radmila ŘÁPKOVÁ.

Fotografie: RNDr. Zdeněk Putz CSc.

Vydání publikace bylo schváleno redakční radou časopisu Chemické listy.

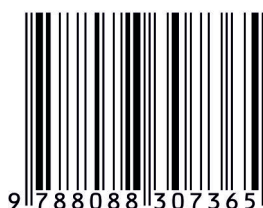
Vydala: Česká společnost chemická.

Vydání první, počet stran 321, ediční číslo 12568-2026-04.

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

ISBN elektronické verze (formát PDF) 978-80-88307-36-5

ISBN 80-88307-36-5





KVARTÉRNÍ ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY SANGUINARIN A CHELERYTHRIN. ÚČINKY IN VITRO A IN VIVO Adéla Zdařilová, Jana Malíková, Zdeněk Dvořák, Jitka Ulrichová, Vilím Šimánek	1
FYTOKANABINOIDY Zdeněk Fišar	13
BIOSYNTÉZA HMYZÍCH FEROMONŮ Anna Luxová, Irena Valterová	23
ENDOKANABINOIDY Zdeněk Fišar	37
KYSELINA SORBOVÁ A JEJÍ DERIVÁTY JAKO SUROVINY PRO PŘÍPRAVU LISTOVÝCH ALKOHOLŮ Eliška Leitmannová, Libor Červeny	46
ANTIFUNGÁLNÍ PROTEINY ROSTLIN – KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, MOŽNOSTI VYUŽITÍ Veronika Heřmanová, Jan Bárta, Vladislav Čurn	52
VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA OBSAH POLYFENOLŮ A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITU HLÍZ BRAMBOR Jaromír Lachman, Karel Hamouz, Jaroslav Čepl, Vladimír Pivec, Miloslav Šulc, Petr Dvořák	58
CUKERNÁ NESACHAROSOVÁ SLADIDLA A PŘÍBUZNÉ LÁTKY Jana Čopíková, Oldřich Lapčík, Michal Uher, Jitka Moravcová, Pavel Drašar	64
BIOLOGICKY AKTIVNÍ PYRAZINY PŘÍRODNÍHO A SYNTETICKÉHO PŮVODU Martin Doležal	70
HORMONY A LÁSKA Luboslav Stárka	78
NECUKERNÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY SLADKÉ CHUTI Oldřich Lapčík, Jana Čopíková, Michal Uher, Jitka Moravcová, Pavel Drašar	83
ANALÝZA MARKERŮ PRO CHARAKTERIZACI DESTILÁTŮ Marcela Korhoňová, Radka Hejdová, Petr Barták, Petr Bednář, Lubomír Čáp	94
PŘÍRODNÍ LÁTKY HOŘKÉ CHUTI Lubomír Opletal, Jana Čopíková, Michal Uher, Oldřich Lapčík, Jitka Moravcová, Pavel Drašar	106
LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ VNÍMÁNÍ ORGANOLEPTICKÝCH VLASTNOSTÍ Jitka Moravcová, Lubomír Opletal, Oldřich Lapčík, Jana Čopíková, Michal Uher, Pavel Drašar	118
DDAVP – 40 LET PRVÉHO SUPERAKTIVNÍHO VASOPRESINU. OBJEV A SOUČASNÝ PRAKTICKÝ VÝZNAM Milan Zaoral	127
GC-MS ANALÝZY PŘÍRODNÝCH BANÁNOVÝCH ARÓM Lukáš Gremeň, Petra Moravčíková, Peter Fodran	138
FIBRINOGEN Roman Kotlín, Jan E. Dyr	142
PLODY <i>Lonicera caerulea</i> : PERSPEKTIVNÍ FUNKČNÍ POTRAVINA A ZDROJ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK Jan Heinrich, Irena Švarcová, Kateřina Valentová	149
HUMÍNOVÉ KYSELINY. PŮVOD A ŠTRUKTÚRA Marianna Skokanová, Katarína Dercová	159
TVORBA FIBRINU A JEHO DEGRADACE Roman Kotlín, Jan E. Dyr	166

HUMÍNOVÉ KYSELINY. INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH KYSELÍN S KONTAMINANTAMI	171
Marianna Skokanová, Katarína Dercová	
VÝSKYT A VÝZNAM ENANTIOMERŮ V POTRAVINÁCH	179
Simona Srkalová, Květa Kalíková, Eva Tesařová	
VÝVOJ METODY IZOLACE KAROTENOIDNÍCH BARVIV Z KVASINEK RODU <i>Rhodotorula</i>	186
Tereza Krulikovská, Petra Patáková, Miroslav Lukčo	
KRÁSA A ROZMANITOST STRUKTUR PŘÍRODNÍCH ANTIBIOTIK	191
František Hampel, Jitka Moravcová, Jana Čopíková, Lubomír Opletal, Oldřich Lapčík, Pavel Drašar	
SOUČASNÝ POHLED NA KOENZYM Q	204
Hana Rauchová, Martina Vokurková	
CHOLESTEROL – PŘÍTEL ČI NEPŘÍTEL?	212
Hana Lubanda, Marek Vecka	
CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE	224
Eva Vavříková, Jarmila Vinšová	
ADIPOCYTOKINY – NEDÁVNO OBJEVENÉ HORMONY TUKOVÉ TKÁNĚ	234
Vojtěch Škop, Kateřina Kontrová, Jarmila Zídková, Václav Zídek	
ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V CHMELU A PIVU	240
Martin Fidler, Lenka Kolářová	
NOVÉ IDENTIFIKOVANÉ FENOLICKÉ LÁTKY V PARAZITICKÝCH ROSTLINÁCH	244
<i>Cuscuta europaea</i> A <i>Cuscuta campestris</i>	
Petra Hříbová, Milan Žemlička, Tomáš Bartl, Emil Švajdlenka	
KATIONICKÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY	254
Tereza Neubauerová, Martina Macková, Tomáš Macek, Bohumír Koutek	
OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ V BUNĚČNÉ KULTUŘE <i>Silybum marianum</i>	263
PŘÍDAVKEM ELICITORU PARAQUAT	
Lenka Tůmová, Jiří Tůma	
VYUŽITÍ CHEMICKY MODIFIKOVANÝCH HOŘKÝCH LÁTEK V PIVOVARSTVÍ	271
Marcel Karabín, Tomáš Brányik, Radim Kruliš, Markéta Dvořáková, Pavel Dostálek	
PŘÍRODNÉ LÁTKY RASTLINNÉHO PŮVODU A ICH VYUŽITÍ V TERAPII ONKOLOGICKÝCH OCHORENÍ	279
Petra Cibíková, Mária Šturdíková, Michal Maruna	
STEROIDNÍ FYTOHORMONY: FUNKCE, MECHANISMUS ÚČINKU A VÝZNAM	288
Marek Kamler, Ondřej Uhlík, Ladislav Kohout, Juraj Harmatha, Tomáš Macek	
PROTIRAKOVINOVÉ TAXÁNOVÉ PŘÍRODNÉ LÁTKY	295
Michal Maruna, Mária Šturdíková, Petra Ondřejčková	
MORFOLOGIE, CHEMICKÁ STRUKTURA, VLASTNOSTI A MOŽNOST VYUŽITÍ PŠENIČNÉHO B-ŠKROBU	305
Evžen Šárka, Zdeněk Bubník	
GEOCHEMIE FULLERENŮ	313
Otakar Frank, Jan Jehlička, Petr Vítek, Libor Juha, Věra Hamplová, Zdena Pokorná	
OBSAH	321



KVARTÉRNÍ ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY SANGUINARIN A CHELERYTHRIN.
ÚČINKY IN VITRO A IN VIVOADÉLA ZDAŘILOVÁ^a, JANA MALÍKOVÁ^b,
ZDENĚK DVOŘÁK^a, JITKA ULRICHOVÁ^a
a VILÍM ŠIMÁNEK^a^aÚstav lékařské chemie a biochemie, ^bÚstav patologie,
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3,
775 15 Olomouc
jitkaulrichova@seznam.cz

Došlo 18.11.05, přijato 12.12.05.

Klíčová slova: kvartérní benzo[c]fenanthridiny, biologická
aktivita, interakce, DNA, bílkoviny, biotransformace, bez-
pečnost, nežádoucí účinky

Obsah

1. Úvod
2. Chemické vlastnosti
3. Biologická aktivita
 - 3.1. Cytotoxicita a apoptóza
 - 3.2. Interakce s DNA a genotoxicita
 - 3.3. Interakce s bílkovinami
 - 3.4. Antimikrobiální aktivita
 - 3.5. Vliv na základní fyziologické funkce
 - 3.6. Metabolické transformace
4. Nežádoucí účinky
5. Závěr

Článek je přehledem výsledků studií o účincích sanguinarinu a chelerythrinu na metabolismus buňky a živý organismus, které byly publikovány v posledních 10 letech. Je diskutován molekulární mechanismus biologické aktivity obou alkaloidů a jsou uvedeny názory na možné směry jejich budoucího výzkumu.

1. Úvod

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA), sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE), se vyskytují v řadě druhů čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Hlavním zdrojem SA (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]fenanthridinium chloridu) a CHE (1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]fenanthridinium chloridu) jsou *Sanguinaria*

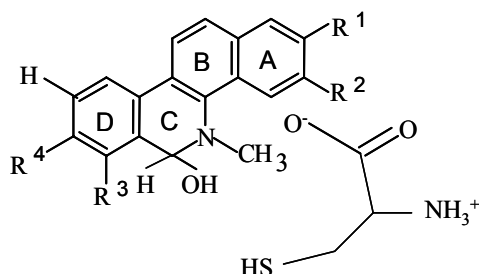
canadensis L. (krevnice kanadská), *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší) a *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., z nichž byly izolovány ve formě kvartérních solí¹. SA a CHE jsou považovány za fytoalexiny, sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy. Výchozími aminokyselinami v biosyntéze KBA jsou tyrosin a fenylalanin, důležitými meziproducty jsou protopiny, posledním mezistupněm dihydroderiváty, které jsou oxidovány benzo[c]fenanthridinoxidasou na kvartérní soli².

Sanguinarin a chelerythrin vykazují široké spektrum biologické aktivity, která závisí na zvoleném biologickém modelu, pH, iontové síle a oxidoredukčním statutu prostředí³. Mají protizánětlivý účinek srovnatelný s indomethacinem⁴ a výraznou antibakteriální aktivitu⁵. Směsi sanguinarinu a chelerythrinu, na trhu nabízené jako sanguiritrin (alkaloidový extrakt *M. cordata*) a sanguinaria (alkaloidový extrakt z rhizomů *S. canadensis*), jsou aktivními složkami přípravků ústní hygieny s prokázaným antiplakovým účinkem, resp. aditiva do krmiva hospodářských zvířat prodávaného v EU pod názvem SANGROVIT[®] (PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH, Německo). Nicméně SA, CHE a jejich dihydroderiváty jsou považovány za toxické složky oleje semen rostlin rodu *Argemone*. Po jeho požití dochází u savců k akutnímu oxidačnímu stresu a jsou postiženy všechny životně důležité orgány. U lidí je tato otrava známa jako „epidemic dropsy syndrome“ (cit.^{6,7}). S benzo[c]akridinem, jediným v literatuře uváděným metabolitem KBA u živočichů, je spojována genotoxicita SA a CHE. Oba alkaloidy jsou pro své potenciální terapeutické, ale také jim přisuzované toxické účinky, stále atraktivními pro základní a aplikované výzkum v experimentální toxikologii a farmakologii. Tento článek shrnuje dosavadní poznatky o molekulárním mechanismu působení SA a CHE na buněčné modely a některé druhy savců.

2. Chemické vlastnosti

Ve vodném prostředí jsou SA a CHE v rovnováze mezi formou kvartérního kationu a formou 6-hydroxy-5,6-dihydroderivátu (tzv. pseudobáze či alkanolaminu), dále jen 6-hydroxydihydroderivátu^{8,9}. V aprotickém prostředí se tvoří bimolekulární aminoacetyly, jejichž struktura byla určena z ¹H, ¹³C NMR spekter¹⁰ a rentgenovou strukturní analýzou¹¹. Za fyziologického pH (7,2–7,4) procházejí alkaloidy buněčnou membránou ve formě 6-hydroxydihydroderivátu, který je v cytoplasmě v rovnováze s kvartérním kationem⁴. Rychlost průniku obou alkaloidů do buňky se liší v závislosti na velikosti rovnovážné konstanty tvorby 6-hydroxydihydroderivátu¹². 6-Hydroxydihydroderiváty reagují se sloučeninami substituovanými thiolovou skupinou, např. L-cysteinem, vratnou nevazebnou

interakcí (obr. 1) (cit.^{13,14}). Ve fosfátových puffech jsou oba alkaloidy omezeně rozpustné a dochází k jejich agregaci^{15,16}. Pro stanovení sanguinarinu a chelerythrinu



6-hydroxydihydrosanguinarin $R^1+R^2 = \text{OCH}_2\text{O}$,
 $R^3+R^4 = \text{OCH}_2\text{O}$
 6-hydroxydihydrochelerythrin $R^1+R^2 = \text{OCH}_2\text{O}$,
 $R^3 = R^4 = \text{OCH}_3$

Obr. 1. Nevazebná interakce 6-hydroxydihydrosanguinarinu a 6-hydroxydihydrochelerythrinu s cysteinem¹³

Tabulka I
Cytotoxicita sanguinarinu a chelerythrinu

Typ buněk	IC ₅₀ [μM]	Alkaloid	Lit.
<i>Normální buňky</i>			
S-G gingivální epiteliální buňky	7,6	SA	19
Gingivální buňky (PGC)	9	SA	19
HGF-1 gingivální fibroblasty	10,9	SA	19
Normální lidské fibroblasty	1,6	SA	20
HaCaT lidské keratinocyty	0,3 / 2,2	SA / CHE	21,22
Lidské epidermální keratinocyty (NHEKs)	> 10	SA	23
Lidské hepatocyty	71 / > 100	SA / CHE	24
Prasečí hepatocyty	47 / 83	SA / CHE	24
Potkaní hepatocyty	25 / 50	SA / CHE	25
<i>Nádorové buňky</i>			
Lidská promyelocytická leukemie HL-60	28 / 58	SA / CHE	26
Lidská nádorová buněčná linie HeLa	2,2 / 16,2	SA / CHE	12
Nádorové KB buňky	6,4	SA	19
Nádorové prsní adenokarcinomy (MCF7)	3,3	SA	20
Prostatické adenokarcinomy (PC3)	1,1	SA	20
Buněčná linie karcinomu tračníku (DLD-1)	1,4	SA	20
Lidská plicní nádorová buněčná linie (A 549)	1,9	SA	20
Lidské melanomy (M4Beu)	1,8	SA	20
Lidské buňky karcinomu kůže (A431)	2	SA	23
Buňky děložního čípku (HPV)	1,7	SA	27
HeLa S3	0,16/1,24 (μg ml ⁻¹)	SA / CHE	28
Lidská prostatická linie LNCaP	1	SA	29
Lidská prostatická linie DU145	1	SA	29
Primární lidská uveální nádorová buněčná linie (OCM-1)	2,7 / 6,7 (μg ml ⁻¹)	SA / CHE	30
Leukemická buněčná linie (K562)	5,5	SA	31
Leukemická buněčná linie (U937)	5	SA	31

v biologickém materiálu byla v nedávné době vypracovaná validovaná HPLC/ESI-MS metoda s detekčním limitem fmol (cit.^{17,18}).

3. Biologická aktivita

3.1. Cytotoxicita a apoptóza

V tabulce I jsou uvedeny druhy buněk, na kterých byl testován toxický účinek SA a CHE (cit.^{19–31}). SA a CHE vykazovaly na všech buněčných modelech toxicitu závislou na čase a koncentraci. U řady buněk byla při toxických koncentracích alkaloidů pozorována vakuolizace. Cytotoxicita může být snížena řadou faktorů jako např. fetálním bovinním sérem v médiu, vzrůstajícím pH či přítomností exogenní potkaní S9 jaterní mikrosomální frakce¹⁹. Porovnání uváděných hodnot IC₅₀ v tab. I nemá velkou vypovídající hodnotu zejména z důvodů nejednotně prováděných experimentů (různá doba inkubace buněk s testovanými látkami, použití rozdílných metod hodnocení životnosti). Z kvalitativního srovnání je však zřejmé, že CHE vykazuje nižší toxicitu než SA a není výrazný rozdíl v účinku obou alkaloidů na normální a nádorovou buňku.

Řada prací se zabývala studiem účinku SA a CHE na indukci apoptózy u normálních a nádorových buněčných linií^{23,29,30}. Apoptóza je nejstudovanější typ programované buněčné smrti (PCD). Jako PCD je označována buněčná smrt závislá na signálech nebo řízených aktivitách uvnitř umírající buňky. Při apoptóze ztrácí buňka nejprve asymetrii fosfolipidů v membráně, dochází ke kondenzaci chromatinu, redukci velikosti jádra, štěpení internukleosomové DNA, svrštění buňky, vydouvání membrány a rozpadu buňky na apoptotická tělíska obklopená zbytky membrány. Ty jsou v konečné fázi fagocytovány bez vzniku zánětlivé reakce. Naproti tomu při nekróze dochází k ireverzibilnímu poškození buňky a nitrobuněčný obsah se vyplavuje do okolí buněk, kde navodí zánětlivou reakci a úplný rozpad buňky. Tyto uvedené dva základní typy buněčné smrti nejsou jediné, nicméně sled morfologických a biochemických změn v procesu apoptózy a nekrózy je pro ně charakteristický a v podstatě u všech typů buněk podobný. Signální dráhy vedoucí k apoptóze je možné rozdělit na dvě skupiny: (i) vnitřní dráhu, která zprostředkovává většinu proapoptických signálů, vycházejících především z mitochondrií a je řízena vzájemným působením molekul rodiny Bcl-2 a (ii) vnější dráhu, jejíž spouštěcí mechanismus se děje aktivací receptorů na plasmatické membráně buněk. Výsledkem induktivního působení obou drah je aktivace specifických proteolytických enzymů kaspas.

Indukce apoptózy vyvolaná SA byla pozorována u buněčné linie A431 odvozené od lidského karcinomu kůže²³, lidských prsních (MCF-7) (cit.²⁰) a prostatických (PC-3, DU145, LNCaP) (cit.^{20,29}) nádorových buněčných linií, buněk melanomu (M4Beu) (cit.²⁰), děložního čípku²⁷, leukemické buněčné linie (U937) a myeloidních (ML-1a) buněk³², lidské leukemické buněčné linie (K562, JM1) (cit.^{33–35}), lidských immortalizovaných keratinocytů (HaCaT) (cit.²²) a fibroblastů²⁰. Apoptotická aktivita CHE byla pozorována v primárních kulturách potkaních neonatálních ventrikulárních myocytů³⁶, u lidských neuroblastomů (SH-SY5Y), prsní nádorové buněčné linie (MCF7) a buněčné linie karcinomu tračniku (HCT116) (cit.³⁷).

Mechanismy buněčné smrti vyvolané SA studoval na buňkách děložního čípku Ding a spol.²⁷. Účinek alkaloidu byl koncentračně závislý a indukoval buněčnou smrt. SA aplikovaný v koncentracích 2–4 μM vyvolal apoptózu doprovázenou aktivací kaspasy-3, koncentrace 8–17 μM způsobily onkózu, buněčnou smrt vyznačující se otokem, vakuolizací, zpuchřováním a zvýšenou permeabilitou cytoplasmatické membrány, při které nedochází k aktivaci kaspasy-3 (cit.²⁷). Stejně účinky měly SA a CHE na primární lidskou uveální nádorovou buněčnou linii (OCM-1) (cit.³⁰). Zatímco apoptóza byla pozorována při koncentraci SA a CHE 1,0 a 1,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, buněčná smrt způsobená nekrozou byla patrná u obou alkaloidů při koncentraci 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.³⁰). Studie inhibičního účinku SA na proliferaci linií melanomových (M4Beu), prsních (MCF-7) a prostatických (PC3) buněk a normálních lidských fibroblastů ukázala, že není výrazný rozdíl mezi toxicitou alkaloidu na nádorovou a zdravou buňku ($\text{IC}_{50} = 0,9\text{--}3,3 \mu\text{M}$)

(cit.²⁰). Rychlá apoptotická reakce po aplikaci SA byla pravděpodobně vyvolána předčasným a kritickým vyčerpáním redukovaného glutathionu (GSH) reakcí alkaloidu s GSH a následnou aktivací kaspasy-3/7. Na základě těchto výsledků se autoři domnívají, že signální dráha zahrnující vyčerpání GSH s následnou indukcí apoptózy, by mohla být novým cílem v protinádorové terapii²⁰. Inkubace lidských immortalizovaných keratinocytů HaCaT se SA vedla k významnému poklesu antiapoptického proteinu Bcl-2 a nárůstu proapoptického Bax proteinu²². Bcl-2 tvoří s Bax proteinem heterodimer a tím může své proapoptické účinky neutralizovat^{38,39}. Proteiny rodiny Bcl-2 (např. Bax, Bad, Bid) mají schopnost regulovat uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytosolu⁴⁰. Chan a spol.³⁷ označili CHE za inhibitor skupiny proteinů rodiny Bcl-2. Chelerythrin inhiboval BH3 doménu peptidové vazby Bcl-X_L-Bak ($\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$) a tím způsobil uvolnění cytochromu *c* nejen z intaktních, ale i z izolovaných mitochondrií³⁷. U kultivovaných neonatálních kryších srdečních myocytů indukoval CHE buněčnou smrt doprovázenou vznikem reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) s charakteristickými znaky apoptózy, včetně buněčného svrštění, externalizace fosfatidylserinu či aktivace kaspas³⁶. Typická apoptotická smrt myocytů byla indukována v koncentračním rozmezí 6–30 μM , jež se užívá k zablokování aktivity proteinkinasy C (PKC) u srdečních myocytů. CHE vyvolal uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií, které bylo inhibováno antioxidantem *N*-acetyl-L-cysteinem. To potvrdilo, že ROS mohou zprostředkovávat uvolnění cytochromu *c* vyvolané CHE. Chelerythrin může sloužit jako modelová látka k objasnění mechanismů signalizace včetně apoptózy³⁶.

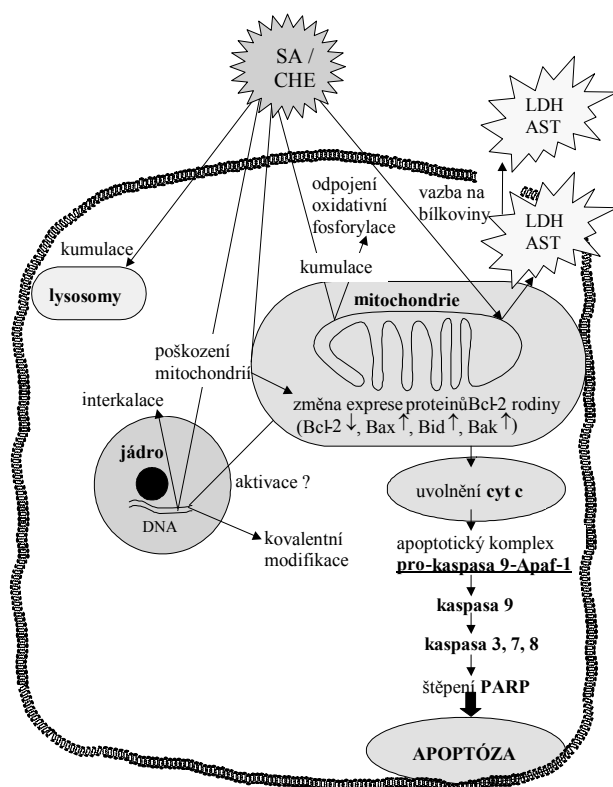
Mezi faktory ovlivňující apoptózu patří také protein NF- κB (cit.³⁵). Jedná se o jaderný transkripční faktor, který reguluje expresi cytokinů, proteinů buněčné adheze a dalších produktů genů, které se podílí na septickém šoku, ateroskleróze, zánětu, buněčné proliferaci a virové replikaci. V souvislosti s těmito poznatky byly zkoumány vztahy proteinů Bax, Bcl-2 a NF- κB uplatňující se během apoptózy indukované SA u lidských leukemických buněčných linií (K562) a (JM1) (cit.^{33–35}). Buňky K562 po aplikaci 1,5 a 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SA změnily svou morfologii na morfologii dvou různých forem buněčné smrti. U 1,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SA se projevila klasická morfologie apoptózy, 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ způsobilo buněčnou smrt podobnou onkóze s typickým zpuchřováním cytoplasmatické membrány (BCD). Nižší koncentrace SA indukovala apoptózu u buněk K562 zvýšením exprese Bax, aktivací kaspasy-3 a snížením proteinu NF- κB , zatímco vyšší koncentrace alkaloidu způsobila BCD snížením exprese Bax a zvýšením exprese proteinu NF- κB . Použití stejných koncentrací SA u buněk JM1 vyvolalo expresi Bcl-2 (cit.^{33–35}). Výsledky získané s buňkami K562 prokázaly, že protein Bax a aktivace kaspasy-3 působí proapoptoticky, zatímco aktivace NF- κB má opačný účinek. Nicméně mechanismus, kterým NF- κB inhiboval apoptózu, nebyl zcela vysvětlen³⁵. Chaturvedi a spol.³² studovali účinek SA a CHE na regulaci aktivace

Tabulka II

Interakce sanguinarinu a chelerythrinu se signálními molekulami zapojenými v apoptóze

Signální molekula	Účinek	Alkaloid	Lit.
Apaf-1	↑	SA	22
*Bak	↑	SA	22
*Bax	↑	SA	22, 33
*Bax/Bcl-2 (poměr)	↑	SA	22
*Bcl-2	↓	SA	22
*Bid	↑	SA	22
BH ₃ peptidová vazba (Bcl-X _L -Bak)	↓	CHE	37
Kaspasa-3	↑	SA / CHE	20, 22, 27, 36
Kaspasa-7	↑	SA	20, 22
Kaspasa-8	↑	SA	22
Kaspasa-9	↑	SA / CHE	22, 36
NF-κB	↓	SA	31, 32
TNF (IκBα, p65)	↓	SA	32

* Proteiny rodiny Bcl-2 patří mezi regulátory apoptózy. Tato rodina proteinů se skládá jak z inhibitorů, tak z promotorů programované buněčné smrti. U savců bylo identifikováno nejméně 15 členů rodiny, další byly identifikovány u virů. Mezi antiapoptotické proteiny patří Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-w, proapoptotické proteiny jsou Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad, Bik a Bid. Bcl-2 reguluje také aktivaci kaspasových proteas, které jsou zodpovědné za konečnou efektorovou fázi apoptózy. ↑ aktivace, ↓ inhibice



Obr. 2. Působení sanguinarinu a chelerythrinu na buněčné orgány a indukci apoptózy

NF-κB u lidské myeloidní (ML-1a) a leukemické (U937) buněčné linie a u normálních lidských fibroblastů. Buňky byly vystaveny působení tumorového nekrotizujícího faktoru α (TNF-α), který aktivoval NF-κB. Účinkem SA (5 μM) byla aktivace NF-κB zcela inhibována. SA blokoval aktivaci NF-κB indukovanou nejen TNF-α, ale také interleukinem-1, forbolmyristylacetátem a kyselinou okadaovou. Aktivaci vyvolanou peroxidem vodíku a/nebo ceramidem SA neinhiboval. Jednou z možností, jak SA brání aktivaci NF-κB, by mohla být inhibice fosforylace a degradace IκBα inhibiční podjednotky NF-κB. CHE neměl na buňky ovlivněné TNF-α srovnatelný účinek³². SA blokoval vazbu aktivovaného NF-κB do promotorové oblasti DNA (cit.^{31,32}). SA a CHE překvapivě vyvolávaly v HeLa buňkách rychlou a intenzivní jadernou translokaci heterodimeru p50/p65 (aktivní forma NF-κB) (cit.⁴¹). Nicméně NF-κB nebyl i přes svou přítomnost v jádře transkripčně aktivní. Tato pozorování jsou z hlediska mechanismu účinku podobná výsledkům Duvoix a spol.³¹, ale pouze částečně shodná s výsledky Chaturvediho a spol.³². V práci⁴¹ byl pozorovaný jev vysvětlen současnou indukcí jaderné translokace glukokortikoidního receptoru působením SA a CHE. Homodimer GR/GR interaguje s p50/p65 a výsledným stavem jsou transkripčně neaktivní GR i NF-κB. V souvislosti s ovlivněním aktivace NF-κB byla zjištěna schopnost SA inhibovat Na⁺/K⁺-ATPasu^{42,43}. Bylo prokázáno, že ouabain, inhibitor Na⁺/K⁺-ATPasy, nemá žádný účinek na aktivaci faktoru NF-κB vyvolanou TNF-α. Tedy SA neinhibuje aktivaci NF-κB cestou blokace ATPasy (cit.³²).

Výsledky těchto studií dostatečně prokázaly, že oba

alkaloidy indukují apoptotické faktory (tab. II). Úplné objasnění mechanismu jejich vlivu na apoptózu by mohlo přispět k potenciálnímu terapeutickému použití těchto látek. Účinky SA a CHE na buňku jsou schématicky znázorněny na obr. 2.

3.2. Interakce s DNA a genotoxicita

Mezi možné cíle SA a CHE v buňce patří jaderná a mitochondriální DNA. *In vitro* oba alkaloidy interkalují do DNA (souborně v cit.⁴⁴). SA a CHE patří do skupiny hydrofobních kationů, které se v průběhu aktivace membrány hromadí na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány, kde neutralizují negativní náboj a dochází k odpojení oxidativní fosforylace. Analýza ¹H-NMR potvrdila, že SA se interkaluje do DNA izolované z telecího brzlíku⁴⁵. Termodynamická charakterizace interakce SA s DNA vyhodnocená kombinací dat z absorpčních a fluorescenčních spekter ukázala, že vazba SA s DNA je závislá na iontové síle, základním složení roztoku a sekvenci párů nukleotidů⁴⁶. Interakce SA s DNA, homo- a heteropolymery AT byla charakterizována negativní změnou entalpie a pozitivní změnou entropie, zatímco vazba s homo- a heteropolymery GC byla vyjádřena negativní změnou entropie a entalpie. Das a spol.⁴⁷ studovali interakci SA s B-, Z-, a H^L-formami DNA pomocí cirkulárního dichroismu a spektrofotometricky. Dřívější studie uvádějí, že SA ve formě kvartérního kationtu se váže na B-formu DNA interkalací, přednostně na sekvence bohaté na GC (cit.⁴⁶), zatímco 6-hydroxydihydroderivát se na DNA neváže^{48,49}. SA neinteraguje s formami Z- a H^L-DNA, ale mění je na B-formu. Studie^{47,50} potvrdily, že v molekule DNA při interakci SA s GC sekvencemi dochází ke konformačním změnám. Metodou kapilární zónové elektroforézy bylo prokázáno, že za fyziologického pH nedochází ke kovalentní vazbě SA a CHE na DNA a individuální nukleotidy. Jejich vzájemná interakce je založena na vzniku nevazebných komplexů pomocí slabé intermolekulární síly⁵¹. Kombinací spektrofotometrické, spektrofotometrické a viskozimetrické metody byla studována interakce SA s RNA (cit.⁵²). Alkaloid se vázal na A- a protonizovanou formu RNA a jejich vzájemná interakce byla exotermickým procesem; vazba SA na protonizovanou formu byla pevnější.

Genotoxicita látky vylučuje její použití jako aktivní složky v humánních, resp. veterinárních přípravcích. U SA a CHE nebyl dosud možný genotoxický účinek věrohodně vyhodnocen. Studie *in vitro* neprokázaly genotoxicitu KBA (cit.^{53–55}), zatímco výsledky ze studií *in vivo* jsou rozporuplné^{56–60}. Genotoxicita KBA byla testována na lidských lymfocytech a lidské hepatomové linii HepG2 pomocí mikrojaderného testu v cytokinetickém bloku, a to v přítomnosti a/nebo nepřítomnosti exogenní S9 frakce z potkaních jater. SA nezpůsobil indukcii aktivity jaderek ani v lidských lymfocytech, ani v buňkách HepG2 (cit.⁵⁴). SA nevykazoval genotoxicitu při použití SOS chromotestu (zkouška genotoxicity upraveným laboratorním protokolem *Escherichiae coli* PQ37) v přítomnosti a/nebo

nepřítomnosti exogenní S9 frakce z potkaních jater⁵³. Výsledky byly porovnávány s Amesovým testem, který rovněž byl negativní. Metodou „³²P-postlabeling“ byly nalezeny modifikované nukleotidy po inkubaci DNA se SA a CHE v přítomnosti mikrosomální frakce z potkaních jater indukované β-naftoflavonem⁵⁵. Tento výsledek nevyloučil, ale ani nepotvrdil genotoxicitu obou alkaloidů. U myši, kterým byl intraperitoneálně podán SA v dávce 10 mg kg⁻¹, bylo zjištěno poškození chromosomů v buněk kostní dřevě⁵⁶. Intraperitoneální podání alkaloidu myším v dávkách 5,4 a 10,8 mg kg⁻¹ vedlo k poškození DNA v buňkách kostní dřevě a v leukocytech⁵⁷. Topická aplikace 6 mg ml⁻¹ SA na kůži u myši způsobila poškození DNA buněk epidermu prokázané metodou „Comet assay“ (cit.⁵⁸). V pokusech prováděných na prasatech⁵⁹ a potkanech⁶⁰, kdy v krmivu byla podávána denní dávka směsi SA a CHE (6:2) 10 mg kg⁻¹ po dobu 90, resp. 109 dnů, nebylo metodou „³²P-postlabeling“ nalezeno žádné poškození jaterní DNA. Stejně výsledky byly získány u potkanů, kde byl účinek na DNA hepatocytů navíc hodnocen metodou „Comet assay“ a stanovením 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu jako parametru oxidačního poškození DNA. Rozdílné výsledky v experimentech *in vivo* je možné vysvětlit pouze způsobem aplikace KBA. Poškození DNA nalezené po intraperitoneálním podání KBA nelze vztáhnout na účinek alkaloidů aplikovaných externě. Při podání stejné dávky KBA *per os* jsou reálné hladiny alkaloidů ve vnitřním prostředí nesrovnatelně nižší a rozdílná je také jejich metabolisace.

3.3. Interakce s bílkovinami

Biologická aktivita KBA byla vždy spojována s jejich inhibičním účinkem na fyziologicky důležité enzymy. Mechanismem vysvětlujícím inhibici enzymů je adice nukleofilních skupin bílkoviny na iminiovou vazbu kvartérní formy SA, resp. CHE. Inhibici lze potlačit přidáním GSH, dithiothreitolu (DTT) či jiné protektivní SH-látky. V tabulce III jsou uvedeny pouze ty enzymy, pro které byla změřena buď IC₅₀ nebo hodnota K_i se SA/CHE. V dalším textu jsou zmíněny studie, u kterých byl inhibiční účinek alkaloidu prokázán pouze kvalitativně. SA a CHE inhibovaly prasečí pankreatickou a lidskou slinnou alfa-amylasu⁶¹. SA inhiboval enzymovou aktivitu kinasy, která fosforyluje specifický protein –44 kDa přítomný v mitochondriální frakci potkaního srdce⁶². Inhibiční účinky SA a CHE byly testovány také na membránových proteasách, které neobsahují skupinu SH, aminopeptidase N a dipeptidylpeptidase IV. Tyto enzymy se účastní procesu buněčné aktivace a diferenciaci^{63,64}. Modelem byly C6 potkaní nádorové buněčné linie. Za zvolených experimentálních podmínek byly alkaloidy přítomny ve formě 6-hydroxydihydroderivátů, které jsou formou tvořící nevazebné komplexy s bílkovinami¹³. SA a CHE inhibovaly aktivitu obou enzymů. Hovězí albumin při pH 7,4 snižoval jejich inhibiční účinek.

Vliv SA na svalové bílkoviny byl rovněž studován na

Tabulka III

Inhibice enzymů sanguinarinem a chelerythrinem

Enzymy	IC ₅₀ (K _i) [μM]	Alkaloid	Lit.
Acetylcholinesterasa	10,9 ^a ; 35,0 ^b ; 81 ^c ; 10 ^d ; >160 ^e / 9,4 ^b (1,5 ^a); >160 ^e	SA / CHE	65–69
Acetylcholintransferasa	0,28 ^o	SA	65
Alaninaminotransferasa	3,4 ^f / 4,0 ^f	SA / CHE	70
Aminooxidasa I, II	(600) ^g / (900) ^g	SA / CHE	71
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	6,0–6,5 ^h	SA	72
Butyrylcholinesterasa	17,4 ⁱ ; 24,0 ^e / 14 ^e	SA / CH	65,73
Cytochrom P450 1A2	(2) ^{j,k}	SA	74
Dekarboxylasa L-aromatických aminokyselin	(120) ^l / 580 ^l	SA / CHE	75
Diaminooxidasa	5,0 ^e	SA	76
Elastasa	16 ^m ; 6,2 ⁿ	SA	77
Glutamátdekarboxylasa	(70) ^b	SA	78
5-Lipoxigenasa	0,4 ^p / 0,8 ^p	SA / CHE	79
12-Lipoxigenasa	13 ^r / 33 ^r	SA / CHE	79
MKP-1	10	SA	80
Monoaminoxidasa	24,5 ^s	SA	81
Myosin „light chain“ kinasa	158 ^t	SA	82
NADPH-oxidasa	8,3 ^u	SA	83
NADPH:cytochrom P450-reduktasa	21,8 ^k	SA	83
Proteinkinasa C	217 ^b ; 16 ^f / 25 ^f	SA / CHE	82,84
Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa	41 ^v	SA	82
Cyklická AMP-dependentní proteinkinasa	6,0 ^f	SA	82

^a *Electrophorus electricus*, ^b potkaní mozek, ^c lidský erytrocyt, ^d čistý enzym, ^e lidská plasma, ^f potkaní játra, ^g *Aspergillus niger*, ^h srdeční sval morčete, ⁱ koňské sérum, ^j lidský rekombinantní, ^k lidské jaterní mikrosomy, ^l myši fibroblasty, ^m slinivka břišní, ⁿ lidský hlen, ^o telecí mozek, ^p telecí neutrofil, ^r myši keratinocyt, ^s myši mozek, ^t ptačí předžaludek, ^u postgranulární frakce diferencovaných HL-60, ^v pšeničný klíček

třech izolovaných tkáních hlodavců – aortě, bránici a myokardu. SA uvolňoval hladké svalstvo izolované aorty potkana po kontrakci iniciované fenylefrinem (PE) (cit.⁸⁵). Účinek SA lze vysvětlit inhibicí tvorby inositol-1,4,5-trifosfátu a influxu iontů Ca²⁺. SA inhiboval kontrakci v rozmezí 0,3–10 μM. Kontrakce aorty indukovaná ionty K⁺ byla pozorována až při koncentracích SA 10–100 μM. Inhibiční účinek SA byl potlačen DTT, pravděpodobně ochranou skupin SH na klíčových molekulách regulujících svalovou kontrakci. Na rozdíl od hladkého svalu, SA pozitivně ovlivňoval kontraktilitu příčně pruhovaného svalu bránice izolované z myši, pravděpodobně v důsledku přímého působení na Ca²⁺ kanál sarkoplasmatického retikula (SR). SA indukované uvolnění Ca²⁺ ze SR bylo blokováno působením rutheniové červeně a DTT (cit.⁸⁶). Pozitivně inotropní účinek SA byl zaznamenán na srdečním svaly izolovaném z potkana⁸⁷. SA indukovaná kontrakce byla potlačena preinkubací myokardu s La³⁺ nebo Ca²⁺ ionty. V kultuře kardiomyocytů SA zvyšoval influx Ca²⁺, který byl inhibován preinkubací s La³⁺ ionty. SA indukovaný influx Ca²⁺ iontů nebyl inhibován preinkubací s blokátory Ca²⁺ kanálu amiloridem, diltiazemem, nifedipinem, verapamilem, manganem a niklem. Kontraktilní účinek SA je pravděpodobně spojen s influxem Ca²⁺ iontů přes La³⁺

senzitivní iontové kanály. Intoxikace organismu SA by mohla vyvolat infarkt myokardu⁸⁷.

SA, resp. CHE byly testovány jako ligandy na několika membránových receptorech. Hodnoty jejich IC₅₀ jsou uvedeny v tabulce IV. Vazba SA na angiotensinový AT₁ receptor (K_i = 1,29 μM) (cit.⁸⁸) je možným vysvětlením, proč je v lidovém léčitelství používán k léčbě vysokého krevního tlaku extrakt z kořenů *Bocconia frutescens* L. (cit.^{89,90}). Interakce SA s tímto receptorem je však ireverzibilní a nekompetitivní⁹¹.

Biologická aktivita SA by mohla mít spojitost se signálními drahami aryluhlovodíkového receptoru (AhR) a s podrodinou CYP1A cytochromu P450. První úvaha, že účinek SA *in vivo* by mohl být ovlivněn AhR nebo CYP1A enzymy, vycházela z pozorování, že toxicita SA u myši byla výrazně snížena po premedikaci experimentálních zvířat induktorem CYP1A enzymu 3-methylcholanthrenem⁹². Podobný účinek byl popsán *in vitro* (cit.⁷⁴). Cytotoxicita SA v primárních kulturách potkaních hepatocytů a v lidské hepatomové linii HepG2 byla snížena preinkubací s induktory CYP1A, TCDD, 3-methylcholanthrenem a β-naftoflavonem⁷⁴. Po inkubaci SA s potkaními jaterními mikrosomy, které byly izolovány ze zvířat vystavených účinku CYP1A induktorů, byla zazna-

Tabulka IV

In vitro interakce sanguinarinu a chelerythrinu s receptory

Receptor	IC ₅₀ (K _i) [μM]	Alkaloid	Lit.
Angiotensin II-AT ₁	1,90 (1,29) / 9,93 (6,76)	SA / CHE	88
Angiotensin II-AT ₁	4,37 (0,14)	SA	91
Vasopresin V ₁	7	SA	98
α ₁ -Adrenoreceptor	33,6	SA	65
α ₂ -Adrenoreceptor	6,4	SA	65
Nikotinový Ach	11,8	SA	65
Muskarinový	2,4	SA	65
Serotoninový 5-HT ₂	91,7	SA	65

menána produkce reaktivních species, tvořících DNA adukty⁵⁵. Toxicita SA *in vivo/in vitro* může být modulována AhR-závislou CYP1A inducibilní expresí. Bylo popsáno, že SA aktivuje signální a metabolické dráhy závislé na receptoru AhR v lidských keratinocytech⁹³. Autoři popisují indukci AhR-závislé exprese CYP1A a dalších genů účinkem SA. Věrohodnost výsledků publikovaných v této práci byla však zpochybněna⁹⁴. Jiní autoři naopak pozorovali, že SA a CHE neovlivňují aktivitu AhR a exprese CYP1A1 genu^{95,96}. Nicméně oba alkaloidy inhibovaly katalytickou aktivitu CYP1A1 (cit.^{93,95}). V obou studiích byly použity subtoxické koncentrace alkaloidů 0,25 a 0,5 μM, resp. 0,01; 0,1; a 1 μM. Pro koncentrace nad 4 μM se již začínal projevovat inhibiční účinek SA a CHE na proteinkinasu C (PKC). Jelikož funkce PKC je nezbytná pro aktivaci AhR, byl účinek SA a CHE ve vyšších koncentracích na buněčné kultury logicky příčinou inhibice dioxin-závislé aktivity AhR (cit.⁹⁷). Účinná inhibiční koncentrace vs. vlastní cytotoxicita SA a CHE je častým předmětem sporů.

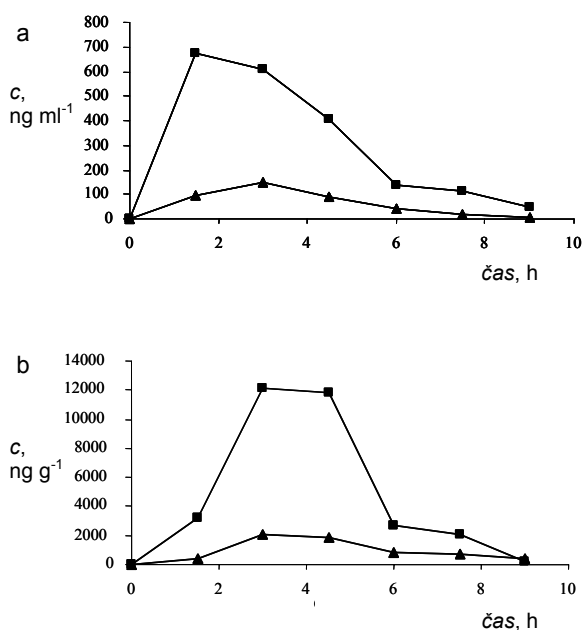
3.4. Antimikrobiální aktivita

V rostlinách mají SA a CHE funkci fytoalexinů. Spektrum jejich antimikrobiální aktivity je činné výjimečnými mezi sekundárními metabolity. Rostliny čeledi Rutaceae byly využívány v rovníkové Africe v ústní hygieně (čisticí dřívka) (cit.^{1,5,99}). Již dříve byla popsána jejich bakteriostatická a baktericidní aktivita vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím^{100–102}, plísním¹⁰³ a kvasinkám¹⁰⁴. Z nedávné doby jsou studie o jejich inhibičních účincích na několik druhů *Mycobacterium*¹⁰⁵, *Helicobacter pylori*¹⁰⁶ a *Trypanosoma brucei*¹⁰⁷.

Zajímavým zjištěním byla inhibiční aktivita dihydro-SA/dihydroCHE vůči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans*, srovnatelná s gentamicinem¹⁰⁸. Možným vysvětlením je vyšší lipofilita redukované formy kvartérního kationu, což umožňuje jeho penetraci přes mikrobiální stěnu a následně může docházet ke zpětné konverzi dihydroderivátu na kvartérní formu. Podobně je vysvětlována větší antimikrobiální účinnost SA vs CHE ve vztahu k hodnotě rovnovážné konstanty tvorby 6-hydroxydihydroderivátů.

3.5. Vliv na základní fyziologické funkce

Široké spektrum účinků SA a CHE popisované v experimentech na buněčných modelech nemůže dát odpověď na působení těchto látek na celý organismus. Je zajímavé, že přes mnohaleté používání extraktů obsahujících KBA v alternativní medicíně a přípravech ústní hygieny bylo publikováno pouze několik studií na zvířatech, které hodnotí vliv SA a CHE na základní fyziologické funkce. Jednotlivé studie^{59,60,92,109} se liší způsobem podání zkoušených látek. Williams a spol.⁹² testovali u myši vliv 3-methylcholanthrenu (3-MC) na poškození jater vyvolané intraperitoneálně aplikovaným SA v jednorázové dávce 10 mg kg⁻¹. Po podání SA došlo u zvířat k výraznému snížení hladiny GSH v krvi, aktivity cytochromu P450, aminopyrin-*N*-demethylasy a alaninhydroxylasy, zatímco aktivity sorbitoldehydrogenasy (SDH) a alaninamino-transferasy (ALT) se zvýšily. Intraperitoneálně podaná dávka SA (20 mg kg⁻¹) myším, premedikovaným 3-MC, nevyvolala pokles hladiny GSH a nevedla ke snížení aktivity cytochromu P450 a aminopyrin-*N*-demethylasy. 3-MC neměl ochranný účinek na alaninhydroxylasy, ale došlo ke snížení sérové SDH a ALT. Velmi problematické výsledky publikoval v roce 1992 Tandon a spol.¹⁰⁹. Po jednorázovém podání SA žaludeční sondou v dávce 10 mg kg⁻¹ potkanům a morčatům bylo sledováno jeho vylučování močí a výkaly po dobu 96 h a stanoven v trávicím traktu a různých orgánech zvířat. V moči a výkalech nebyla přítomnost alkaloidu prokázána po 72 h a jako jediný metabolit byl identifikován benzo[c]akridin. SA byl nalezen ve všech orgánech potkanů a morčat s výjimkou sleziny a varlat. V práci Kosiny a spol.⁵⁹ byla prasatům podávána v krmivu směs SA a CHE (6:2) v denní dávce 5 mg kg⁻¹. Po 90 dnech nebyly nalezeny žádné změny u základních parametrů klinické biochemie a prokázáno genotoxické poškození jaterní DNA. Celkový zdravotní stav experimentální skupiny byl shodný s kontrolní skupinou, morfologické vyšetření tkání byla negativní, z celkového množství stanovených alkaloidů se 98 % vylučovalo výkaly. Ve stejném vedeném experimentu na potkanech (směs SA a CHE v denní dávce 10 mg kg⁻¹ po dobu 109 dnů) byly



Obr. 3. Metabolismus sanguinarinu v plasmě a játrech potkana po jednorázové aplikaci *per os* 10 mg kg⁻¹ (cit.¹¹¹); ▲ SA, ■ DHSA

získány obdobné výsledky⁶⁰. V hepatocytech nebyly nalezeny žádné adukty nukleotidů ani poškození jaderné a mitochondriální DNA. Výsledky obou experimentů nasvědčují tomu, že dlouhodobé podávání KBA nemá toxický účinek na organismus savců.

3.6. Metabolické transformace

Benzo[c]akridin se od roku 1961 v literatuře uvádí jako jediný metabolit SA u savců¹¹⁰. Tato potenciálně karcinogenní látka je považována za příčinu oxidačního stresu vyvolaného po požití oleje ze semen *A. mexicana* u lidí a hospodářských zvířat⁴³. Že se může jednat o artefakt, bylo již poukázáno⁹⁴. V nedávné době byla studována metabolická přeměna SA u potkanů^{17,111}. Zvířatům byl podán jednorázově SA sondou v dávce 10 mg kg⁻¹ a stanovena v 30 min intervalech jeho hladina v plasmě a játrech. Vedle SA byl vždy přítomen DHSA, a to ve větším množství než výchozí látka (obr. 3), v moči nebyly obě látky nalezeny. V žádném vzorku nebyla prokázána přítomnost benzo[c]akridinu. Psotová a spol.¹⁷ předpokládají, že tvorba DHSA je prvním krokem detoxikace SA v organismu a jeho pozdější eliminace ve formě polárních konjugátů. K redukci SA na DHSA dochází již v trávicím traktu především mikrobiálními reduktasami. Po absorpci obou alkaloidů je SA dále redukován nespecifickými cytosolickými a mikrosomálními reduktasami¹⁷. Experiment s [³H]-SA potvrdil distribuci alkaloidu do všech orgánů potkana

a rovněž, že cca 98 % orálně podávaného SA je vylučováno výkaly¹¹¹.

4. Nežádoucí účinky

Antimikrobiálních a protizánětlivých účinků SA a CHE je využíváno v přípravcích ústní hygieny. V posledních 5 letech je diskutována bezpečnost při dlouhodobém používání těchto přípravků. KBA byly označeny jako příčina vzniku prekancerózních lézí na sliznici dutiny ústní^{112–115}. Vzhledem k určité podobnosti těchto alkaloidů se známými karcinogeny – polycyklickými aromatickými uhlovodíky by se na možných nežádoucích účincích mohla podílet buď metabolická aktivace, přímá interakce nebo indukovatelnost některé z izoform cytochromu P450, nejpravděpodobněji s CYP1A1 a 1B1 (cit.⁹³). Naproti tomu existují *in vivo* studie mutagenicity, genotoxicity a onkogenetické studie, které tyto nežádoucí účinky nepotvrdily. Rovněž v dlouhodobém experimentu Munro a spol.¹¹⁶ nebyl potvrzen toxický vliv SA na sliznici požráku prasete. Výsledky z *in vitro* studií a *in vivo* experimentů neprokazují ani jednoznačně nevyvratitelný vztah mezi SA a vznikem leukoplakie. SA v koncentraci 100 a 300 nM inhiboval syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a zvyšoval aktivitu peroxidasy, katalasy a superoxiddismutasy u granulocitních buněk prasete, což může negativně ovlivňovat jeho reprodukční schopnosti¹¹⁷.

5. Závěr

Existuje několik důvodů, proč sanguinarin a chelerythrin zůstanou i v blízké budoucnosti předmětem zájmu farmaceutických chemiků a farmakologů. Jejich farmakodynamické účinky jsou pravděpodobně komplexním účinkem všech tří forem, které jsou ve vnitřním prostředí v dynamické rovnováze (schéma 1). Prvním problémem, který musí být objasněn, je tvorba a struktura metabolitů u savců a ověření jejich biologické aktivity. Již nyní je prokázáno, že metabolická transformace SA a CHE začíná v trávicím traktu. Metabolitem SA, který se vylučuje močí, není benzo[c]akridin, jak je dosud v literatuře citováno. Znalost metabolických přeměn SA a CHE také přispěje k vysvětlení, co je toxickou látkou/látkami v oleji semen rostlin rodu *Argemone*. Zůstává nezodpovězeno, jakým způsobem KBA reagují s jadernou a/nebo mitochondriální DNA, a které struktury v buňce jsou pro tyto alkaloidy cílové. Odpověď na tuto otázku objasní, zda i velmi nízké koncentrace SA a CHE v organismu mohou mít toxické účinky. Kumulace alkaloidů v tkáních by byla možným vysvětlením pro experimentálně neprokázanou transformaci gingiválních fibroblastů, vedoucí k dysplasii epitelu sliznice dutiny ústní. Pro výrazné změny fluorescence KBA v závislosti na koncentraci vodíkových iontů a jejich rozdílné afinity k buněčným strukturám mohou být SA a CHE použity jako sondy v některých metodách molekuly

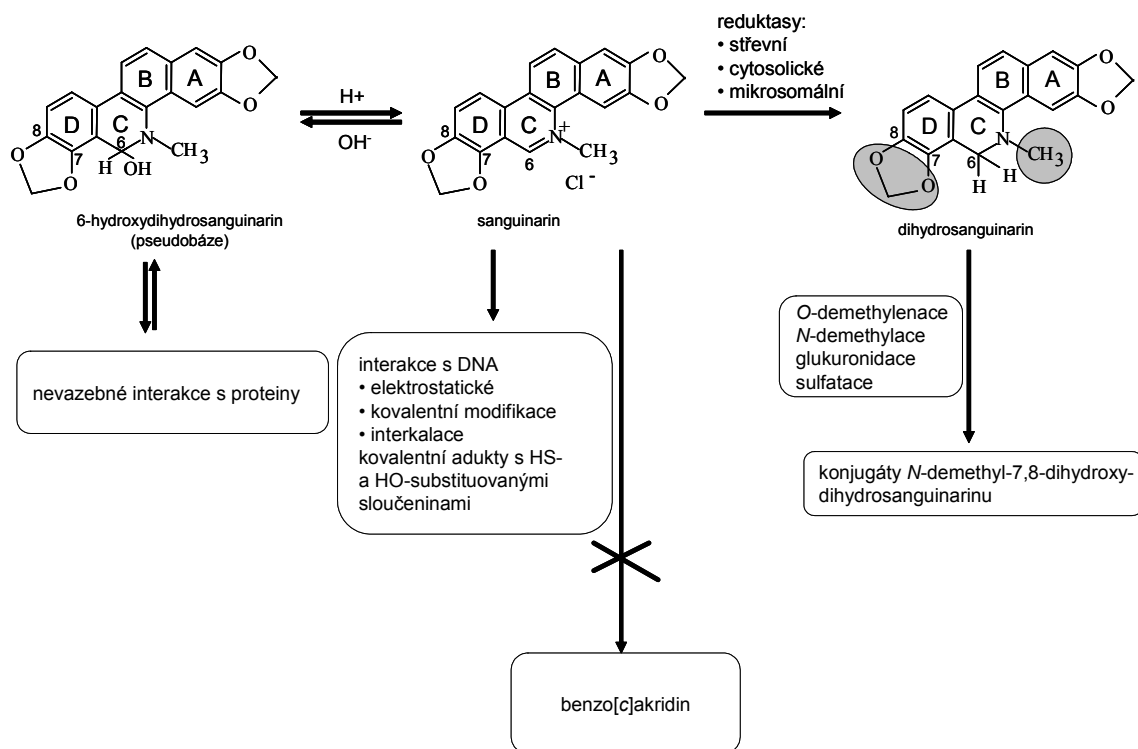


Schéma 1. **Transformace sanguinarinu u živočichů;** Rovnováha mezi sanguinarinem a jeho 6-hydroxydihydroderivátem závisí na pH a prostředí buňky. Střevní, cytosolické a mikrosomální reduktasy přeměňují sanguinarin na dihydrosanguinarin, který je transformován na polární konjugáty a vylučován močí (cit.³)

lární biologie. Oba alkaloidy jsou také, vedle jejich současného využití v kosmetických a veterinárních fytopřípravcích, stále zajímavé pro farmaceutický průmysl pro svou potenciální cytostatickou účinnost.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (6198959216) a je věnována Jaroslavu Vičarovi k jeho životnímu jubileu.

Seznam symbolů a zkratk

AhR	aryluhlovodíkový receptor
ALT	alaninaminotransferasa
Apaf-1	faktor aktivující apoptotické proteasy 1
AST	aspartátaminotransferasa
BCD	buněčná smrt podobná onkóze s typickým zpuchřováním cytoplasmatické membrány (b lister c ell d eath)
CYP	cytochrom P450
GSH	redukovaný glutathion
DTT	dithiothreitol
GR/GR	glukokortikoidní receptor – homodimer
CHE	chelerythrin
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50%-ní inhibici

IκBα	enzymu inhibiční podjednotka jaderného faktoru kappa B (NF-κB)
Kaspasa-3,7,9	specifické proteasy (cystein-dependent asp artate-specific proteases)
KBA	kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
LDH	laktátdehydrogenasa
MKP-1	mitogeny aktivovaná proteinkinasa-fosfatasa
3-MC	3-methylcholanthren
NF-κB	jaderný faktor kappa B
PCD	programovaná buněčná smrt (p rogramme c ell d eath)
PE	fenylefrin
PKC	proteinkinasa C
p50/p65	podjednotky jaderného faktoru kappa B (NF-κB)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (r eactive o xygen s pecies)
SA	sanguinarin
SDH	sorbitoldehydrogenasa
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TNF-α	tumrový nekrotizující faktor

LITERATURA

- Šimánek V., v knize: *The Alkaloids* (Brossi A., ed.), 26, str. 185. Academic Press, Orlando 1985.
- Cline S. D., McHale R. J., Coscia C. J.: *J. Nat. Prod.* 56, 1219 (1993).
- Ulrichová J.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. (Supplement)* 149, 9 (2005).
- Lenfeld J., Kroutil M., Maršálek E., Slavík J., Preininger V., Šimánek V.: *Planta Med.* 43, 161 (1981).
- Vavrečková C., Ulrichová J.: *Chem. Listy* 88, 238 (1994).
- Šimánek V., Vespalec R., Šedo A., Ulrichová J., Vičar J., v knize: *Chemical Probes in Biology* (M. P. Schneider, ed.) NATO Science Series, II. Mathematics, Physics and Chemistry 129, str. 245. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2003.
- Šimánek V., Zdařilová A., Ulrichová J.: *Ann. Pol. Chem. Soc.* 3, 613 (2004).
- Dostál J., Slavík J.: *Chem. Listy* 94, 15 (2000).
- Dostál J., Slavík J., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.) 27, str. 155. Elsevier, Amsterdam 2002.
- Dostál J., Bochořáková H., Táborská E., Slavík J., Potáček M., Buděšínský M., de Hoffmann E.: *J. Nat. Prod.* 59, 599 (1996).
- Toušek J., Dommissie R., Dostál J., Žák Z., Pieters L., Marek R.: *J. Mol. Struct.* 613, 103 (2002).
- Slaninová I., Táborská E., Bochořáková H., Slanina J.: *Cell Biol. Toxicol.* 17, 51 (2001).
- Barták P., Šimánek V., Vlčková M., Ulrichová J., Vespalec R.: *J. Phys. Org. Chem.* 16, 803 (2003).
- Vespalec R., Barták P., Šimánek V., Vlčková M.: *J. Chromatogr., B* 797, 357 (2003).
- Vespalec R., Vlčková M., Kubáň V.: *Electrophoresis* 26, 3265 (2005).
- Vespalec R., Vlčková M., Horáková H.: *J. Chromatogr., A* 1051, 75 (2004).
- Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr., B* 830, 165 (2006).
- Zdařilová A.: *Disertační práce*. Univerzita Palackého, Olomouc 2006.
- Babich H., Zuckerbraun H. L., Barber I. B., Babich S. B., Borenfreund E.: *Pharmacol. Toxicol.* 78, 397 (1996).
- Debiton E., Madelmont J. C., Legault J., Barthomeuf C.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 74 (2003).
- Vavrečková C., Gawlik I., Müller K.: *Planta Med.* 62, 491 (1996).
- Adhami V. M., Aziz M. H., Mukhtar H., Ahmad N.: *Clin. Cancer Res.* 9, 3176 (2003).
- Ahmad N., Gupta S., Husain M. M., Heiskanen K. M., Mukhtar H.: *Clin. Cancer Res.* 6, 1524 (2000).
- Ulrichová J., Dvořák Z., Vičar J., Lata J., Smržová J., Šedo A., Šimánek V.: *Toxicol. Lett.* 125, 125 (2001).
- Ulrichová J., Walterová D., Vavrečková C., Kamarád V., Šimánek V.: *Phytother. Res.* 10, 220 (1996).
- Satou T., Akao N., Matsushashi R., Koike K., Fujita K., Nikaido T.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1651 (2002).
- Ding Z., Tang S. C., Weerasinghe P., Yang X., Pater A., Liepins A.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 1415 (2002).
- Nakanishi T., Suzuki M., Saimoto A., Kabasawa T.: *J. Nat. Prod.* 62, 864 (1999).
- Adhami V. M., Aziz M. H., Reagan-Shaw S. R., Nihal M., Mukhtar H., Ahmad N.: *Mol. Cancer. Ther.* 8, 933 (2004).
- Kemény-Beke A., Aradi J., Damjanovich J., Beck Z., Facskó A., Berta A., Bodnár A.: *Cancer Lett.*, v tisku.
- Duvoix A., Delhalle S., Blasius R., Schnekenburger A., Morceau F., Fougère M., Henry E., Galteau M. M., Dicato M., Diederich M.: *Biochem. Pharmacol.* 68, 1101 (2004).
- Chaturvedi M. M., Kumar A., Darnay B. G., Chainy G. B., Agarwal S., Agarwal B. B.: *J. Biol. Chem.* 272, 30129 (1997).
- Weerasinghe P., Hallock S., Tang S. C., Liepins A.: *Cell Biol. Toxicol.* 17, 371 (2001).
- Weerasinghe P., Hallock S., Tang S. C., Liepins A.: *Pathol. Res. Pract.* 197, 717 (2001).
- Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A.: *Exp. Mol. Pathol.* 71, 89 (2001).
- Yamamoto S., Seta K., Morisco C., Vatner S. F., Sadoshima J.: *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1829 (2001).
- Chan S. L., Lee M. C., Tan K. O., Yang L. K., Lee A. S. Y., Flotow H., Fu N. Y., Butler M. S., Soejarto D. D., Buss A. D., Yu V. C.: *J. Biol. Chem.* 278, 20453 (2003).
- Chinnaiyan A. M., Orth K., O'Rourke K., Duan H., Poirier G. G., Dixit V. M.: *J. Biol. Chem.* 271, 4573 (1996).
- Srivastava M., Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H.: *J. Biol. Chem.* 276, 15481 (2001).
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269 (1999).
- Dvořák Z., Vrzal R., Maurel P., Ulrichová J.: *Chem. Biol. Interact.*, v tisku.
- Bobis G. S.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 363, 203 (2001).
- Das M., Khanna S. K.: *Crit. Rev. Toxicol.* 27, 273 (1997).
- Faddeeva M. D., Beliaeva T. N.: *Tsitologiya* 39, 181 (1997).
- Saran A., Srivastava S., Coutinho E., Maiti M.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* 32, 74 (1995).
- Sen A., Ray A., Maiti M.: *Biophys. Chem.* 59, 155 (1996).
- Das S., Kumar G. S., Maiti M.: *Biophys. Chem.* 76, 199 (1999).
- Sen A., Maiti M.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2097 (1994).
- Maiti M., Das S., Sen A., Das A., Kumar G. S., Nandi R. J.: *Biomol. Struct. Dyn.* 20, 455 (2002).
- Maiti M.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* 38, 20 (2001).
- Vlčková M., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V.: *Electrophoresis* 26, 1673 (2005).

52. Das S., Banerjee A., Sen A., Maiti M.: *Res. Com.* 79, 82 (2000).
53. Kevekordes S., Mersch-Sundermann V., Burghaus C. M., Spielberger J., Schmeiser H. H., Arlt V. M., Dunkelberg H.: *Mutat. Res.* 445, 81 (1999).
54. Kevekordes S., Spielberger J., Burghaus C. M., Birkenkamp P., Zietz B., Paufler P., Diez M., Bolten C., Dunkelberg H.: *Anticancer Res.* 21, 461 (2001).
55. Stiborová M., Šimánek V., Frei E., Hobza P., Ulrichová J.: *Chem. Biol. Interact.* 140, 231 (2002).
56. Das A., Mukherjee A., Chakrabarti J.: *Mutat. Res.* 563, 81 (2004).
57. Ansari K. M., Dhawan A., Khanna S. K., Das M.: *Food. Chem. Toxicol.* 43, 147 (2005).
58. Das M., Ansari K. M., Dhawan A., Shukla Y., Khanna S. K.: *Int. J. Cancer.* 117, 709 (2005).
59. Kosina P., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rýdlová H., Vičar J., Krečman V., Brabec M. J., Šimánek V.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 85 (2004).
60. Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzebacherová E., Kosina P., Svobodová A., Hrbáč J., Jirovský D., Stiborová M., Lichnovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Food. Chem. Toxicol.*, odesláno.
61. Zajoncová L., Kosina P., Vičar J., Ulrichová J., Peč J.: *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20, 261 (2005).
62. Lombardini J. B., Props C.: *Biochem. Pharmacol.* 51, 151 (1996).
63. Šedo A., Vlašicová K., Barták P., Vespalec R., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Phytother. Res.* 15, 1 (2001).
64. Šedo A., Malík R., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Physiol. Res.* 52, 367 (2003).
65. Schmeller T., Latz-Brüning B., Wink M.: *Phytochemistry* 44, 257 (1997).
66. Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek V.: *Planta Med.* 48, 111 (1983).
67. Kuznetsova L. P., Nikol'skaia E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: *Tsitologiya* 43, 1046 (2001).
68. Kuznetsova L. P., Nikol'skaya E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: *J. Evol. Biochem. Physiol.* 38, 35 (2002).
69. Ulrichová J., Kovář J., Šimánek V.: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 50, 978 (1985).
70. Walterová D., Ulrichová J., Preininger V., Šimánek V., Lenfeld J., Lasovský J.: *J. Med. Chem.* 24, 1100 (1981).
71. Luhová L., Frébort I., Ulrichová J., Adachi O., Šimánek V., Peč P.: *J. Enzyme Inhibition* 9, 295 (1995).
72. Seifen E., Adams R. J., Riemer R. K.: *Eur. J. Pharmacol.* 60, 373 (1979).
73. Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: *Planta Med.* 48, 174 (1983).
74. Vrba J., Kosina P., Ulrichová J., Modrianský M.: *Toxicol. Lett.* 151, 375 (2004).
75. Dršata J., Ulrichová J., Walterová D.: *J. Enzyme Inhibition* 10, 231 (1996).
76. Vaidya A. B., Rajagopalan T. G., Kale A. G., Leuine R. J.: *J. Postgr. Med.* 26, 28 (1980).
77. Tanaka T., Matori K., Mineo S., Hirotsu M., Furuya T., Kobayashi S.: *Planta Med.* 59, 200 (1993).
78. Netopilová M., Dršata J., Ulrichová J.: *Pharmazie* 51, 589 (1996).
79. Vavrečková C., Gawlik I., Müller K.: *Planta Med.* 62, 397 (1996).
80. Vogt A., Tamewitz A., Skoko J., Sikorski R. P., Giuliano K. A., Lazo J. S.: *J. Biol. Chem.* 280, 19078 (2005).
81. Lee S. S., Kai M., Lee M. K.: *Phytother. Res.* 15, 167 (2001).
82. Wang B. H., Lu Z. X., Polya G. M.: *Planta Med.* 63, 494 (1997).
83. Vrba J., Hrbáč J., Ulrichová J., Modrianský M.: *Chem. Biol. Interact.* 147, 35 (2004).
84. Psotová J., Ducher L., Ulrichová J., Walterová D.: *Chem. Papers* 90, 613 (1996).
85. Hu C. M., Cheng H. W., Cheng Y. W., Kang J. J.: *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 47 (2001).
86. Hu C. M., Cheng H. W., Cheng Y. W., Kang J. J.: *Br. J. Pharmacol.* 130, 299 (2000).
87. Hu C. M., Cheng Y. W., Liao J. W., Cheng H. W., Kang J. J.: *J. Biomed. Sci.* 12, 399 (2005).
88. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Apers S., Heuvel H. V., Solis P. N., Gupta M. P., Claeys M., Pieters L., Vauquelin G., Vlietinck A. J.: *Planta Med.* 68, 770 (2002).
89. Matsusaka T., Ichikawa I.: *Annu. Rev. Physiol.* 59, 395 (1997).
90. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Solis P. N., Pieters L., Shahat A. A., Gupta M. P., Vauquelin G., Vlietinck A. J.: *Phytomedicine* 8, 59 (2001).
91. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Solis P. N., Gupta M. P., Pieters L., Vauquelin G., Vlietinck A.: *Eur. J. Pharmacol.* 458, 257 (2003).
92. Williams M. K., Dalvi S., Dalvi R. R.: *Vet. Hum. Toxicol.* 42, 196 (2000).
93. Karp J. M., Rodrigo K. A., Pei P., Pavlick M. D., Andersen J. D., McTigue D. J., Fields H. W., Mallery S. R.: *Toxicol. Lett.* 158, 50–60 (2005).
94. Dvořák Z., Modrianský M., Šimánek V., Ulrichová J., Vičar J., Vrba J., Walterová D.: *Toxicol. Lett.* 158, 164 (2005).
95. Zdařilová A., Vrzal R., Rypka M., Ulrichová J., Dvořák Z.: *Food. Chem. Toxicol.* 44, 242 (2006).
96. Dvořák Z., Sovadinová I., Bláha L., Giesy J. P., Ulrichová J.: *Food. Chem. Toxicol.*, odesláno.
97. Long W. P., Pray-Grant M., Tsai J. C., Perdew G. H.: *Mol. Pharmacol.* 53, 691 (1998).
98. Granger I., Serradeil-le Gal C., Augereau J. M., Gleye J.: *Planta Med.* 58, 35 (1992).
99. Walterová D., Ulrichová J., Válka I., Vičar J., Vavrečková C., Táborská E., Harkrader R. J., Meyer D. L., Černá H., Šimánek V.: *Acta Univ. Palacký Olomouc, Fac. Med.* 139, 7 (1995).
100. Odebiyi O. O., Sofovora E. A.: *Planta Med.* 36, 204

- (1979).
101. Vichkanova A. A., Rubinchik M. A., Adgina V. V., Fedorchenko T. S.: *Farmakol. Toksikol.* 32, 325 (1969).
 102. Dzin J. L., Socransky S. S.: *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27, 663 (1985).
 103. Hejtmánková N., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: *Fitoterapia* 15, 291 (1984).
 104. Vichkanova S. A., Adgina V. V.: *Microbiol. Zh.* 52, 53 (1990).
 105. Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G. S., Wright C. W.: *J. Ethnopharmacol.* 79, 57 (2002).
 106. Mahady G. B., Pendland S. L., Stoia A., Chadwick L. R.: *Phytother. Res.* 17, 217 (2003).
 107. Merschjohann K., Sporer F., Steverding D., Wink M.: *Planta Med.* 67, 623 (2001).
 108. Navarro V., Delgado G.: *J. Ethnopharmacol.* 66, 223 (1999).
 109. Tandon S., Das M., Khanna K.: *Drug Metab. Dispos.* 21, 194 (1993).
 110. Hakim S. A. E., Mijović V., Walker J.: *Nature* 189, 201 (1961).
 111. Večeřa R., Klejdus B., Kosina P., Orolin J., Stiborová M., Smrček S., Vičar J., Ulrichová J., Kubáň V., Anzenbacher P., Šimánek V.: *Drug. Metab. Dispos.*, odesláno.
 112. Damm D. D., Curran A., White D. K., Drummond J. F.: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 87, 61 (1999).
 113. Eversole L. R., Eversole G. M., Kopcik J.: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 89, 455 (2000).
 114. Anderson K. M., Stoner G. D., Fields H. W., Chacon G. E., Dohar A. L., Gregg B. R., Mallery S. R.: *Oral Oncol.* 41, 200 (2005).
 115. Hong S. J., Jeong S. S., Song K. B.: *Int. Dent. J.* 55, 128 (2005).
 116. Munro I. C., Delzell E. S., Nestmann E. R., Lynch B. S.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30, 182 (1999).
 117. Bianco F., Basini G., Grasselli F.: *Reprod. Toxicol.*, v tisku.

A. Zdařilová^a, J. Malíková^b, Z. Dvořák^a, J. Ulrichová^a, and V. Šimánek^a (^a*Institute of Medicinal Chemistry and Biochemistry*, ^b*Institute of Pathology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Quaternary Isoquinoline Alkaloids Sanguinarine and Chelerythrine. *In vitro* and *in vivo* Effects**

Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids (QBA) sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE) are found within the families Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae and Rutaceae. These alkaloids originate from aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine. Important intermediates in their biosynthesis are protopines; its last step is the oxidation of dihydro-QBA to QBA with benzo[c]phenanthridine oxidase. The strong antimicrobial activity of QBA suggests their function as plant defense secondary metabolites or phytoalexins. If these alkaloids are administered to living organisms such as insects, fish, and mammalian species, they can be absorbed, distributed, retained and/or metabolized as quaternary ammonium compounds, 6-hydroxy dihydro derivatives (pseudobases) and/or dihydro derivatives. In blood and organs, the equilibrium between these forms depends mainly on pH, ionic strength and oxidative capacity of the medium. Their resulting mode of action reflects the sum of reactions of all three chemical structures with cellular components. The formation of dihydro-QBA might be the first step of their detoxication in organism and their subsequent elimination. Benzo[c]acridine is not a metabolite of QBA in mammals. This review presents the resulting biological effects of QBA on cells and animals.

FYTOKANABINOIDY

ZDENĚK FIŠAR

Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 11, 120 00 Praha 2
zfisar@lf1.cuni.cz

Došlo 6.4.05, přijato 12.11.05.

Klíčová slova: kanabinoidy, marihuana, kanabinoidní receptory

Obsah

1. Úvod
2. Definice pojmů
3. Historie
4. Botanika
5. Chemické složky konopí
6. Účinky kanabinoidů
7. Farmakokinetika
8. Mechanismy působení
9. Akutní účinky kanabinoidů na CNS
10. Chronické účinky kanabinoidů na CNS
11. Potenciální terapeutické účinky
12. Závěry

1. Úvod

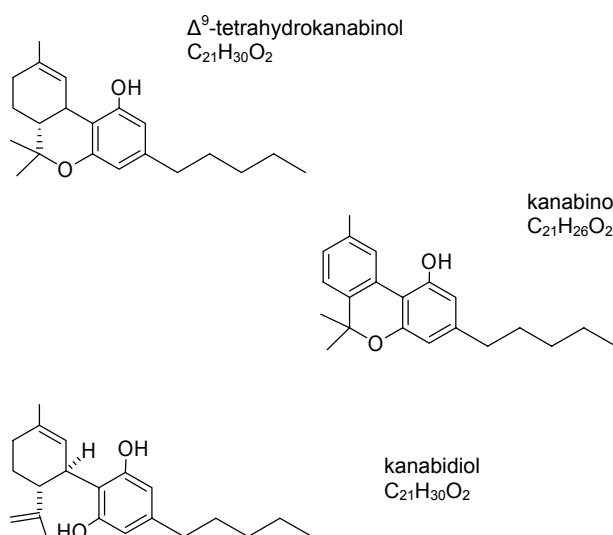
Konopné drogy jsou nejrozšířenější nelegální psychoaktivní drogy. Užívají se obvykle inhalačně nebo perorálně ve formě marihuany, hašiše nebo hašišového oleje. Ačkoli jsou jejich účinky studovány již velmi dlouho, výraznější pokrok v poznání molekulárních mechanismů jejich působení byl možný až po průkazu existence kanabinoidních receptorů v roce 1988 a po objevení endogenního metabolitu s afinitou ke kanabinoidnímu receptoru v roce 1992. Hlavní psychoaktivní složkou konopné pryskyřice je Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC), ale konopí obsahuje desítky různých kanabinoidů, z nichž některé vykazují podobné účinky jako Δ^9 -THC. Farmakokinetika Δ^9 -THC je silně ovlivněna jeho lipofilními vlastnostmi a tedy akumulací v tukových tkáních.

Akutní účinky konopných drog na psychické, psychomotorické a fyziologické funkce jsou dobře známy, méně spolehlivých údajů je zatím o vlivu jejich chronického užívání. Δ^9 -THC je agonistou kanabinoidních receptorů CB_1 i CB_2 , které jsou spojeny s G proteiny – negativně k adenylátcyklase a napětově řízeným kalciovým kaná-

lům, pozitivně k mitogenem aktivované proteinkinase a k uvolňování draslíku. Za psychotropní účinky kanabinoidů je odpovědná aktivace receptorů CB_1 v mozku. Výsledné působení kanabinoidů na přenos nervového signálu je především inhibiční. V současné době se diskutují jak negativní účinky Δ^9 -THC, tak možnost lékařského využití kanabinoidů a jejich analogů.

2. Definice pojmů

Termínem „kanabinoidy“ se rozumí typická třída sloučenin vyskytující se v konopí setém (přírodní fytokanabinoidy), v širším smyslu potom všechny látky, které jsou specificky rozpoznány kanabinoidním systémem. Endogenní aktivátory kanabinoidních receptorů se označují jako endokanabinoidy. Tetrahydrokanabinolem (THC) se obvykle rozumí izomer Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC, dříve Δ^1 -3,4-trans-tetrahydrokanabinol). Chemicky se jedná o (6aR, 10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ($C_{21}H_{30}O_2$, MW 314,47) (obr. 1). Latinský botanický název konopí setého je *Cannabis sativa*. Marihuana (bhanga, dagga, kif) je hovorově označení sušených listů a malých stonků (obsahujících 1 až 3 % Δ^9 -THC), případně i květů této rostliny (obsahujících 3–20 % Δ^9 -THC). Hašiš (charas) je arabské (indické) označení pro pryskyřici z této rostliny (obsahující 5–20 % Δ^9 -THC). Neoppylené horní květy samičích rostlin bohaté na pryskyřici jsou po usušení a sliso-



Obr. 1. Přírodní fytokanabinoidy: psychoaktivní Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC), slabě psychoaktivní cannabinal a nep psychoaktivní cannabidiol

vání známy jako ganja (4–8 % Δ^9 -THC). Hašišový olej je alkoholový extrakt z konopné pryskyřice (obsahuje 20 až 60 % Δ^9 -THC).

3. Historie

Konopí patří mezi nejstarší víceúčelové ekonomické rostliny a bylo pěstováno pro vlákna, jedlá semena nebo psychoaktivní látky (konopnou pryskyřici)¹. Pochází pravděpodobně ze střední Asie a bylo pěstováno nejprve v Číně a poté v Indii. Nejstarší zprávy o medicínském využití konopí pocházejí z Číny (lékařský text Shen Nung Pen-ts'ao Ching z doby legendárního císaře Shen Nunga, 2737 let př.n.l.) a Indie (Atharva Věda, 2000–1400 př.n.l.), ale také z Egypta, Sýrie, Persie a Tibetu. Staří Řekové a Římané využívali konopí především jako zdroj vláken, ale také jako víceúčelový lék. Mnoho arabských doktorů (např. Avicenna) popsalo lékařské využití konopí. Ve středověké Evropě se konopí pěstovalo pro svá výživná semena, ale je zmiňováno i v lékařských knihách. Koncem 19. století došlo k určitému vyvrcholení ve výzkumu a lékařském využívání konopných produktů, které nabízela řada významných společností pro léčbu bolesti, sívavého kašle, záduchy a jako uspávací či uklidňující prostředek.

20. století přineslo řadu chemicky orientovaných studií o účinných látkách v konopí. Nicméně do poloviny 20. století popularita konopných produktů v medicíně zcela uhasla a moderní výzkum musí teprve prokázat, do jaké míry lze kanabinoidy indikovat pro určité pacienty a za jakých podmínek. Je zajímavé, že antibiotické a analgetické účinky konopí potvrdila již koncem 50. let řada studií provedených v tehdejší Československu (Kabelík, Krejčí, Horák, Šantavý). Čeští vědci se významně podíleli na vědeckém výzkumu konopí i v pozdějších letech; úplný přehled těchto prací publikoval nedávno Hanuš². V druhé polovině 60. let byla společnost relativně tolerantní k užívání konopných drog pro rekreační účely a řada farmakologických společností se pokoušela vyvinout deriváty THC, které by měly terapeutické účinky bez účinků psychoaktivních. To se nepodařilo a postupně se sociální a politická stanoviska k užívání kanabinoidů stala konzervativnější s postihem prodejců a uživatelů.

Proces pro extrakci farmakologicky účinných látek z konopí byl patentován již roku 1914, ale izolace jednotlivých čistých složek z této směsi vyžadovala vývoj nových chemických technik. V první polovině 20. století byla provedena nejprve úspěšná izolace a určení chemické struktury kanabinolu (slabě psychoaktivní složka) a později kanabidiolu (nep psychoaktivní složka s jinými farmakologickými účinky) (obr. 1). Syntézou a testováním různých derivátů těchto sloučenin bylo potvrzeno, že za psychotropní aktivitu konopné pryskyřice jsou odpovědný především tetrahydrokanabinoly a byly činy pokusy o jejich izolaci. Teprve v 60. letech však bylo prokázáno, že hlavní psychoaktivní složkou v pryskyřici z konopí je Δ^9 -THC (obr. 1); přesná chemická struktura Δ^9 -THC byla určena roku

1964 (cit.³) a úplná syntéza Δ^9 -THC (přesněji směsi jeho (–) a (+)-optických izomerů) byla publikována roku 1965 (cit.⁴). Z hlediska výzkumu mechanismů účinků kanabinoidů byl významný průkaz existence kanabinoidních receptorů v centrálním nervovém systému (CNS) roku 1988 (cit.⁵) a objev prvních endogenních kanabinoidů, nejprve anandamidu⁶, poté 2-arachidonoyl-glycerolu (2-AG)⁷ a dalších.

V polovině 90. let minulého století se pozornost opět vrátila k možnému lékařskému využití kanabinoidů. Příčinou byly výsledky řady studií, které ukázaly, že kouření marihuany často umožňuje pacientům vyrovnat se lépe s bolestí a nauzeou při léčbě rakoviny, a že dochází ke snížení nitroočního tlaku u pacientů s glaukomem. Protože se farmaceutickým firmám stále nepodařilo vyvinout účinné deriváty THC bez psychotropních účinků, některé státy povolily lékařské využití kanabinoidů, což ale vedlo k obavám o možném zneužití této péče ze strany rekreačních uživatelů marihuany. Je známo, že v Holandsku je marihuana dostupná pro osobní použití již více než 20 let. Holandský přístup přijaly další země jako Kanada, Švýcarsko, Dánsko, Řecko a Španělsko. Některé státy USA schválily lékařské využití marihuany, avšak nedošlo k plné realizaci tohoto záměru díky nesmiřitelnému postoji federální vlády k legalizaci této drogy. V současné době je ve většině západních států marihuana zařazena mezi nezákonné drogy bez lékařského využití.

4. Botanika

Konopí seté (*Cannabis sativa*) je jednoroká rostlina, roste ze semen na otevřených slunných místech a dosahuje až 5 metrů výšky v průběhu 4- až 6-ti měsíčního růstu. Existují však i poddruhy dosahující výšky pouze kolem 1 metru (*Cannabis indica*). Výkvět je indukován zkracujícími se dny po slunovratu. V pokojových podmínkách dozrává za optimálních světelných a tepelných podmínek již po 2 měsících. Normálně je konopí dvoudomá rostlina; anatomicky nelze rozpoznat samčí a samičí rostliny před začátkem květu. Samčí květy visí ve volných shlucích podél relativně bezlistých vztyčených větví, oproti tomu samičí květy tvoří husté shluky při bázi každého listu podél větve. Psychoaktivní Δ^9 -THC se vyskytuje ve většině částí rostliny, ale nejkoncentrovanější je v drobných kapičkách lepkavé pryskyřice produkované žlázkami u základny jemných chloupků, které pokrývají listy samičích i samičích rostlin a zvláště listeny samičích květů⁸. Konopná pryskyřice se získává setřením z květů nebo mnutím sušených květů a listů přes řadu sít, kdy jsou získány vysušené částice pryskyřice; po slisování s pojídlem (např. tukem) do denzní masy je získán žlutý až tmavě hnědý hašiš. Od 70. let minulého století se pěstuje rovněž marihuana *sinsemilla* (marihuana bez semen), tj. ponechávají se růst jen neoplozené samičí rostliny, které vytvářejí více květů. Především v Holandsku a v Kalifornii byla vyprodukována řada odrůd konopí, které se liší obsahem Δ^9 -THC.

Velká samičí rostlina vyprodukuje po opylení více než kilogram semen. Jádra konopných semen obsahují

esenciální mastné kyseliny a snadno stravitelné proteiny a jsou vhodná jako lidská i zvířecí potrava. Semena obsahují pouze nepatrné množství Δ^9 -THC a jejich požívání proto nemá nevhodné účinky. Konopný olej z těchto semen obsahuje n-6 (kyselina linolová) a n-3 (kyselina α -linolenová) nenasycené mastné kyseliny v poměru vhodném pro správnou výživu a mimo jiné obsahuje i relativně vysoké koncentrace vitamínu E (antioxidantu).

5. Chemické složky konopí

Konopí obsahuje alespoň 483 chemických složek, z nichž 66 jsou kanabinoidy. Byly identifikovány různé podtřídy kanabinoidů⁹:

- typu kanabigerolu (CBG),
- typu kanabichromenu (CBC),
- typu kanabidiolu (CBD),
- typu Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC),
- typu Δ^8 -tetrahydrokanabinolu (Δ^8 -THC),
- typu kanabinolu (CBN) a kanabinodiolu,
- jiné kanabinoidy.

Δ^9 -THC a CBD jsou hlavní složky marihuany s rozdílnými farmakologickými profily: Δ^9 -THC aktivuje kanabinoidní receptory typu 1 (CB₁) a typu 2 (CB₂), zatímco CBD nikoli. Poměr Δ^9 -THC k CBD se liší v rostlinách pěstovaných venku v tropických oblastech (10:1 i vyšší) a v severnějších zemích (až 1:2). Velikost

účinků marihuany je vztažena k obsahu Δ^9 -THC. Farmakologické působení Δ^9 -THC je stereoselektivní; přírodně se vyskytuje pouze (–)-izomer, který je biologicky mnohem aktivnější než jeho zrcadlový (+)-izomer. CBN je velmi slabě psychotropní a CBD, CBG a CBC jsou nepsychotropní kanabinoidy. Konopí obsahuje také různá množství derivátů Δ^9 -THC nesoucích karboxylovou skupinu, jejichž význam spočívá ve skutečnosti, že po zahřátí (při kouření nebo vaření) přecházejí na aktivní formu THC. Naopak při skladování konopné pryskyřice může docházet k oxidaci Δ^9 -THC na neaktivní složky.

6. Účinky kanabinoidů

Účinky kanabinoidů na psychiku, vědomí a psychomotorické funkce mohou být rozdílné podle zkušenosti uživatele a podle jeho stavu v době požití drogy¹⁰ (tabulka I). Rovněž některé fyziologické účinky (např. vliv na krevní tlak) mohou být odlišné u zkušených a nezkušených uživatelů marihuany. Zvýšení klidového pulzu až o 60 %, ke kterému dochází v první půlhodině po vykouření marihuanové cigarety, může být nebezpečné pro osoby se srdeční chorobou. Účinky THC na kardiovaskulární systém jsou tedy dosti výrazné a jsou zprostředkovány hlavně receptory CB₁ v krevních cévách a v srdci. Rovněž snížení nitroočního tlaku vlivem kanabinoidů je pravděpodobně umožněno existencí receptorů CB₁ v oku.

Bylo zjištěno, že kanabinoidy mění funkci řady buněk

Tabulka I

Pozorované a předpokládané účinky konopných drog¹⁰

Účinky konopných drog

Psychika a vnímání: euforie, zvýšená pohoda, únava, dysforie, úzkost, snížení úzkosti, depersonalizace, zvýšené senzorické vnímání, zvýrazněné sexuální zážitky, halucinace, změna vnímání času, psychotické stavy

Vědomí a psychomotorický výkon: fragmentované myšlení, zvýšená tvořivost, narušená paměť, vratká chůze, porucha koordinace pohybů, splývavá řeč, zhoršování nebo zlepšování pohybové koordinace

Nervový systém: analgezie, svalová relaxace, stimulace chuti k jídlu, zvracení, antiemetické účinky, neuroprotektivní účinky při ischemii a hypoxii

Tělesná teplota: snížení tělesné teploty

Kardiovaskulární systém: tachykardie, zvýšená potřeba kyslíku, vasodilatace, ortostatická nebo posturální hypotenze (snížená schopnost upravit krevní tlak při změně polohy), hypertenze (u nezkušených uživatelů), inhibice agregace trombocytů

Oči: zarudlé oči (v důsledku dilatace cév ve spojivkách), snížený tok slz, snížení nitroočního tlaku

Respirační systém: bronchodilatace, hyposalivace, sucho v ústech

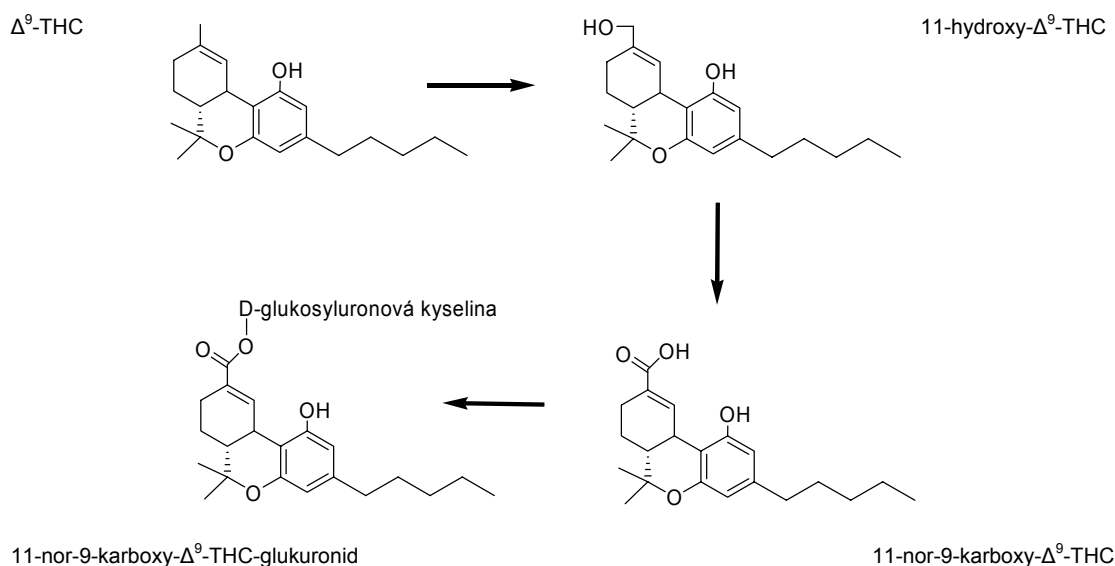
Genetický materiál a rakovina: protinádorová aktivita, inhibice syntézy DNA, RNA a proteinů

Gastrointestinální trakt: snížený pohyb střev a zpožděné vyprazdňování žaludku

Hormonální systém: vliv na luteinizační hormon, folikulostimulační hormon, testosteron, prolaktin, somatotropin, thyreostimulační hormon, glukosový metabolismus; snížený počet a pohyblivost spermií, narušený menstruační cyklus a potlačená ovulace

Imunitní systém: narušená buněčná a humorální imunita, protizánětlivé a stimulační účinky

Vývoj plodu: malformace, růstová retardace, narušený fetální a postnatální vývoj mozku, narušené kognitivní funkce

Obr. 2. Metabolismus Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC)

imunitního systému. Zpráva Světové zdravotnické organizace z roku 1997 však uvádí, že většina těchto změn je relativně malých, zcela reverzibilních po odstranění kanabinoidů, a vznikajících pouze při koncentracích vyšších než jsou ty, které jsou potřebné pro psychoaktivitu THC (více než $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ *in vitro* nebo více než 5 mg kg^{-1} *in vivo*)¹¹.

Farmakologicky a toxikologicky nejvýznamnější složkou konopí je Δ^9 -THC. Působení nízkých dávek Δ^9 -THC je charakterizováno směsí depresivních a stimulačních účinků na CNS. Podobně jako u řady jiných psychofarmak jsou dobře známy akutní účinky Δ^9 -THC, ale o jeho dlouhodobých účincích je méně prokázaných poznatků. Rovněž neurochemické procesy vedoucí k narušení kognitivních funkcí u kuřáků marihuany nejsou dostatečně známy. Nejvýraznější psychologické účinky THC ze rozdělit do 4 skupin:

- afektivní (euforie, veselost),
- senzorické (zvýšené vnímání vnějších podnětů a vlastního těla),
- somatické (pocit plovoucího těla nebo klesání v posteli),
- kognitivní (narušení vnímání času, selhání paměti, potíže s koncentrací).

7. Farmakokinetika

V závislosti na způsobu požití existují výrazné rozdíly v resorpci a metabolismu THC a v jeho průvodních projevech. Kouření je zvláště účinný způsob, jak dostat Δ^9 -THC do mozku. Po inhalaci je Δ^9 -THC rychle resorbováno do krevního toku a distribuováno¹². Do tělního oběhu se do-

stane 15–50 % Δ^9 -THC z marihuánové cigarety, přičemž ztráty zkušených kuřáků jsou až poloviční oproti kuřákům náhodným. Při kouření marihuany jsou subjektivní pocity vnímány již během vteřin až minut, dosahují maxima po 30 min a trvají 2 až 3 h (slabší účinky i déle), po orálním požití se účinky dostavují až po 0,5–2 hodinách, jsou stálejší a trvají 5 až 8 hodin (při vyšších dávkách i déle). Intravenózní aplikace THC je obtížná vzhledem k jeho nerozpustnosti ve vodě. Při ústním podání je resorpce THC lepší, pokud je současně požíván nějaký tuk. Psychotropní práh je při vdechování $0,03$ – $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, při perorálním požití (s lipofilním nosičem) $0,2$ – $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ a při intravenózním podání $0,01$ – $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ (cit.¹³).

THC a jeho metabolity rychle prostupují do tkání; vzhledem k vysoké rozpustnosti THC v tucích dochází k jeho hromadění především v tělním tuku. Zdánlivý distribuční objem THC je kolem 10 l kg^{-1} . V plazmě je většina THC vázána k lipoproteinům, albuminu a erytrocytům, volná frakce činí pouze cca 3 %. Pomalé uvolňování THC z tukových tkání do krve nevede normálně ke koncentracím způsobujícím psychologické účinky. Při pravidelném užívání marihuany dochází k výraznější akumulaci THC v tukových tkáních, což může mít škodlivé následky a snad by tak mohl být vysvětlen náhodný opětovný výskyt („flashback“) subjektivní nálady odpovídající požití drogy („high“), aniž by k jejímu požití došlo.

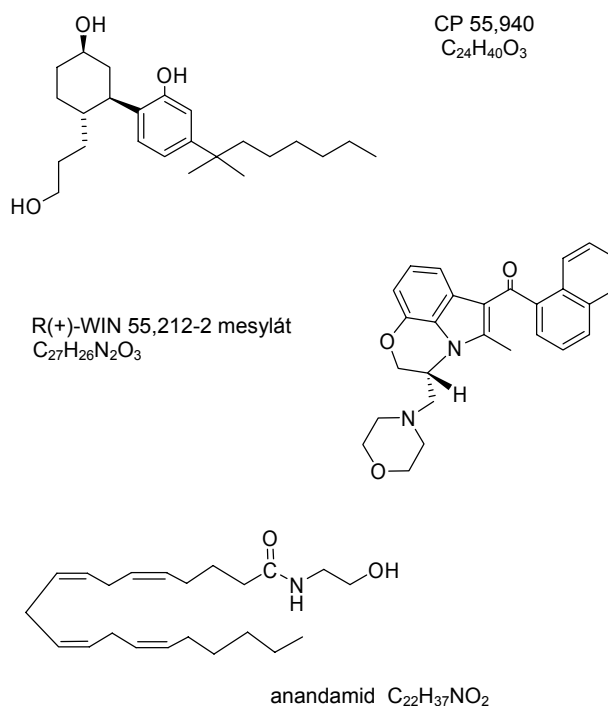
Prvotní metabolismus Δ^9 -THC nastává v plicích nebo játrech, kdy je hlavním aktivním metabolitem 11-hydroxy- Δ^9 -THC (11-OH-THC); účinný metabolismus v játrech dále mění 11-OH-THC na nepсихоaktivní 11-nor-9-karboxy- Δ^9 -THC (THC-COOH) a další metabolity (obr. 2). Plazmatické hladiny Δ^9 -THC se při kouření marihuany zvyšují velmi rychle a dosahují maxima (obvykle

desítky ng ml^{-1}) ještě před koncem kouření a poté rychle klesají díky distribuci do vysoce vaskulárních tkání (eliminační fáze α), po níž následuje pomalejší distribuce do tukové tkáně (eliminační fáze β). Clearance je 760 až 1200 ml min^{-1} , konečný plazmatický eliminační poločas se udává 1–4 dny. Úplná eliminace jedné dávky Δ^9 -THC může trvat až 5 týdnů, ale metabolity THC v moči chronických kuřáků marihuany byly nalezeny i po 80 dnech po poslední dávce. Hlavním metabolitem v moči je 11-nor-9-karboxy- Δ^9 -THC-glukuronid (THC-COOHglu) (cit.^{14,15}).

8. Mechanismy působení

Vzhledem k lipofilním vlastnostem kanabinoidů se zpočátku předpokládalo, že kanabinoidy působí přes narušení uspořádání lipidové části buněčných membrán^{16,17}. Ačkoli tento mechanismus působení nemůže být zcela vyloučen, je hlavním kandidátem pro zprostředkování centrálních účinků kanabinoidů receptorový mechanismus^{18,19}. Kanabinoidní signální systém byl pozorován u savců, ryb i bezobratlých²⁰. Δ^9 -THC je agonistou CB_1 a CB_2 kanabinoidních receptorů. Oba tyto receptorové typy jsou spojeny s G proteiny, negativně k adenylátcyklase a pozitivně k mitogenem aktivované proteinkinase. Maximální inhibice adenylátcyklasy, a tedy tvorby cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), je dosaženo již při koncentraci Δ^9 -THC kolem $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.²¹). cAMP je významný druhý posel, který přenáší signál o aktivaci různých neurotransmiterových receptorů a podílí se na regulaci buněčných funkcí přes aktivaci proteinkinasy typu A. Δ^9 -THC je parciálním agonistou receptorů CB_1 , neboť není schopen vyvolat plnou aktivaci receptoru, jako je tomu syntetických kanabinoidů CP 55, 940 nebo WIN 55, 212-2 (obr. 3). Navíc jsou receptory CB_1 spojeny přes $\text{G}_{i/o}$ proteiny s iontovými kanály, negativně s N-typem a P/Q-typem kalciových kanálů a pozitivně s různými typy draslíkových kanálů²². Inhibicí kalciových kanálů lze vysvětlit kanabinoidy vyvolané snížení uvolňování neurotransmiterů, jako je glutamát, kyselina γ -aminomáselná (GABA), acetylcholin, noradrenalin a dalších, z presynaptických zakončení.

Receptory CB_1 se nacházejí především v CNS, ale také v míše a periferním nervovém systému. Jsou lokalizovány především v oblasti synapsí a jednou z jejich funkcí je modulace uvolňování neurotransmiterů. Receptory CB_2 jsou exprimovány primárně v buňkách imunitního systému. Buňky zdravého mozku CB_2 receptory nenesou, avšak tyto receptory byly zjištěny v zaníceném mozku, kdy je jejich exprese v mikrogliích modulována cytokiny²³. Dosaďované poznatky ukazují, že za psychoaktivní vlastnosti kanabinoidů, včetně efektu odměny, tolerance a fyzické závislosti, jsou odpovědné receptory CB_1 v mozku²⁴. Hustota receptorů CB_1 v mozku je srovnatelná s jinými receptory spáráhnutými s G proteiny, jako jsou mí opioidní peptidové receptory nebo dopaminové D2 receptory. Početné jsou receptory CB_1 hlavně v mozečku, substantia nigra, globus pallidus, hipokampu a laterálních částech striáta²⁵.



Obr. 3. Neselektivní agonisti (CP 55,940 a WIN 55,212-2) a anandamid

Receptory CB_1 regulují aktivitu osteoklastů. Terapeutické použití kanabinoidů může zvyšovat ztrátu kostní hmoty a predispozici k osteoporóze²⁶.

9. Akutní účinky kanabinoidů na CNS

Řada studií se věnovala a věnuje studiu vyšších funkcí mozku u lidí při intoxikaci kanabinoidy. Rovněž účinky THC na chování pokusných zvířat a na jejich neurochemické procesy umožňují lépe pochopit působení této drogy na lidský mozek. Zatímco akutní účinky THC jsou dobře známy, poznání vlivu chronického užívání marihuany na kognitivní funkce, neurochemické procesy, endokrinní a imunitní systém není dostatečné^{27,28}. Zhoršení kognitivních funkcí je přitom výraznější u osob, které začaly konopné drogy užívat v adolescenci²⁹.

Akutní účinky psychoaktivních kanabinoidů jsou závislé na dávce, způsobu požití, dřívější zkušenosti uživatele marihuany a jeho individuální náchylnosti k psychotropnímu působení Δ^9 -THC, ale také na psychickém stavu uživatele v době užití drogy. Při nízkých dávkách Δ^9 -THC dochází ke kombinaci stimulačních a sedativních účinků, zatímco při vyšších dávkách převažují účinky sedativní³⁰. Psychoaktivní kanabinoidy způsobují v nízkých a středních dávkách (2–10 mg Δ^9 -THC) především kvalitativní změny v senzorickém vnímání, dále pocit pohody, nesmy-

Tabulka II
Nepříznivé akutní vedlejší účinky kouření marihuany²⁷

Akutní vedlejší účinky a rizika
Úzkost a strach
Narušená pozornost
Narušená krátkodobá paměť
Narušený reakční čas, psychomotorické dovednosti a koordinace
Zvýšené riziko dopravních nehod
Zvýšené riziko psychotických příznaků u náchylných osob

slnou euforii, uvolnění a uklidnění; může však dojít i ke zhoršení již předtím špatné nálady či úzkosti. Střední dávky (10–20 mg Δ^9 -THC) vedou k výraznějším projevům citového chování a reaktivity, vnímání a přechodných halucinací. Vážnější nepříznivé účinky²⁷ (tabulka II) nastávají obvykle až při vysokých dávkách (>20 mg Δ^9 -THC), avšak díky vysoké interindividuální variabilitě v odezvě na kanabinoidy k nim může docházet i při dávkách nízkých. Z tohoto hlediska je dávkování drogy mnohem lépe kontrolovatelné při kouření než při perorálním požití.

Akutní toxicita Δ^9 -THC je nízká a nebylo dosud popsáno úmrtí v důsledku jeho požívání. Intoxikace konopnými drogami je obvykle popisována jako příjemná zkušenost (smích, hovornost, zvýšené senzorické vnímání, zvýšená sexuální touha a prožívání), mohou se však vyskytnout i nepříjemné pocity (úzkost, panika, strach) a období pohody může být vystřídáno dysforickou fází, aktivita vystřídána fází sedace nebo spánku. Výrazný je vliv marihuany na zhoršení krátkodobé paměti, avšak schopnost vyvolávat dříve naučené informace zřejmě narušena není. Akutní účinky marihuany na pracovní paměť mizí po asi 3–4 hodinách; do jaké míry dochází k poškození paměti a jiných intelektuálních funkcí při pravidelném užívání vysokých dávek kanabinoidů, je dosud předmětem výzkumu¹⁴. Dalším efektem kanabinoidů je zvýšení chuti k jídlu. Somatické účinky zahrnují hyposalivaci se suchostí v ústech a hrdle, zvýšenou srdeční činnost, zarudlé spojivky, snížení toku slz, někdy ortostatickou hypotenzi s tendencí padat (zřídka se synkopou) a zvýšení krevního tlaku při ulehnutí.

Narušení krátkodobé paměti, psychomotorických funkcí a tendence k prodloužení reakčního času jsou po užití marihuany podobné, jako při intoxikaci alkoholem. Vnímání času je však opačné, marihuana urychluje vnitřní hodiny (1 minuta se zdá být dlouhá několik minut) zatímco alkohol je zpomaluje¹⁴. Uživatelé marihuany jsou spíše uvolnění a klidní, zatímco alkohol může uvolňovat agresivní a násilné chování. Dlouhodobé užívání větších dávek alkoholu vede obvykle k trvalému poškození intelektuálních funkcí až k organickému poškození mozku a psychóze či demenci. Podobné účinky sice nebyly u chronických kuřáků marihuany pozorovány, ale není dosud jasné, do

jaké míry je ovlivněn vývoj a funkce mozku u velmi mladých uživatelů této drogy.

Většina akutních jevů spojených s užíváním marihuany je vratných a tudíž pravděpodobně spojených se změnami mozkových funkcí. Pro studium změn mozkových funkcí při intoxikaci kanabinoidy je vhodné měření regionálního mozkového krevního toku (rCBF) a metabolismu (CMR). Tato měření umožňují nové techniky s využitím metod magnetické rezonance nebo pozitronové emisní tomografie. Bylo tak prokázáno, že užití marihuany je spojeno s celkovým zvýšením rCBF, přetrvávajícím až 2 hodiny, přičemž významné zvýšení bylo pozorováno ve frontálních, inzulárních a předních oblastech cingula. Tyto změny byly větší v pravé hemisféře³¹. Zvýšení rCBF ve frontální a temporální kůře je vztahováno k narušení krátkodobé paměti. Depersonalizace indukovaná s užitím marihuany koreluje se zvýšením rCBF v pravém předním cingulu a v pravé frontální oblasti³². Marihuanou indukované změny ve vnímání času jsou pravděpodobně spojeny se změněným krevním tokem v mozečku³³. Změny celkového CMR glukózy v mozku vlivem THC byly různé, ale vždy došlo k významnému zvýšení v mozečku³⁴.

Zneužívání kanabinoidů může zhoršit příznaky schizofrenie, ale není zřejmě příčinně vázáno ke vzniku schizofrenie. Nicméně existují jasné důkazy o tom, že konopné drogy mohou u náchylných osob přivodit latentní schizofrenní psychózu nebo mohou nepříznivě ovlivnit její průběh³⁵. Není však dosud jasné, do jaké míry způsobuje intoxikace kanabinoidy další duševní poruchy, jako je deprese, úzkostné poruchy apod.^{36,37}. U vulnerabilních jedinců může po požití drogy vzniknout psychotická porucha („toxická psychóza“) trvající delší dobu a zahrnující např. smyslově živé halucinace, záměny osob, bludy (paranoidní, perzekuční) nebo vztahovačnost, psychomotorické poruchy nebo abnormální emoce. Mnohem častější jsou ale neklinické pozitivní psychotické zážitky. Dosud známé poznatky podporují hypotézu, že změny duševního stavu vyvolané užíváním konopných drog vedou ke zvýšenému riziku vzniku pozitivních (halucinace, bludy, bizarní chování, porucha platného společenského myšlení) i negativních (nedostatky v řeči, afektivní oploštěnost, apatie, anhedonie – asocialita, narušená pozornost) psychotických příznaků, přičemž největší vliv má frekvence užívání marihuany a počátek užívání této drogy v časně adolescenci^{38–41}. Teprve další longitudinální studie výskytu psychotických příznaků ve společnosti umožní porozumět vztahu mezi užíváním marihuany a psychózou a zjistit, zda existuje kritické období ve vývoji mozku, kdy jsou kanabinoidy zvláště nebezpečné.

10. Chronické účinky kanabinoidů na CNS

Chronické kouření marihuany přináší obdobná rizika pro respirační trakt jako kouření tabáku, s tím, že jedna marihuanová cigareta (bez filtru a s delší dobou zadržení dechu) odpovídá asi 4 tabákovým cigaretám. Dle neuropsychologických studií se řada chronických účinků ka-

Tabulka III

Nepříznivé chronické vedlejší účinky kouření marihuany²⁷

Pravděpodobné chronické účinky kanabinoidů

Chronická bronchitida

Syndrom závislosti na kanabinoidech

Narušení pozornosti

Narušení krátkodobé paměti

Narušení schopnosti organizovat a integrovat komplexní informace

Další vedlejší účinky se předpokládají, ale nejsou dosud prokázány

kanabinoidů pokládá za pravděpodobné (tabulka III) a mnohé další se předpokládají^{42,43}. Kromě narušení krátkodobé paměti a pozornosti je to především narušení schopnosti organizovat a integrovat komplexní informace. Ačkoli tyto poruchy nemají obvykle kritický dopad na schopnost kuřáků marihuany relativně normálně fungovat, dochází k jasněmu narušení výkonných funkcí mozku a např. ke zvýšenému riziku všech typů úrazů. Hypotéza, podle níž je zneužívání konopných drog spojeno se zvýšeným rizikem vzniku závislosti na jiné droze, je předmětem diskuzí, neboť neurobiologická podstata tohoto spojení není prokázána a ve skutečnosti se může jednat o jev sociálního charakteru^{14,44,45}. Velká pozornost je věnována účinkům konopných drog na vývoj adolescentů, na schopnost jejich dalšího vzdělání a na vznik tzv. „amotivačního syndromu“. Chroničtí uživatelé marihuany mohou být apatičtí, letargičtí, stažení a nemotivovaní, avšak spíše než o amotivační syndrom se může jednat o příznaky deprese, chronické intoxikace a o narušení kognitivních funkcí. Na druhou stranu, lze považovat za prokázané, že dlouhodobé užívání kanabinoidů *i*) nezpůsobuje strukturální poškození mozku, *ii*) neindukuje u lidí poruchu imunitních funkcí, *iii*) nezpůsobuje snížení plodnosti nebo sexuálních funkcí ani u žen, ani u mužů, *iv*) nezpůsobuje klinicky významné genetické změny. Ačkoli riziko negativních účinků kanabinoidů během těhotenství zřejmě není vysoké, je jistější vyhnout se v tomto období všem drogám, včetně marihuany, neboť podle některých studií kanabinoidy ovlivňují hladiny hormonů⁴⁶.

Po chronickém užívání kanabinoidů se vyvíjí tolerance, nikoli však ke všem účinkům a nikoli se stejnou rychlostí a intenzitou. Tolerance je zřejmě způsobena především farmakodynamickými změnami, tj. downregulací a internalizací receptorů v různých oblastech mozku. U lidí vyvolávají toleranci ke kardiovaskulárním i psychickým účinkům kanabinoidů teprve opakované vysoké dávky THC. Přerušení chronického požívání kanabinoidů může způsobit tzv. návratovou reakci („rebound fenomén“), např. zvýšení nitroočního tlaku, ztrátu chuti k jídlu, apod. Tolerance a odvykací stav, resp. „abstinenční syndrom“ byly prokázány u experimentálních zvířat²⁴. Avšak i u některých chronických kuřáků marihuany vzniká po

náhlém přerušení příjmu kanabinoidů odvykací stav s podrážděností, agitací, úzkostí, poruchami spánku, nadměrným pocením, ztrátou chuti k jídlu, atd. Tyto symptomy jsou však obvykle mírné. Na této skutečnosti se pravděpodobně podílí dlouhý poločas vylučování kanabinoidů.

Náchylnost ke vzniku závislosti je oproti opiátům, kokainu, alkoholu, tabáku nebo benzodiazepinům relativně malá a mechanismus jejího vzniku není dostatečně znám⁴³. Závislost na kanabinoidech je dána více psychologickými faktory než fyziologickými (pozn.: zneužívání návykových látek s fyziologickou závislostí je diagnostikováno, pokud je prokázána tolerance nebo odvykací stav). Alespoň některá diagnostická vodítka pro syndrom závislosti (touha nebo pocit puzení užívat drogu, potíže v kontrole užívání kanabinoidů, somatický odvykací stav, průkaz tolerance, postupné zanedbávání jiných potěšení a zájmů, trvalé užívání konopných drog bez ohledu na jasné škodlivé důsledky) jsou však poměrně často splněna. Různé studie uvádějí, že procento čistých uživatelů marihuany, které lze klasifikovat jako závislé, se pohybuje mezi 2 a 10 %. Celoživotní prevalence závislosti na kanabinoidech je třetí nejčastější diagnóza závislosti na návykových látkách, hned po tabáku a alkoholu. Riziko vzniku závislosti je přitom nezávislé na době užívání této drogy, ale zvyšuje se s množstvím a frekvencí užívání marihuany. Zvýšené riziko (téměř 22 %) vzniku pozdější závislosti na kanabinoidech bylo pozorováno u osob, které měly pozitivní reakci na užití kanabinoidů ve věku pod 16 let^{40,47}.

11. Potenciální terapeutické účinky

Z klinického hlediska Δ^9 -THC, jeho metabolit THC-COOH, nepsychotropní kanabidiol, různé analogy kanabinoidů a nově objevované modulatory endogenního kanabinoidního systému vykazují určité terapeutické účinky. Působení kanabinoidů na přenos signálu je především inhibiční, což ukazuje na jejich možnou úlohu v léčbě nemocí, kde je vhodná inhibice uvolňování neurotransmiterů⁴⁸.

Za prokázané lze považovat příznivé účinky kanabinoidů na nevolnost a zvracení (jako vedlejších účinků protinádorové terapie), anorexii a kachexii. Relativně dobře potvrzené jsou i účinky na spasticitu (způsobenou roztroušenou sklerózou nebo poraněním míchy), neurogenní bolest, poruchy pohybu (Tourettův syndrom, dystonie, Parkinsonova choroba, třes, tardivní dyskineza), astma (pouze p.o.) a glaukom. Méně potvrzené jsou účinky na alergie, záněty, infekce, epilepsii, závislost a abstinenční syndrom (při závislosti na benzodiazepinech, opiátech nebo alkoholu); z psychiatrických symptomů je to vliv na reaktivní deprese, poruchy spánku, úzkostné poruchy a bipolární poruchy. Ve stádiu výzkumu jsou i neuroprotektivní účinky THC a jeho působení na autoimunitní nemoci, rakovinu a poruchy krevního tlaku^{1,49–53}.

Byly vyvinuty jak agonisté a antagonisté kanabinoidních receptorů, tak inhibitory zpětného vychytávání endo-

Tabulka IV

Látky působící na kanabinoidní systém zkoumané pro jejich možné terapeutické účinky

Látky působící na kanabinoidní systém

Nepsychotropní kanabinoidy (např. kanabidiol)

Nepsychotropní metabolity Δ^9 -THC

Endokanabinoidy a jejich analogy

Kanabinoidy a jim podobné látky, které nepůsobí přes CB receptory

Látky, které ovlivňují transport a metabolismus endokanabinoidů

Antagonisté kanabinoidních receptorů

kanabinoidů a inhibitory jejich nitrobenzyl enzymové hydrolyzy. Molekulárními cíly léčiv zasahujících do kanabinoidního systému jsou proto jak receptory CB₁ a CB₂, tak transportní protein pro anandamid nebo enzymy katabolizující endokanabinoidy (tabulka IV).

Žádný lék či droga nejsou zcela bezpečné, proto není třeba diskutovat o tom, zda jsou či nejsou kanabinoidy látkou, jejíž užívání není vůbec nebezpečné pro zdraví. Je nepochybné, že marihuana je návyková látka se škodlivými vedlejšími účinky, které nejsou tak nebezpečné jako u kokainu, heroinu nebo amfetaminů, ale jejichž závažnost je umocněna skutečností, že se jedná o nejrozšířenější psychoaktivní drogu. Socioekonomické důsledky jejího zneužívání lze proto těžko srovnávat s ostatními návykovými látkami, kromě alkoholu, kofeinu a nikotinu.

O možnostech lékařského využití marihuany je dlouhodobě vedena diskuse. Klinické zkoušky léků působících na kanabinoidní systém v CNS teprve probíhají a na jejich výsledku závisí, zda budou zavedeny do lékařské praxe v západních zemích. Skutečností je, že s nadějí na zlepšení svého stavu kouří marihuanu ilegálně mnoho pacientů s AIDS, roztroušenou sklerózou, rakovinou nebo glaukolem.

V některých státech jsou dostupné léky, které jsou syntetickými kanabinoidy: dronabinol a nabilon. Dronabinol (Marinol®) je generický název, který byl dán Δ^9 -THC. Čistá substance je světle žlutá pryskyřice, která je prakticky nerozpustná ve vodě. Marinol® se proto připravuje rozpouštěním dronabinolu v sezamovém oleji. V USA je cca 80 % Marinolu® předepisováno pacientům s AIDS (pro stimulaci chuti k jídlu), 10 % při chemoterapii rakoviny (proti nevolnosti a zvracení) a 10 % při jiných indikacích¹⁴. Nabilon (Cesamet®) je keto-kanabinoid; je jedinou klasickou syntetickou obdobou THC, která může být předepisována v některých státech (v Kanadě, Švýcarsku, Velké Británii). Čistá substance je pevná krystalická látka a pro užití se Cesamet® připravuje v pevné podobě. Klinické zkoušky tohoto léku se zaměřují na jeho použití při léčbě nevolnosti a zvracení při chemoterapii rakoviny.

12. Závěry

Mechanismy účinků kanabinoidů jsou studovány jednak proto, že jsou psychoaktivní složkou marihuany či hašiše, jednak proto, že úloha endokanabinoidního systému u člověka není dosud dostatečně známa. Zatímco akutní účinky kanabinoidů jsou celkem dobře známy, poznatky o důsledcích chronického zneužívání konopných drog nejsou dostatečné. Akutní účinky kouření marihuany mohou zahrnovat kromě euforie a povznesené nálady také úzkost a strach, narušení krátkodobé paměti a pozornosti, řadu dalších vlivů na psychiku, vnímání, vědomí, psychomotorický výkon a na různé fyziologické funkce. Mezi pravděpodobné důsledky chronického užívání kanabinoidů patří chronická bronchitida (při kouření), narušení krátkodobé paměti a pozornosti, narušení schopnosti organizovat a integrovat komplexní informace, syndrom závislosti a další. Není dosud jasné, do jaké míry je narušen vývoj a funkce mozku u velmi mladých uživatelů marihuany, ale bylo prokázáno, že tato skupina uživatelů má zvýšené riziko vzniku závislosti. Konopné drogy mohou u náchylných osob přivodit latentní schizofrenní psychózu nebo mohou nepříznivě ovlivnit její průběh a těžcí kuřáci marihuany mohou mít oproti ostatním zvýšené depresivní příznaky. Teprve další studie však umožní porozumět vztahu mezi užíváním marihuany a psychózou a zjistit, zda existuje kritické období ve vývoji mozku, kdy jsou kanabinoidy zvláště nebezpečné.

Specifické účinky kanabinoidů jsou dány především ovlivněním aktivity kanabinoidních systémů v mozku a systémů s nimi spojených. Primární biochemické účinky látek ovlivňujících kanabinoidní systém spočívají v agonistickém či antagonistickém působení na kanabinoidní receptory, v inhibici enzymů podílejících se na katabolismu kanabinoidů nebo v ovlivnění kanabinoidních přenašečů. U chronických uživatelů konopných drog lze předpokládat adaptivní změny v jejich kanabinoidním systému a v souvisejících neurotransmiterových systémech, jako je regulace hustoty a senzibility membránových receptorů a aktivity jejich přenosových systémů.

Hodně se diskutuje o možnostech lékařského využití marihuany. Předmětem výzkumu je syntéza analogů kanabinoidů, které by neměly psychoaktivní vlastnosti Δ^9 -THC, ale měly jeho případné terapeutické účinky. Klinické zkoušky léků působících na kanabinoidní systém v CNS ale teprve probíhají a teprve na jejich výsledku závisí, zda budou zavedeny do lékařské praxe.

Tato práce vznikla s podporou grantu IGA MZ ČR č. NR8408-3/2005.

LITERATURA

1. Earleywine M.: *Understanding Marijuana. A New Look at the Scientific Evidence*. Oxford Univ. Press, New York 2002.

2. Hanuš L. O.: *Adiktologie* 4, 511 (2004).
3. Gaoni Y., Mechoulam R.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646 (1964).
4. Mechoulam R., Gaoni Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3273 (1965).
5. Devane W. A., Dysarz F. A., Johnson M. R., Melvin L. S., Howlett A. C.: *Mol. Pharmacol.* 34, 605 (1988).
6. Devane W. A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.: *Science* 258, 1946 (1992).
7. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., Pertwee R. G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z.: *Biochem. Pharmacol.* 50, 83 (1995).
8. Clarke R. C., Watson D. P., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 1. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
9. ElSohly M. A., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 3. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
10. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 5. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
11. World Health Organization: *Cannabis: A Health Perspective and Research Agenda*. Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, WHO, 1977.
12. Huestis M. A., Henningfield J. E., Cone E. J.: *J. Anal. Toxicol.* 16, 276 (1992).
13. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 31. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
14. Iversen L. L.: *The Science of Marijuana*. Oxford Univ. Press, New York 2000.
15. Brenneisen R., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 6. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
16. Paton W. D.: *Annu. Rev. Pharmacol.* 15, 191 (1975).
17. Leuschner J. T., Wing D. R., Harvey D. J., Brent G. A., Dempsey C. E., Watts A., Paton W. D.: *Experientia* 40, 866 (1984).
18. Pertwee R. G., Ross R. A.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 101 (2002).
19. Glass M., Felder C. C.: *Neurotransmission* 14, 3 (1998).
20. Elphick M. R., Egertová M.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B* 356, 381 (2001).
21. Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I.: *Nature* 346, 561 (1990).
22. Ameri A.: *Prog. Neurobiol.* 58, 315 (1999).
23. Walter L., Stella N.: *Br. J. Pharmacol.* 141, 775 (2004).
24. Tanda G., Goldberg S. R.: *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 115 (2003).
25. Herkenham M., Lynn A. B., Little M. D., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R., Rice K. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1932 (1990).
26. Idris A. I., van 't Hof R. J., Greig I. R., Ridge S. A., Baker D., Ross R. A., Ralston S. H.: *Nat. Med.* 11, 774 (2005).
27. Hall W., Solowij N.: *Lancet* 352, 1611 (1998).
28. Iversen L.: *Brain* 126, 1252 (2003).
29. Pope H. G. Jr., Gruber A. J., Hudson J. I., Cohane G., Huestis M. A., Yurgelun-Todd D.: *Drug Alcohol Depend.* 69, 303 (2003).
30. Leweke F. M., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 22. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
31. Mathew R. J., Wilson W. H., Turkington T. G., Hawk T. C., Coleman R. E., DeGrado T. R., Provenzale J.: *Psychiatry Res.: Neuroimaging* 116, 173 (2002).
32. Mathew R. J., Wilson W. H., Chiu N. Y., Turkington T. G., DeGrado T. R., Coleman R. E.: *Acta Psychiatr. Scand.* 100, 67 (1999).
33. Mathew R. J., Wilson W. H., Turkington T. G., Coleman R. E.: *Brain Res.* 797, 183 (1998).
34. Volkow N. D., Gillespie H., Mullani N., Tancredi L., Grant C., Ivanovic M., Hollister L.: *Psychiatry Res.: Neuroimaging* 40, 69 (1991).
35. Degenhardt L., Hall W.: *Curr. Psychiatry Rep.* 4, 191 (2002).
36. Patton G. C., Coffey C., Carlin J. B., Degenhardt L., Lynskey M., Hall W.: *BMJ* 325, 1195 (2002).
37. Degenhardt L., Hall W., Lynskey M.: *Addiction* 98, 1493 (2003).
38. Arseneault L., Cannon M., Poulton R., Murray R., Caspi A., Moffitt T. E.: *BMJ* 325, 1212 (2002).
39. Zammit S., Allebeck P., Andreasson S., Lundberg I., Lewis G.: *BMJ* 325, 1199 (2002).
40. Fergusson D. M., Horwood L. J., Lynskey M. T., Madden P. A.: *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 1033 (2003).
41. Stefanis N. C., Delespaul P., Henquet C., Bakoula C., Stefanis C. N., Van Os J.: *Addiction* 99, 1333 (2004).
42. Solowij N., Stephens R. S., Roffman R. A., Babor T., Kadden R., Miller M., Christiansen K., McRee B., Vendetti J., for the Marijuana Treatment Project Research Group: *JAMA* 287, 1123 (2002).
43. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 21. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.

44. Degenhardt L., Hall W., Lynskey M.: *Drug Alcohol Depend.* 64, 319 (2001).
45. Kandel D. B.: *JAMA* 289, 482 (2003).
46. Murphy L. L., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 26. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
47. von Sydow K., Lieb R., Pfister H., Höfler M., Wittchen H.-U.: *Drug Alcohol Depend.* 68, 49 (2002).
48. Croxford J. L.: *CNS Drugs* 17, 179 (2003).
49. Piomelli D., Giuffrida A., Calignano A., Rodríguez de Fonseca F.: *TiPS* 21, 218 (2000).
50. Mechoulam R., Hanuš L.: *Pain Res. Manag.* 6, 67 (2001).
51. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 11. The Haworth Integrative Healing Press, New York, London, Oxford 2002.
52. Goutopoulos A., Makriyannis A.: *Pharmacol. Ther.* 95, 103 (2002).
53. Fowler C. J.: *Brain Res. Rev.* 41, 26 (2003).

Z. Fišar (*1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague*): **Phytocannabinoids**

Cannabis is one of the most widely used illicit psychoactive drugs. Both mechanisms of action of cannabinoids and adverse effects of cannabis use are reviewed in this paper. While the effects of cannabinoids have been studied for a long time, a marked progress in knowledge of molecular mechanisms of their action was possible following confirmation of cannabinoid receptors in 1988 and discovery of the endogenous cannabinoid system in 1992. Δ^9 -tetrahydro-cannabinol (Δ^9 -THC) is the major psychoactive component of marijuana. Pharmacokinetics of Δ^9 -THC is strongly influenced by its accumulation in fatty tissues. Acute effects of cannabis on psychic, psychomotor and physiological functions are well known; however, there is little information about the effects of chronic cannabis use. Δ^9 -THC acts as agonist of cannabinoid receptors CB₁ and CB₂, which are coupled through G proteins, negatively to adenylate cyclase and to voltage-dependent calcium channels, positively to mitogen-activated protein kinase or to potassium channels. Activation of cannabinoid receptors CB₁ in the brain is responsible for psychotropic effects of cannabinoids. The effect of cannabinoids on signal transduction is mainly inhibitory. Both negative actions of Δ^9 -THC and therapeutic effects of cannabinoids and their analogues are discussed.

BIOSYNTÉZA HMYZÍCH FEROMONŮ

ANNA LUXOVÁ a IRENA VALTEROVÁ*

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
irena@uochb.cas.cz

Došlo 21.7.05, přijato 16.1.06.

Klíčová slova: biosyntéza, feromony, Blattodea, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera

Obsah

1. Úvod
2. Chemické metody výzkumu biosyntézy feromonů
3. Biosyntéza feromonů různých řádů hmyzu
 - 3.1. Biosyntéza sexuálních feromonů u švábů (Blattodea)
 - 3.2. Sexuální a agregací feromony u brouků (Coleoptera)
 - 3.3. Biosyntéza sexuálních feromonů u much (Diptera)
 - 3.4. Biosyntéza feromonů u motýlů (Lepidoptera)
 - 3.5. Biosyntéza feromonů blanokřídlých (Hymenoptera)
4. Závěr

1. Úvod

Feromony jakožto komunikační látky ovlivňují chování většiny živočichů v důležitých fázích jejich života. U hmyzu je chemická komunikace prakticky základem existence jednotlivých druhů. Chemické signály jsou ve třídě hmyzu podstatně důležitější než jiné vjemy, např. zrakové či sluchové.

Feromony jsou z hlediska chemické struktury množinou obsahující značné množství strukturních typů (alifatické nenasyčené látky, heterocykly, makrocycly, spiroacetyly, terpeny, aromatické látky apod.)¹. Klíčovou roli hraje i stereochemické uspořádání těchto sloučenin. Např. enantiomery, různé polohové isomery či látky s jinou konfigurací na dvojně vazbě mohou vyvolat zcela odlišné chování u hmyzu a mají tak jinou biologickou funkci. V některých případech určité chování vyvolá jen

specifická směs stereoisomerů, jindy jeden enantiomer inhibuje účinky druhého².

Na rozdíl od dobré znalosti chemické struktury feromonů a mechanismů jejich působení v regulaci hmyzího chování je výzkum jejich biosyntézy, její endokrinní regulace a dějů na úrovni molekul novou, prozatím okrajově probádanou oblastí^{3–5}. Studium biogeneze feromonů, ať již pomocí technik organické chemie či molekulární biologie, zaznamenalo prudký vývoj teprve v poslední době. Objasnění biosyntézy unikátních struktur, mezi něž většina feromonů patří, umožňuje komplexní pohled na principy sekundárního metabolismu nejen u hmyzu. Určení funkce enzymů, které katalyzují klíčové kroky biosyntézy feromonů, pomáhá biologům pochopit evoluční vztahy mezi primárním metabolismem a vývojově mladším sekundárním metabolismem. Rovněž určení původu prekurzorů feromonů přináší odpověď na otázku, zda jsou tyto chemické signály v organismu syntetizovány *de novo* ze základních metabolických dvou- nebo tříuhlíkatých jednotek, či zda se jejich skelet tvoří biotransformací již hotového skeletu látky, přijaté např. potravou.

Současný výzkum se zaměřuje přednostně na čtyři řády hmyzu: šváby (Blattodea)⁵, brouky (Coleoptera)^{5,6}, dvoukřídle (Diptera)⁵ a motýly (Lepidoptera)⁵. Důvod hlubšího výzkumu feromonové biosyntézy zástupců těchto řádů vyplývá z toho, že jsou ekonomicky významné jako škůdci (např. kůrovci, švábi, skladištní škůdci, zavíječi, housenky motýlů atd.), nebo jako přirození nepřátelé škůdců (např. slunéčka, chalcidky). Výhodou hmyzu jako modelu je snadná experimentální práce s dostupným materiálem z laboratorních chovů, čímž lze získat větší množství feromonu. Příkladem dobře prozkoumaného modelového hmyzu je např. lišaj tabákový, *Manduca sexta* (Lepidoptera), nebo octomilka, *Drosophila melanogaster* (Diptera).

2. Chemické metody výzkumu biosyntézy feromonů (přehledy^{5,6} a doprovodný materiál)

Experimentální možnosti výzkumu biosyntézy hmyzích feromonů jsou založeny na aplikaci neznačených nebo značených prekurzorů těchto látek. Pokusy mohou probíhat buď *in vivo* aplikací substrátů potravou, vystavením parám, injekcí či rozetřením po povrchu žlázy hmyzu, anebo *in vitro*, kdy se s roztokem substrátu inkubuje izolovaná tkáň, nebo její extrakt.

Nejvíce probádané metody aplikace neznačených látek byly publikovány u brouků rodu *Ips* při výzkumu

* autor pro korespondenci

biosyntézy terpenických feromonů ipsenolu a ipsdienolu z myrcenu a verbenolu z pinenu. Mnohem běžnější metodou výzkumu je aplikace značených prekurzorů feromonů. Značkou ve struktuře substrátu může být např. stabilní isotop (^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{15}N , ^{31}P), nestabilní isotop (^{14}C , ^3H), nebo atom fluoru.

Pro výzkum biosyntézy *de novo* se používají následující prekurzory: *i*) značený acetát či malonát^{7,8} pro výzkum biosyntézy nevětvených mastných kyselin, *ii*) sukcinát, propionát a aminokyseliny, které jsou prekurzorem propionátu jako např. valin, isoleucin, či methionin⁹ pro studium biosyntézy alifatických feromonů substituovaných methylem, *iii*) butyrát pro výzkum biosyntézy alifatických struktur substituovaných ethylem, *iv*) mevalonát, mevalonolaktón hydroxymethyl-glutarát, isopentenyl-difosfát, isopentenol, dimethylallyl-difosfát pro studium biosyntézy terpenických a steroidních látek a v) šikimát, aminokyseliny tyrosin, fenylalanin, tryptofan¹⁰ pro výzkum biosyntézy aromatických strukturálních typů feromonů.

Při studiu specifických kroků biosyntézy specializovaných feromonů u hmyzu byla použita celá řada značených struktur složitějších prekurzorů. Příkladem mohou být terpeny, jako jsou ($^2\text{H}_6$)-značený α -pinen, deuteriem substituované ipsdienol, ipsenol a myrcen či tritiovány geraniol, dále keton (6,7- $^2\text{H}_2$)-(Z)-non-6-en-2-on, deuteriem selektivně značené mastné kyseliny nebo hydroxykyseliny jako např. kyselina (9,10- $^2\text{H}_2$)-8-hydroxypalmitolejová a v neposlední řadě aminokyseliny, jako je (3,4,5- $^3\text{H}_3$)-leucin¹¹.

Pokud jsou jako značené atomy ve struktuře metabolitu použity stabilní isotopy, je k jejich stanovení nejčastěji využito metod plynové a kapalinové chromatografie s hmotnostními detektory se dvěma typy analyzátorů: kvadrupolovým nebo s iontovou pastí. Dalším typem detektoru zapojovaným paralelně s výše jmenovanými klasickými hmotnostními spektrometry a používaným především pro značení uhlíkem ^{13}C je detektor „isotope-ratio-monitoring-MS“ (cit.¹²). Jeho princip je následující. Po průchodu plynovým chromatografem se eluent dělí do dvou proudů ve vyhřívaném dělicím ventilu. Jedna část pokračuje do klasického hmotnostního detektoru, zatímco druhá část organického eluentu se oxidačně spálí za vysoké teploty (940 °C) v peci za katalýzy CuO/Ni/Pt na $^{12}\text{CO}_2$ s konstantní příměsí $^{13}\text{CO}_2$. Směs pokračuje do detektoru s vysokou citlivostí, který měří poměr $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, tedy m/z 45/44. Detektor je kalibrován na standard – přírodní látku z neradioaktivní oblasti např. Peedee Belemnite (křídové zkamenělé mušle z oblasti Peedee v Jižní Kalifornii) s konstantním poměrem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Hodnoty $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ naměřené v neznámém vzorku se počítají v promile

$$\delta\text{‰} = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{vzorku}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{stand}} \times 1000] / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{stand}}.$$

Je-li hodnota pro vzorek malá nebo negativní (na detektoru není pík), žádný atom ^{13}C se do struktury molekuly neinkorporoval, zatímco naměřené hodnoty větší než šum (vizuálně jsou zobrazeny jako pík) dokazují inkorporaci značené látky do molekuly. Struktura látky, do které se ^{13}C značka zapojila, se poté identifikuje podle hmotnostního spektra z paralelně zapojeného hmotnostního

detektoru na základě shody retenčních časů. Tato nová metoda byla dosud publikována při výzkumu biosyntézy frontalinu, agregačního feromonu brouků rodu *Dendroctonus*.

Další, vysoce efektivní metodou pro určení polohy inkorporovaného uhlíku ^{13}C je ^{13}C -nukleární magnetická rezonance. Přirozený obsah isotopu uhlíku ^{13}C v přírodě je pouze 1,1 % a ^{13}C -NMR-spektra se musí akumulovat po delší čas. Inkorporovanému ^{13}C atomu uhlíku se proto v ^{13}C -NMR spektru měřené molekuly mnohonásobně zvýší intenzita signálu. O chemické povaze inkorporovaného isotopu ^{13}C vypovídá jeho chemický posun. K upřesnění struktury molekuly *resp.* polohy inkorporovaného atomu slouží interakční konstanty $J_{\text{C-H}}$, event. $J_{\text{C-C}}$, které jsou ve spektrech díky vyššímu zastoupení ^{13}C isotopu detegovatelné. U studia biosyntézy feromonu hmyzu je využití NMR-spektroskopie problematické, protože feromony jsou mnohdy mnohasložkové směsi látek o nízké koncentraci. Přesto bylo použití této metody publikováno, a to především při studiu feromonálních látek substituovaných methylem. Pomocí ^{13}C -NMR byly např. studovány kutikulární uhlovodíky termitů *Zootermes angusticolis*. Po aplikaci (2,3- ^{13}C)-sukcinátu v potravě se značka objevila v terciárních uhlících monomethyl- či dimethylalkanů. Na základě ^{13}C -NMR spekter po aplikaci (^{13}C -methyl)-2-methylmalonátu byl určen 2-methylmalonát jako prekurzor 3-methylpentakosenu, feromonu švába *Periplaneta americana*. Methylové větvení v kutikulárních uhlovodících mouchy *Musca domestica* vzniklo inkorporací methylmalonylu-CoA, který pochází z aminokyseliny valinu. Do mouchy byl aplikován (1- ^{13}C)-propionát. Halarknar a spol. dokázali zkracování propionátu na acetát při vzniku methylovaných uhlovodíků u švába *Periplaneta americana*. Používali (2- ^{13}C)-propionát a (3- ^{13}C)-propionát a zjistili řazení značených uhlíků do sudých *resp.* lichých poloh uhlovodíku. Acetát v této biosyntéze tedy pochází rovněž z propionátu.

K detekci zabudovaných prekurzorů značených nestabilními isotopy (^{14}C ; $t_{1/2} = 5730$ r) a (^3H ; $t_{1/2} = 12,3$ r) se k měření radioaktivního záření využívá kapalinově-scintilačních analyzátorů. K molekulám, do kterých se radioaktivní atom inkorporoval, je přidána scintilační látka, která je schopna absorbovanou energii záření emitovat ve formě viditelného světla. Tyto scintilační záblesky jsou ve fotonásobiči transformovány na elektrické impulsy a detegovány. Zabudování radioaktivních značených prekurzorů do terpenických feromonů brouků rodů *Ips* a *Scolytus* bylo zjištěno metodou radio-HPLC. Frakce získané z kapalinové chromatografie byly měřeny po přidání scintilačního koktejlu na kapalinově-scintilačním analyzátoru. Ze získaných hodnot radioaktivity jednotlivých frakcí byl rekonstruován chromatografický pík. Látka byla identifikována po srovnání s retenčním časem standardu.

Spojení plynového chromatografu s tepelně vodivostním detektorem (TCD), který nedestruuje analyzované sloučeniny, a s plynově-ionizačním radiodetektem umožňuje analyzovat inkorporaci radioaktivně značených látek do těkavých složek feromonů. Takto byla studována

např. biosyntéza monoterpenických feromonů u brouků rodu *Ips*. Na sledování distribuce radioaktivity mezi jednotlivé třídy sloučenin je starší, ale stále hojně užívaná metoda tenkovrstvé chromatografie s autoradiografickou detekcí. Vyvinutá TLC deska se přiloží k fotografickému papíru (bromid stříbrný v želatině). Ionizující záření emitované zónami, ve kterých se eluují radioaktivní látky, převede AgBr do excitovaného stavu. Excitovaná zrna jsou snadno redukovatelná na elementární stříbro, a proto jsou po vyvolání a ustálení na fotografickém papíře dobře patrné zóny radioaktivních látek¹³. V současné době se TLC desky rovněž skenují pomocí speciálních zařízení, která mapují radioaktivitu na ploše desky. Jedním z nich je např. IP Autoradiography System.

3. Biosyntéza feromonů různých řádů hmyzu

Hlavními otázkami při výzkumu tvorby feromonů jsou především: *i*) kde se nachází sekreční žláza produkují-

cí feromon a jaká je její fyziologie, *ii*) jaké enzymy se podílejí na jednotlivých krocích biosyntézy, *iii*) jak je regulována feromonová biosyntéza, probíhá regulace přímo inhibicí, či aktivací těchto enzymů, anebo prostřednictvím regulace genové exprese těchto enzymů, *iv*) jak se syntetizuje skelet molekuly feromonu, používá hmyz hotový skelet nebo část skeletu molekuly feromonu, který získal v potravě, a pouze ho jednoduššími reakcemi modifikuje na výsledný funkční feromon, nebo se molekula feromonu staví ze základních prekurzorů *de novo*?

Odpovědi na první otázku získávají entomologové zabývající se fyziologií hmyzu. Pomůckou jsou jim snímky tkání hmyzu získané z elektronového mikroskopu. Řešení druhých dvou problémů vyžaduje použití mnoha chemických technik. Jde o navržení možné biosyntetické cesty, syntézu značených prekurzorů, jejich aplikaci a následnou identifikaci metabolitů. Dále se zjišťují vlastnosti enzymů podílejících se na přeměně určených metabolitů.

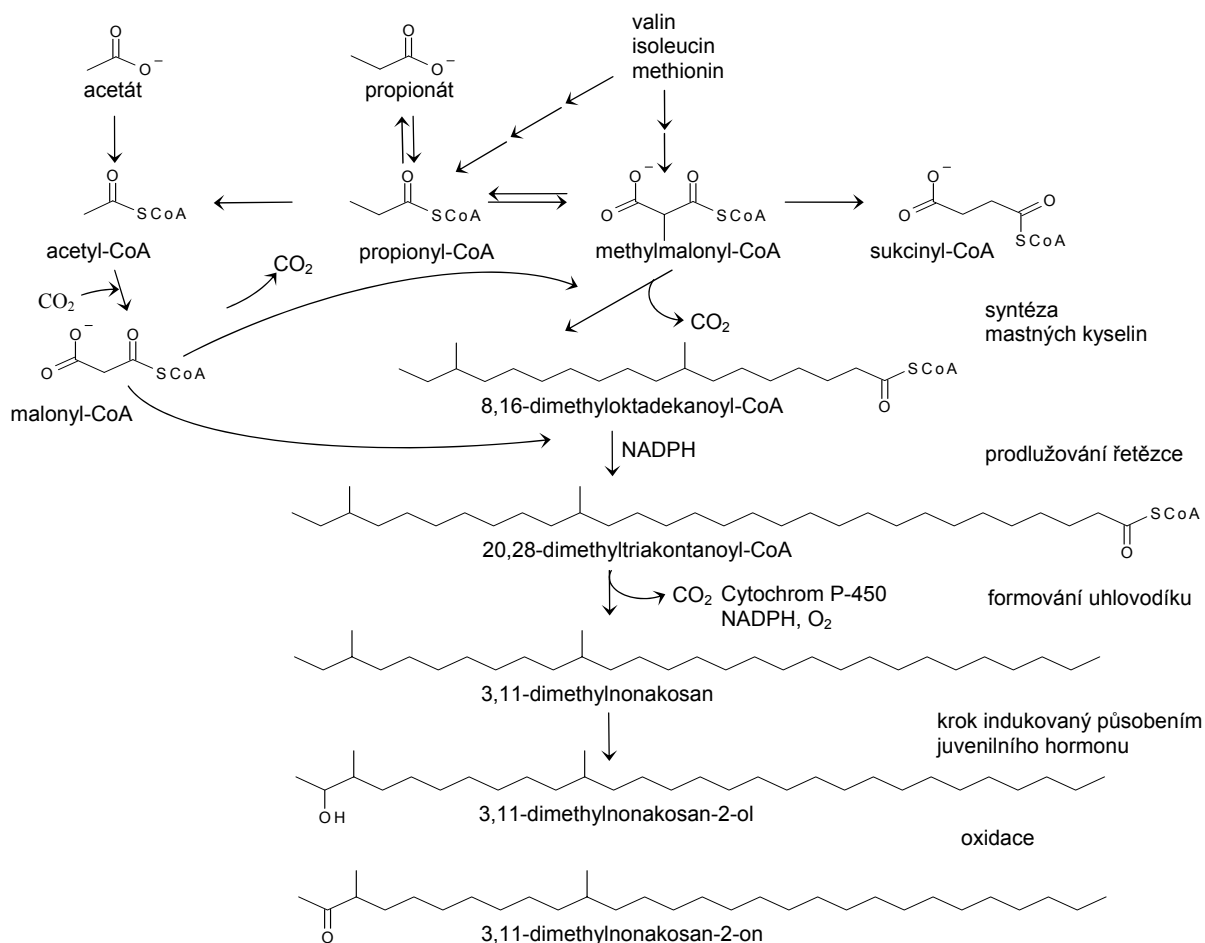


Schéma 1. Biosyntéza sexuálníh feromonů u švábů (podle cit.⁵)

3.1. Biosyntéza sexuálních feromonů u švábů (Blattodea) (přehled⁵ a doprovodný materiál)

Komunikačními látkami příslušníků tohoto řádu hmyzu jsou látky vznikající v metabolismu z mastných kyselin. Nejvíce prostudovaná je biosyntéza samičího feromonu rusa domácího *Blattella germanica*, kterým je 3,11-dimethylnonakosan-2-on (schéma 1). Biosyntéza větveného 20,28-dimethyltriakontanoyl-CoA, který je meziproduktem feromonu, začíná z propionyl-CoA. Ten může vzniknout z aminokyselin valinu, methioninu nebo isoleucinu. Propionyl-CoA se dále karboxyluje za vzniku methylmalonyl-CoA, klíčového metabolitu pro vznik větvení. Řetězec se prodlužuje ve sledu syntézy mastných kyselin vždy o dva uhlíky a do specifických poloh se řadí methylmalonyl-CoA za vzniku methylového větvení v 20,28-dimethyltriakontanoyl-CoA. Redukcí 20,28-dimethyltriakontanoyl-CoA vzniká uhlovodík 3,11-dimethylnonakosan, který je oxidován v dalším kroku na sekundární alkohol 3,11-dimethylnonakosan-2-ol a ten se dále oxidační na 3,11-dimethylnonakosan-2-on.

3.2. Sexuální a agregační feromony brouků (Coleoptera) (přehledy^{5,6} a doprovodný materiál)

Řád brouků zahrnuje cca 300 000 druhů, a proto je chemická různorodost látek uplatňujících se ve vnitrodruhové komunikaci obrovská. Feromony brouků mohou vznikat některým ze tří hlavních způsobů: i) ukládáním rostlinných látek a jejich pozdějším použitím v nezměněné formě k signálnímu účelu¹⁴, ii) modifikací látek přijatých potravou dalšími biosyntetickými reakcemi, jejichž výsledkem je struktura feromonu či iii) *de novo* biosyntézou feromonu ze základních dvou- či tříuhlíkatých jednotek. Předmětem počátečních výzkumů, kdy ještě nebylo možno rekonstruovat celou biosyntetickou cestu, bylo přiřazení syntézy feromonu do jedné z těchto kategorií. Biogeneze feromonu ale často probíhá více způsoby, kdy se biosyntetická cesta *de novo* aktivuje či výrazněji podílí při nedostatečném přísunu prekurzorů z potravy.

Feromony brouků lze velice hrubě rozdělit podle typu řetězce a charakteristické funkční skupiny do několika základních skupin. Cestou mastných kyselin se syntetizují alkoholy, aldehydy, ketony a estery. Příkladem alkoholu je (4*R*)-4-methylnonan-1-ol vylučovaný potměnkem *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae). Japonský brouk *Popilia japonica* (Scarabidae) tvoří keton (5*R*)-5-[(1*Z*)-dec-1-enyl]-oxacyklopentan-2-on zvaný japonilur a kůrovec *Pityogenes chalcographus* (Scolytidae) produkuje ester (2*E*,4*Z*)-methyl-deka-2,4-dienoát jako agregační feromon. Samice kovaříků rodu *Limoni* (Elateridae) lákají samce produkcí krátkých mastných kyselin, zatímco kovaříci rodu *Melanotus* (Elateridae) používají jako feromon tetradecenaly či tetradecenyl-acetáty – sloučeniny podobné sexuální feromonům nočních motýlů. Dalším broukem využívajícím ke komunikaci kyselinu (3*E*,5*Z*)-tetradeka-

-3,5-dienovou je kůrojed *Attagenus megatoma* (Dermestidae). Kutikulární uhlovodíky používá většina hmyzu k impregnaci povrchu těla, ale u některých druhů brouků se vyvinula i sekundární komunikační funkce.

Sloučeniny, jejichž původ je kombinací terpenické a acetogenní biosyntetické cesty, byly jako feromon identifikovány u samic kovaříků *Agriotes obscurus* a *A. lineatus* (Elateridae). Jsou jimi geranyl-hexanoát a geranyl-oktanoát. Dalším strukturním typem jsou makrolidy. Tyto mnohohlíkaté kruhové laktony produkují např. brouci rodu *Cryptolestes* či *Oryzaephilus* (Silvanidae). Spiroacetal syntetizují především brouci rodu *Dendroctonus* z čeledi kůrovcovitých (Scolytidae).

Vznik aromatických feromonů u brouků biosyntetickou cestou kyseliny šikimové nebyl dosud u žádného druhu pozorován. Většina signálních látek s touto strukturou je u brouků syntetizována modifikací aminokyselin. Např. někteří chrousti využívají ke komunikaci deriváty tyrosinu, fenylalaninu či tryptofanu¹⁵. Chroust *Holotrichia parallela* syntetizuje z L-isoleucinu (2*S*,3*S*)-2-amino-3-methyl-methyl-pentanoát (methylester L-isoleucinu).

Biosyntéze terpenických feromonů u brouků byla věnována velká pozornost, protože právě tyto látky využívají ke komunikaci významní lesní škůdci. Jde např. o nosatce *Anthrenus grandis* (Curculionidae) nebo kůrovce *Scolytus* spp., *Ips* spp., *Dendroctonus* spp. (Scolytidae), kteří syntetizují monoterpenické feromonové komponenty¹⁶. Biosyntéza agregačních feromonů u brouků čeledi Scolytidae, kterými jsou monoterpenické alkoholy či ketony, může vycházet z monoterpenů přijatých potravou. Modifikace těchto látek na feromon se poté uskutečňuje oxidačními či hydratačními reakcemi. Zapojoval se mohou i následné oxidace, hydrogenace či intramolekulární přesmyky. Původní acyklické monoterpeny z potravy jsou pro brouky většinou toxické, proto mohla být biotransformace monoterpenů z potravy původně detoxikačním krokem a až během vývoje pravděpodobně získala sekundární funkci chemického informačního mediátoru.

Příklady brouků oxidujících monoterpeny přijaté z potravy na feromony jsou samci lýkožrouta *Ips paraconfusus*, kteří přeměňují (–)- α -pinen z pryskyřice borovice *Pinus ponderosa* na (+)-*cis*-verbenol, který je součástí feromonové agregační směsi (schéma 2). Samci i samice kůrovce *Dendroctonus brevicornis* přeměňují (–)- α -pinen na (–)-*trans*-verbenol, který působí jako jejich antiagregační feromon. Oxidace monoterpenických alkoholů na feromonové komponenty jsou vysoce stereo- a enantioselektivní reakce. Např. u *Ips* spp. odstupuje právě *pro*-4*S* vodík

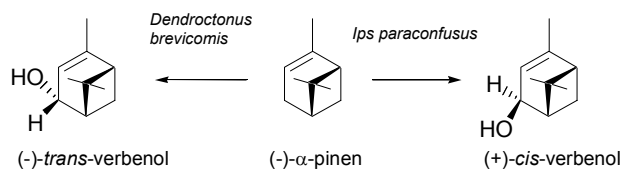
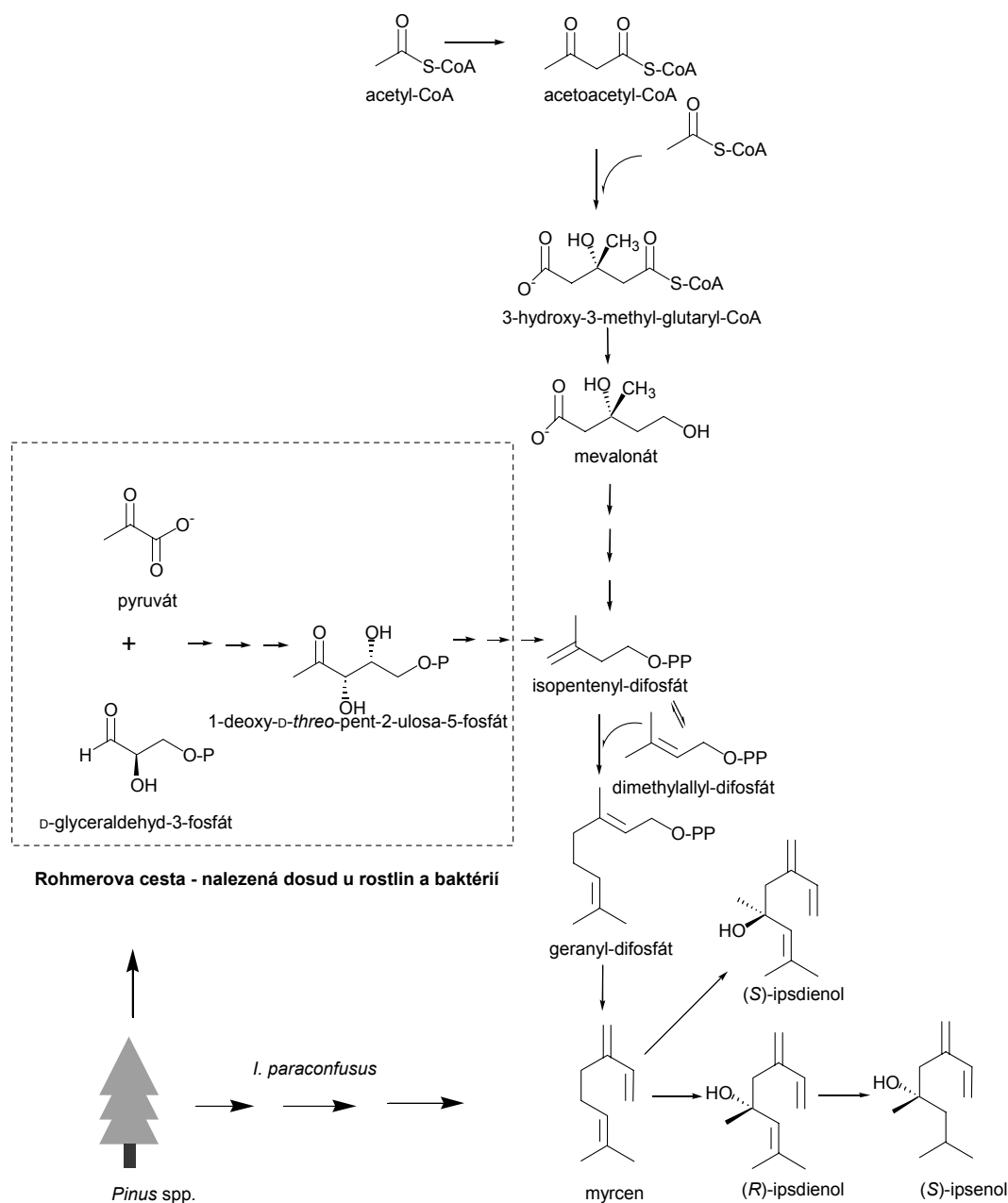


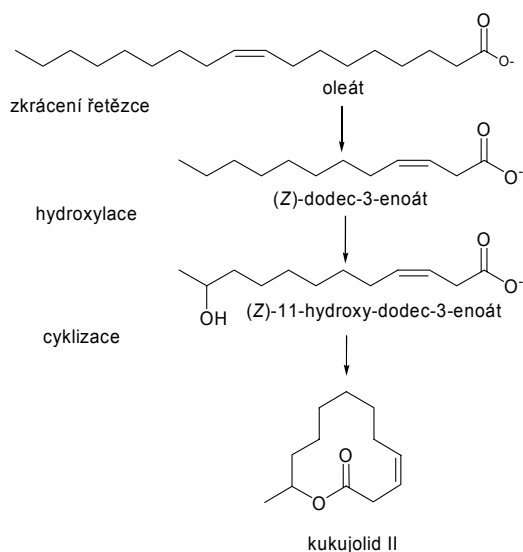
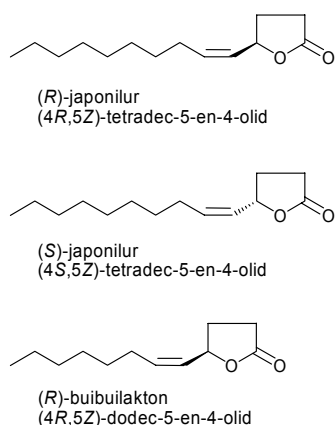
Schéma 2. Přeměna (–)- α -pinenu na (–)-*trans*-verbenol a (+)-*cis*-verbenol (podle cit.⁶)

Schéma 3. Biosyntéza isoprenoidních feromónů u brouků *Ips pini* a *I. paraconfusus* (podle cit.⁵)

z (+)- nebo (–)- α -pinenu za vzniku *cis*-, resp. *trans*-verbenolu.

Někteří lýkožrouti např. *Ips paraconfusus*, *I. pini* a *I. duplicatus* přeměňují acyklické monoterpeny z potravy (např. myrcen) na acyklické alkoholy, které jsou součástí feromonu. Jde o ipsdienol či ipsenol (schéma 3). Některé pozdější práce však řeší otázku, zda modifikace přijatého myrcenu stačí pokrýt veškerou potřebu ipsenolu a ipsdie-

nolu, nebo zda jsou tyto alkoholy syntetizovány zároveň *de novo*. Novější studie používající ^{14}C substituované prekurzory prokázaly zabudování značených látek do skeletů feromonových alkoholů. Nejnovější poznatky u *I. pini* plně dokazují souběžný vznik ipsdienolu *de novo* i modifikací myrcenu z potravy, dosud se však nepodařilo určit příspěvek té či oné cesty. Klasická *de novo* isoprenoidní cesta vzniku terpenů vede od acetátu přes hydroxymethylgluta-

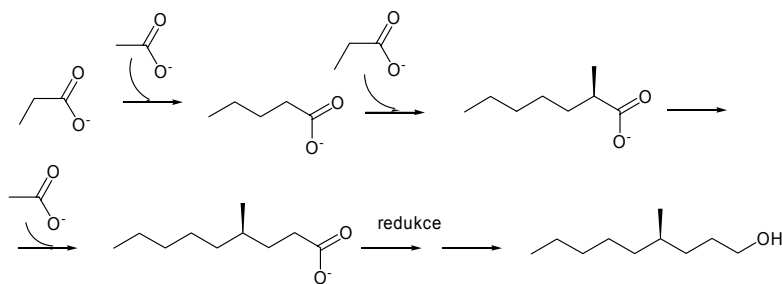
Schéma 4. Biosyntéza kukujolidu II broukem *Cryptolestes ferrugineus* (podle cit.⁶)Schéma 5. (R)- a (S)-japonilur a (R)-buiuilakton (podle cit.¹¹)

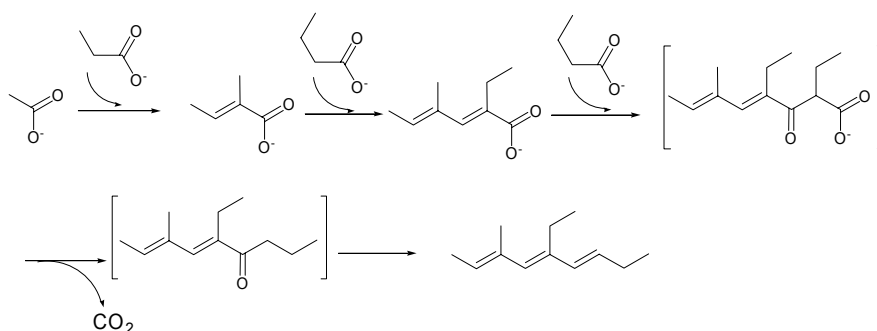
ryl-CoA po mevalonát, ze kterého vzniká dále isopentenyl-difosfát a ten kondenzuje za vzniku monoterpenických jednotek (schéma 3).

V posledních několika letech byl u biologických systémů prokázán i jiný alternativní způsob biosyntézy isoprenoidních látek. Poprvé byl popsán Rohmerem¹⁷ u bakterií a byl po něm pojmenován. Později byl prokázán i u řas a vyšších rostlin. V Rohmerově biosyntetické cestě kondenzují D-glyceraldehyd-3-fosfát a pyruvát, metabolity citrátového cyklu a glykolýzy, za katalýzy enzymovým systémem pentosového cyklu na 1-deoxy-D-threo-pent-2-ulosa-5-fosfát, ze kterého následně vzniká isopentenyl-difosfát. Enzymový systém je umístěn v plastidech a nikoliv v cytoplazmě, jako je tomu u klasické mevalonátové cesty. Rostliny právě tímto způsobem syntetizují monoterpenické sekundární metabolity, které se po požití broukem stanou prekurzory jeho feromonu (schéma 3).

Struktury molekul feromonů mnoha brouků vznikají z mastných kyselin. Příkladem jsou makrolidy zvané kukujolidy II-IX (kukujolid I vzniká z farnesolu získaného potravou), které ke komunikaci používají brouci rodu *Cryptolestes* a *Oryzaephilus* (Cucujidae). Kukujolidy obsahují ve struktuře molekuly dvojnás vazby s (Z)-konfigurací, což ukazuje na jejich původ z nenasycených mastných kyselin. Proto byly lesanovi *Cryptolestes ferrugineus* podávány v potravě ¹⁴C isotopově substituované kyseliny palmitová, olejová a linolová. Isotopové značení bylo ve všech případech nalezeno ve struktuře kukujolidu II. Biosyntetická cesta jeho vzniku vede přes desaturaci stearové kyseliny v poloze 9, zkrácení řetězce o 6 uhlíků v β-oxidačním cyklu následované stereoselektivní hydroxylací v poloze 11 a nakonec cyklizací na makrolidový skelet (schéma 4). Do stejné skupiny laktonových feromonů patří i (R)- a (S)-japonilur a (R)-buiuilakton (schéma 5). Produkují je samice několika druhů vrubounů (*Scarabeus spp.*) jako sexuální atraktant. Jejich biosyntéza je podobná biosyntéze kukujolidů, liší se však pořadím zavedení hydroxyskupiny a zkrácením uhlíkového řetězce ne o šest, ale pouze o čtyři uhlíky¹¹.

Samice skladištního škůdce potměníka *Tenebrio molitor* syntetizuje *de novo* (R)-4-methylnonan-1-ol jako sexuální feromon. Prekurzorem je propionová kyselina, což vede k lichému počtu uhlíků v řetězci, jinak je jeho biosyntéza analogií biosyntézy mastných kyselin. Díky zavedení dalšího propionyl-CoA se řetězec substituuje

Schéma 6. Biosyntéza (R)-4-methylnonan-1-olu, samičího sexuálního feromonu potměníka *Tenebrio molitor* (podle cit.⁶)

Schéma 7. Biosyntéza agregačního feromonu druhu *Carpophilus freemani* (podle cit.⁶)

methylskupinou. V konečné fázi se karboxyl redukuje na hydroxyskupinu a vzniká feromon (schéma 6).

Blýskáček *Carpophilus freemani* (Nitidulidae) produkuje agregační feromon, který je směsí methylem a ethylem substituovaných konjugovaných polyenů se třemi až čtyřmi dvojnými vazbami. Po aplikaci značených prekurzorů byla rekonstruována následná biosyntetická cesta, která je podobná biosyntéze mastných kyselin. Základní jednotkou je acetyl-CoA, se kterým kondenzuje propionyl-CoA a vzniká první substituce methylem. Aniž by docházelo k redukci vzniklé dvojné vazby, připojuje se butyryl-CoA za vzniku ethylskupiny. Poté kondenzuje poslední butyryl-CoA, z prekurzoru se odštěpuje oxid uhličitý a dekarboxylovaný produkt se stabilizuje dehydratací za vzniku třetí konjugované dvojné vazby v (2*E*,4*E*,6*E*)-5-ethyl-3-methylnona-2,4,6-trienu (schéma 7). Biosyntéza

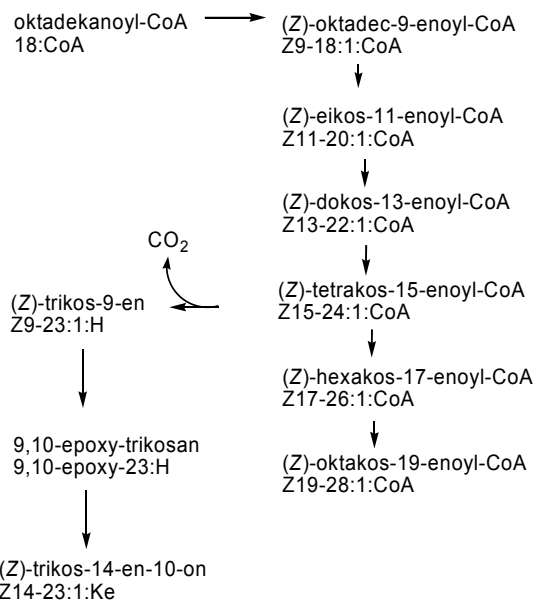
čtrnáctiuhlíkatých, vícenásobně nenasycených uhlovodíků substituovaných methyly a ethyly byla prokázána též u příbuzných druhů *C. davidsoni* a *C. mutilatus*.

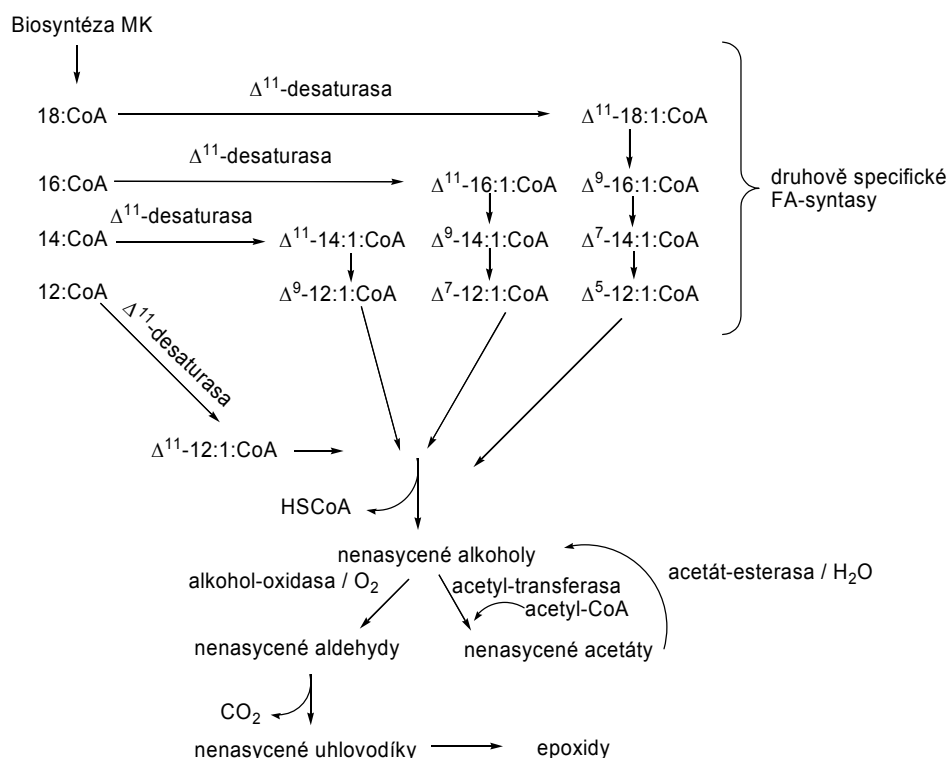
3.3. Biosyntéza sexuálních feromonů u much (Diptera) (přehled⁵ a doprovodný materiál)

Feromony na bázi uhlovodíků jsou u much přítomny v kutikule a jsou strukturně podobné uhlovodíkům v epikutikulární lipidové vrstvě, shodné u všech druhů hmyzu¹⁸. Tyto feromony syntetizované dekarboxylací mastných kyselin¹⁹ byly podrobně studovány u dvou modelových druhů much: octomilky *Drosophila melanogaster* a v domácnostech běžně se vyskytující mouchy, *Musca domestica*.

U samic druhu *D. melanogaster* je (7*Z*,11*Z*)-heptakosa-7,11-dien nejběžněji zastoupeným kutikulárním uhlovodíkem, zatímco u samců se nejvíce vyskytuje (Z)-trikos-9-en. Biosyntéza těchto nenasycených uhlovodíků vychází z palmitové kyseliny. Společným krokem u samic i samců je desaturace palmitové kyseliny v poloze 9. Následnost desaturací při vzniku samičího (7*Z*,11*Z*)-heptakosa-7,11-dienu nebyla dosud prokázána. Dochází buď k desaturaci (Z)-ikosa-13-enové kyseliny v poloze 9, nebo k desaturaci (Z)-oktadec-11-enové kyseliny v poloze 7.

Druhým podrobně studovaným druhem mouchy je *Musca domestica*. Samice mají jako hlavní a účinnou složku feromonu (Z)-trikos-9-en a dále jsou přítomny 9,10-epoxytrikosan, (Z)-trikos-14-en-10-on a specifická směs methylalkanů. Po aplikaci příslušných isotopově substituovaných prekurzorů acetátu, stearátu a oleátu byl zjištěn následující biosyntetický postup. Klasickou syntézou mastných kyselin vzniká stearyl-CoA, který je desaturován v poloze 9 a následně ve 3 krocích prodloužen za katalýzy mikrozomální elongasou mastných kyselin na (Z)-tetrakos-10-enoyl-CoA. Dekarboxylací této látky vzniká (Z)-trikos-9-en. V posledních krocích se tento uhlovodík oxiduje na 9,10-epoxytrikosan a (Z)-trikos-14-en-10-on, které tvoří další složky feromonu (schéma 8).

Schéma 8. Biosyntéza samičího feromonu mouchy *Musca domestica* (podle cit.¹⁹)

Schéma 9. Obecné schéma biosyntézy alifatických feromonů motýlů (podle cit.⁵ a cit.¹³)

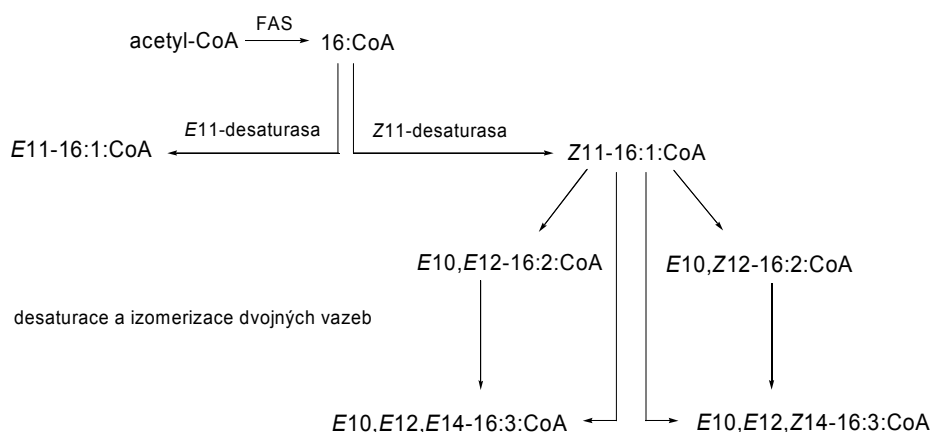
3.4. Biosyntéza feromonů u motýlů (Lepidoptera) (přehled⁵ a doprovodný materiál)

Sexuální feromony produkované motýly jsou obecně lineární deriváty mastných kyselin s počtem uhlíků od 12 do 18. Ve feromonech byly identifikovány především alkoholy, aldehydy nebo acetáty, a to od nasycených po trojnásobně nenasycené. Konfigurace dvojných vazeb je obvykle *cis*²⁰, ale vyskytuje se i *trans* konfigurace. Dalším minoritně zastoupeným strukturním typem látek jsou lineární či methylem větvené nenasycené uhlovodíky a z nich vznikající epoxidy, alleny či eniny. Díky variabilitě poloh a konfigurací dvojných vazeb, délek řetězců a kyslíkatých funkčních skupin, případně různých poměrů zastoupení jednotlivých komponent ve feromonových směsích vzniká široká škála druhově specifických feromonů²¹. K podrobnému výzkumu biosyntézy feromonů motýlů byly nejprve zvoleny tři druhy *Trichoplusia ni* (Noctuidae), *Agryrotaenia velutinana* (Totricidae) a *Choristoneura fumiferana* (Totricidae). Jako prekurzory byly použity ¹⁴C isotopově substituované acetáty alifatických alkoholů a mastné kyseliny⁷.

Prvotním cílem bylo rozhodnout, zda dvanácti- a čtrnáctiuhlíkaté skelety feromonových komponent jsou přímo produktem biosyntézy kratších mastných kyselin katalyzované specifickými syntasami mastných kyselin, nebo zda

vznikají zkrácením z palmitové a stearové kyseliny, které jsou produktem klasické biosyntézy mastných kyselin. Po objevu Δ^{11} -desaturas, pracujících s osmnácti-, šestnácti-, čtrnácti- a dvanáctiuhlíkatými thioestery mastných kyselin, a po určení vysoce selektivních zkracovacích reakcí byla jednoznačně potvrzena cesta zkrácení produktů klasické biosyntézy mastných kyselin katalyzované cytosolickou syntasou mastných kyselin⁷. Následovalo shrnutí a definování modelové biosyntézy feromonových derivátů mastných kyselin motýlů¹³ (schéma 9). Enzymový komplex syntasy mastných kyselin je lokalizován v cytoplazmě, desaturasy a enzymy podílející se na zkrácení řetězce jsou asociovány s endoplazmatickým retikulem²¹.

Ne všechny dvojně vazby v řetězcích vznikají činností Δ^{11} -desaturas. Např. u samic makadlovky *Pectinophora gossypiella* (Gelechiidae) se tímto enzymem dehydrogenuje (Z)-oktadec-9-enoyl-CoA (Z9-18:1:CoA), kde první dvojná vazba vznikla za katalýzy běžné Δ^9 -desaturasy. Po modifikaci karboxylu je výsledkem acetát Z9,Z11-C18:2:OAc. Naproti tomu dvojná vazba ve feromonu obaleče *Cteptoseutius herana* (Totricidae), jímž je acetát Z5-14:1:OAc, vzniká rovnou desaturací v poloze 5 čtrnáctiuhlíkaté kyseliny. Také dvojně vazby se sudou polohou nemusejí vznikat působením nejběžnějších Δ^5 - nebo Δ^{11} -desaturas. Např. Jurenka popsal vznik dvojně vazby v poloze 12 u Z9,E12-C14:2:OAc, feromonu dvou druhů zavíječů *Cadra cautella* (Pyralidae) a *Spodoptera exigua*

Schéma 10. Schéma následné desaturace monoenoových a dienových prekurzorů feromonu samic *Manduca sexta* (podle cit.²³)

(Noctuidae), dehydrogenací $Z9-C14:1:CoA$ Δ^{12} -desaturasou. Další dvojná vazba se sudou polohou v acetátovém feromonu $Z8-14:1:OAc$ obaleče *Planotortrix excelsa* se do polohy 8 posunula po zkrácení $Z10-C16:1:CoA$. Tento meziprodukt vznikl desaturací $16:CoA$ specifickou Δ^{10} -desaturasou, dále byl zkrácen na $Z8-14:1:CoA$, redukován a acetylován na samotný acetát $Z8-14:1:OAc$. Další desaturasa byla identifikována při vzniku feromonu $E12-$ a $Z12-14:1:OAc$ u zavíječe *Ostrinia furnicalis*. Tento feromon vzniká dehydrogenací $16:CoA$ Δ^{14} -desaturasou za vzniku $E14-$, nebo $Z14-16:1:CoA$. Intermediát je dále zkrácen o dva uhlíky a převeden na acetátovou komponentu feromonu.

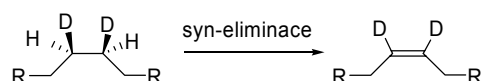
Feromonová biosyntéza u motýlů je regulována prostřednictvím neuropeptidu indukujícího biosyntézu feromonu (PBAN). Tento neuropeptid byl poprvé lokalizován v mozgových gangliích *Heliothis zea*²². Z mozku je v určité časové periodě skotofáze vyplaven do hemolymfy, kterou se transportuje do feromonové žlázy. Tam se naváže na receptor na povrchu sekrečních buněk, čímž podnítl otevření vápenatých kanálků v buněčné membráně. Vápenaté ionty prostupují do cytosolu buňky a aktivují enzym adenylátcyklasu, která dále katalyzuje vznik nitrobuněčného posla cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) z ATP. cAMP aktivuje enzymy proteinkinasy, které fosforylaci dalších enzymů spouštějí celou signální kaskádu vedoucí k aktivaci enzymů feromonové biosyntézy.

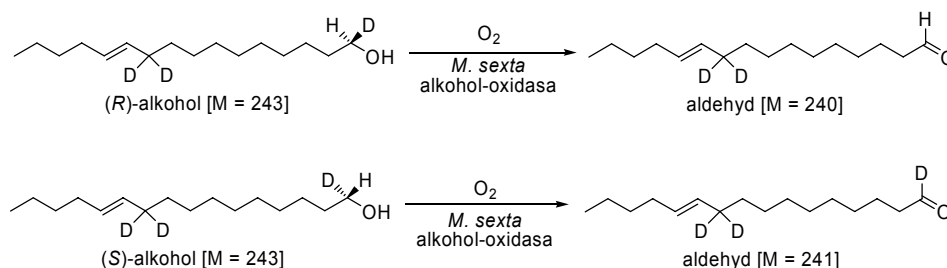
Významným modelovým druhem motýla je lišaj tabákový, *Manduca sexta*. O studiu složení jeho sexuálního feromonu, biosyntetických drah jeho tvorby a mechanismů jeho percepce hmyzem existuje bezpočet prací. Sexuálním atraktantem tohoto tabákového škůdce je směs osmi šestnáctiuhlíkatých aldehydů. Tyto aldehydy jsou produkovány ve feromonové žláze umístěné v intersegmentální membráně mezi šestým a osmým segmentem samičího abdomenu. Produkce feromonu trvá pouze 3–5 hodin. Pro laboratorní studie lze tuto fázi prodloužit injekcí neuropeptidu PBAN do abdomenu samic. Feromon není ve žláze skladován,

ale okamžitě vypouštěn do ovzduší. Aby se mohl feromon syntetizovat dle potřeby, jsou prekurzory biosyntézy, jimiž jsou již v příslušných polohách nenasyčené mastné kyseliny, uloženy do zásoby ve formě triacylglycerolů (TAG) v tukovém tělese v abdomenu samic *Manduca sexta*. Množství a složení nenasyčených mastných kyselin, vázaných v TAG, koreluje s polohami dvojných vazeb ve feromonálních aldehydech.

Biosyntézou konjugovaných systémů se zabýval Fang a spol.²³ Průběh je patrný ze schématu 10. $16:CoA$ je desaturován dvěma typy desaturas na $Z11-16:1:CoA$ a $E11-16:1:CoA$. Tyto prekurzory se ukládají do zásoby ve formě TAG a v případě potřeby jsou z nich syntetizovány feromonové komponenty. Jako prekurzor k dalším modifikacím je dále využíván pouze $Z11-16:1:CoA$, který je selektivně přeměňován následnými desaturacemi a isomerizacemi dvojných vazeb. Výslednými produkty jsou $E10,E12-C16:2:CoA$ a $E10,Z12-C16:2:CoA$ a také oba trienoyly $E10,E12,E14-C16:3:CoA$ a $E10,E12,E14-C16:3:CoA$. Druhá cesta vzniku trienoyl-CoA vede přes desaturaci $Z11-16:1:CoA$ na oba dienoyl-CoA a teprve z nich se v dalším kroku tvoří následnou desaturací oba trienoyl-CoA. (viz schéma 10). Přesný mechanismus následných desaturací nebyl dosud plně objasněn.

Stereochemie desaturace hexadekanové kyseliny Δ^{11} -(Z)-desaturasou z feromonové žlázy samic lišaje tabákového byla objasněna²⁴. Jako prekurzor byly použity enantioselektivně deuteriem substituované kyseliny $(2,2,3,4,5,5,6,6,7,8,9,9,11,12-^2H_{14})$ -(11R,12S)-hexadekanová a $(2,2,3,4,5,5,6,6,7,8,9,9,11,12-^2H_{14})$ -(11S,12R)-hexadekanová kyselina. Po inkubaci feromonové žlázy

Schéma 11. Stereochemie desaturace hexadekanové kyseliny Δ^{11} -(Z)-desaturasou (podle cit.²⁴)

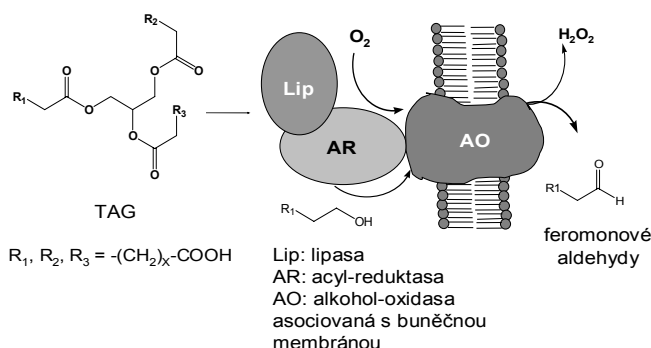
Schéma 12. Stereospecifický průběh oxidace alkoholických prekurzorů feromonu lišaje tabákového, *Manduca sexta*²⁵

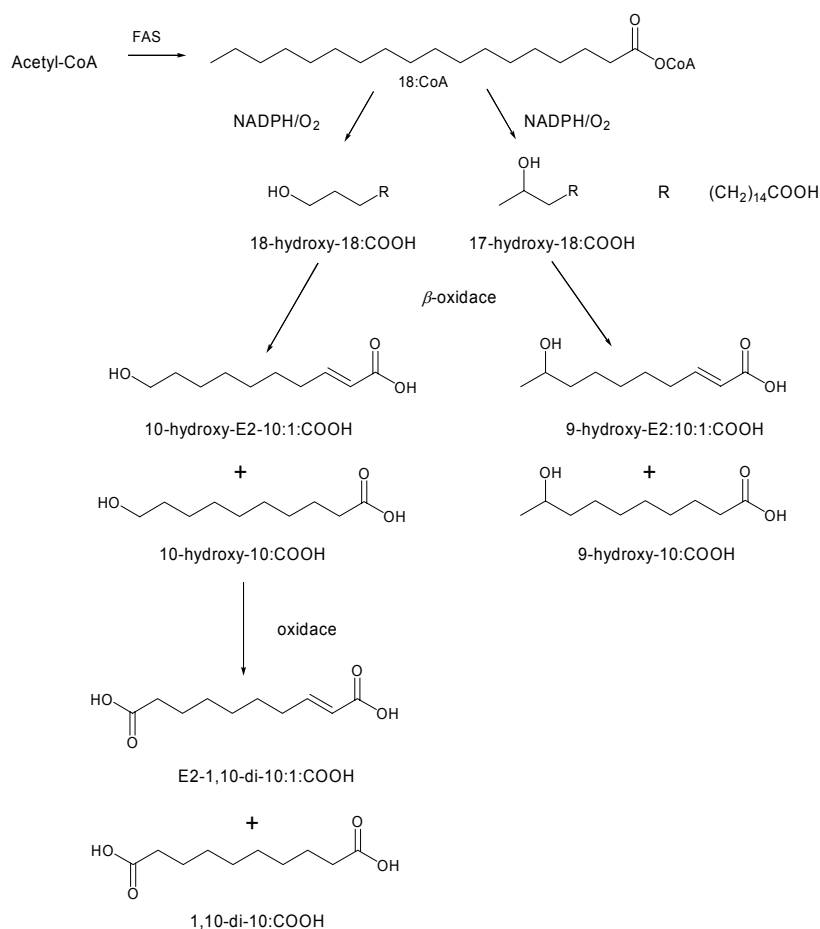
s deuteriem značeným enantiomerem (11*R*,12*S*) byly působením Δ^{11} -(*Z*)-desaturasy odstraněny dva vodíky za vzniku (2,2,3,4,5,5,6,6,7,8,9,9,11,12-²H₁₄)-(*Z*)-hexadec-11-enové kyseliny. Druhý enantiomer (11*S*,12*R*) byl desaturován Δ^{11} -(*Z*)-desaturasou na [2,2,3,4,5,5,6,6,7,8,9,9-²H₁₂]-(*Z*)-hexadec-11-enovou kyselinu. Z poloh 11,12 odstoupila obě deuteria. Z experimentů vyplývá, že Δ^{11} -(*Z*)-desaturasa katalyzující vznik dvojné vazby ve složkách feromonu samic *Manduca sexta* má *pro*-(*R*)-C(11) a *pro*-(*R*)-C(12) stereospecifitu a katalyzuje *syn* eliminaci dvou vodíkových atomů (viz schéma 11). Stereochemie oxidace hexadec-11-en-1-olu na hexadec-11-enal byla též objasněna²⁵. Pomocí deuteriem selektivně značených alkoholů o známé absolutní konfiguraci bylo zjištěno, že oxidace probíhá s *Re* stereospecifitou (schéma 12).

Rekonstrukce celé biosyntetické cesty feromonu *Manduca sexta* je pravděpodobně následující (schéma 13). Klasickou biosyntézou mastných kyselin vznikají acyl-CoA, které jsou desaturovány specifickými desaturasami a isomerasami na monoenoové, dienoové a trienové prekurzory feromonu. Tyto prekurzory jsou zabudovány do TAG v tukovém tělese v abdomenu samic. V příslušné periodě

skotofáze se kyseliny z TAG uvolní působením lipas, a to buď ve volné formě, nebo ve formě acyl CoA a redukují se uvnitř sekrečních buněk na alkoholy. Alkoholy se dále oxidují na aldehydy selektivní oxidasou lokalizovanou ve feromonové žláze. Celý proces je endokrinně regulován za účasti neuropeptidu PBAN. Zajímavé je, že alkoholy odpovídající konfiguraci dvojných vazeb feromonovým složkám nebyly ve feromonové žláze detegovány. Oxidasa má zřejmě tak vysokou účinnost, že oxiduje alkoholy na aldehydy okamžitě po jejich vzniku.

Oxidační aktivita a charakterizace feromonové oxidasy byla popsána Fangem²⁶. Membrána konce abdomenu byla rozdělena na osm částí, z nichž nejvyšší oxidační aktivitu ukázaly kromě feromonové žlázy i řitní papily, ze kterých je feromon do ovzduší odpařován. Autoři prokázali oxidační aktivitu tkáně také v nevodném prostředí, např. v hexanu. Inhibice oxidasy známým inhibitorem monoxygenas piperonylbutoxidem potvrdila příslušnost enzymu k této třídě. Možné uplatnění enzymového mechanismu, kdy je zapotřebí molekulární kyslík jako jeden z kaskády kofaktorů, naznačily pokusy, ve kterých se oxidační aktivita enzymu snížila v prostředí inertního plynu. Dále bylo

Schéma 13. Konečná fáze biosyntézy feromonových aldehydů ve feromonové žláze samic *Manduca sexta*

Schéma 14. Kastově specifická biosyntéza kyselin dělnic včely medonosné *Apis mellifera* (podle cit.²⁸)

zjištěno, že feromonová oxidasa samic *M. sexta* má jen malou specifitu pro délku řetězce alkoholového substrátu.

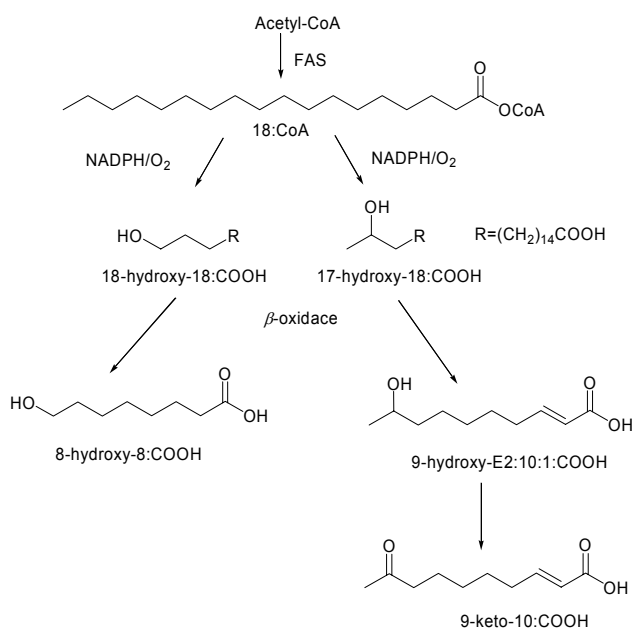
3.5. Biosyntéza feromonů blanokřídlých (Hymenoptera)

Informace o biosyntéze feromonů tohoto řádu jsou velmi kusé, protože identifikované feromony blanokřídlých, jejichž typickými zástupci jsou včely, vosy, čmeláci či mravenci, jsou komplexní směsi vylučované v malém množství identifikovatelném pouze citlivými analytickými přístroji.

Studie zaměřené především na lokalizaci biosyntézy kutikulárních uhlovodíků mravenců *Cataglyphis niger* byly provedeny v Izraeli²⁷. Jako kontaktní rozpoznávací feromon využívají tyto mravenci směs mono- či dimethylovaných nasycených dlouhých uhlovodíků, kde převládá heptakosan, nonakosan, triakontan či hentriakontan. Po aplikaci ¹⁴C značeného acetátu byla sledována distribuce radioaktivity mezi jednotlivé třídy lipidů v závislosti na čase a na lokalizaci v jednotlivých tkáních. Formulované závěry jsou následující. Uhlovodíky se syntetizují

v tukovém tělese mravenců z mastných kyselin deponovaných v TAG. Odtud jsou transportovány hemolymfou do postfaryngeální žlázy, kde se ukládají. Mravenci je z této žlázy vylučují a třením nohou o kutikulu se jimi impregnují.

Ojedinelé biosyntetické studie feromonů nadčeledi včelovitých byly provedeny na výměšcích mandibulárních (kusadlových) žláz dělnic a královen včely medonosné, *Apis mellifera*²⁸. Produkované hydroxy- a ketokyseliny mají v kolonii základní komunikační a regulační funkci. Dělnice syntetizují v mandibulární žláze směs (*E*)-10-hydroxydec-2-enové kyseliny, 10-hydroxydekanové kyseliny a 8-hydroxyoktanové kyseliny. Dále byly ve žláze dělnic identifikovány dikarboxylové kyseliny (*E*)-dec-2-en-1,10-diová a dekan-1,10-diová, jež slouží především jako konzervant a ochucovač potravy, kterou dělnice krmí larvy (schéma 14). Výměšek mandibulární žlázy královen, zvaný mateří látka, se skládá především z (*E*)-9-oxodec-2-enové a (*E*)-9-hydroxydec-2-enové kyseliny (schéma 15). Matka si pomocí mateří látky udržuje dominantní postavení v kolonii. Dělnice, které olizují feromon z matčina těla, mají potlačen vývoj vaječníků a nekladou vajíčka. Jejich chování pod vlivem mateří látky nepodporuje výchovu

Schéma 15. Kastově specifická biosyntéza mateří látky u včely medonosné *Apis mellifera* (podle cit.²⁸)

nových matek v hnízdě, ale v době rojení nutí dělnice shlukovat se kolem vylétající mladé matky²⁹.

Série experimentů s prekurzory složek mateřího feromonu substituovanými stabilními isotopy dokázala, že biosyntéza těchto kyselin začíná *de novo* tvorbou kyseliny stearové. Kyselina stearová je selektivně hydroxylována v poloze 17 a 18, avšak hydroxylace může probíhat dvěma možnými mechanismy. První je dvoukrokový a spočívá nejprve v desaturaci kyseliny a následné hydrataci dvojné vazby za vzniku hydroxykyseliny. Druhý mechanismus spočívá v přímém zavedení hydroxyskupiny oxidací vzdušným kyslíkem za katalýzy NADPH. Nepřítomnost prekurzoru s dvojnou vazbou na konci řetězce podporuje druhý způsob vzniku hydroxykyselin. Hydroxylovaná stearová kyselina je potom zkrácena β -oxidací. Tento proces je selektivní pro různé kasty. Královny zkracují především 17-hydroxystearovou kyselinu na 9-hydroxydekanovou a 9-hydroxydec-2-enovou kyselinu a dále 18-hydroxystearovou kyselinu na 8-hydroxyoktanovou kyselinu (schéma 15). Dělnice preferují jako prekurzor 18-hydroxystearovou kyselinu, kterou zkracují na osmi- a desetuhlíkaté kyseliny, především pak na kyselinu 10-hydroxydec-2-enovou. Z té se potom oxidací hydroxyskupiny tvoří dikarboxylové kyseliny (schéma 14).

V začátcích jsou i studie biosyntézy samčích značkovacích feromonů čmeláků. Tyto feromony hrají klíčovou roli při námluvách čmeláků a slouží k přilákání samic na území hájené samcem. Jsou produkovány cefalickou (hlavovou) částí samčí labiální žlázy. Po chemické stránce jsou tyto feromony směsí látek, v níž převažují buď terpenické alkoholy či jejich estery, nebo deriváty mastných kyselin. V každém případě jsou tyto směsi feromonových komponent druhově specifické a jednotlivé druhy si udržu-

jí konstantní složení feromonu bez ohledu na značné vzdálenosti lokalit výskytu či jejich úplné geografické oddělení. Zatímco biosyntéza terpenických složek samčích značkovacích feromonů studována nebyla, o alifatických složkách se v literatuře spekulovalo již dříve, avšak bez konkrétní experimentální evidence. V současné době již máme první informace o pochodech, jimiž vznikají ethylestery mastných kyselin (převážně ethyl-(Z)-tetradec-9-enoát) u čmeláka hájového (*Bombus lucorum*) či alkoholy (převážně (Z)-hexadec-9-en-1-ol) u čmeláka skalního (*B. lapidarius*)³⁰. Zdá se, že základní principy známé z biogeneze feromonů motýlů se uplatňují i u čmeláků. Prekurzory feromonových složek (kyseliny (Z)-tetradec-9-enová či (Z)-hexadec-9-enová) jsou s největší pravděpodobností skladovány v tukovém tělese ve formě triacylglycerolů a posléze transportovány hemolymfou do labiální žlázy, kde jsou modifikovány na vlastní feromonové složky. Z desaturačních enzymů, uplatňujících se při biosyntéze, byla zatím nalezena jen Δ^9 -desaturasa na rozdíl od Δ^{11} -desaturas typických pro feromony motýlů.

4. Závěr

Z uvedeného souhrnu je zřejmé, jak rozmanitými cestami vznikají feromony u hmyzu. Nelze předem odhadnout, která biosyntetická cesta se uplatní při tvorbě stejných nebo podobných látek, neboť k nim hmyz často dospěje odlišnými cestami. Navíc se v řadě případů uplatňují i alternativní cesty k těžce látky podle dostupnosti potřebných prekurzorů. Proto je studium biosyntézy feromonů tak zajímavé, neboť často vede i k objasnění základních principů funkce a selektivity enzymů.

Výzkum biosyntézy hmyzích feromonů byl v ČR podporován granty GA AV ČR (# A4055403) a GAČR (# 203/02/0158).

LITERATURA

1. Francke W., Schulz S., v knize: *Comprehensive Natural Products 8* (Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O., ed.), str. 191. Elsevier Science Ltd., Oxford 1999.
2. Mori K.: Eur. J. Org. Chem. 1998, 1479.
3. Prestwich G. D., Blomquist G. J., v knize: *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, Orlando 1987.
4. Carde R. T., Minks A. K., v knize: *Insect Pheromone Research, New Directions*. Chapman and Hall, New York 1997.
5. Tillman J. A., Seybold S. J., Jurenka R. A., Blomquist G. J.: Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 481 (1999).
6. Seybold S. J., Vanderwel D., v knize: *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* (Blomquist G. J., Vogt R. G., ed.) str. 137. Elsevier Academic Press, Amsterdam 2003.
7. Bjostad L. B., Wolf W. A., Roelofs W. L., v knize: *Pheromone Biochemistry* (Blomquist G. J., Prestwich G. D., ed.) str. 77. Academic Press, Orlando 1987.
8. Volpe J. J., Vagelos P. R.: Annu. Rev. Biochem. 42, 2 (1973).
9. Blomquist G. K., Borgeson C. E., De Renoables M., v knize: *Insect Lipids, Chemistry, Biochemistry and Biology* (Stanley-Samuelson, Nelson D. R., ed.) str. 318. Univ. of Nebraska Press, Lincoln 1993.
10. Leal W. S., v knize: *Insect Pheromone Research, New Directions* (Carde R. T., Minks A. K., ed.) str. 505. Chapman and Hall, New York 1997.
11. Leal W. S., v knize: *Pheromones of Non-Lepidopteran Insect Associated With Agricultural Plants* (Hardie J., Minks A. K., ed.), str. 51. CABI Publishing, New York 1999.
12. Platzner I. T., v knize: *Modern Isotope Ratio Mass Spectrometry*. John Wiley and Sons, West Sussex 1997.
13. Morse D., Meighen E. A., v knize: *Pheromone Biochemistry* (Blomquist G. J., Prestwich G. D., ed.) str. 121. Academic Press, Orlando 1987.
14. Vanderwell D., Oehlschlager A. C., v knize: *Pheromone Biochemistry* (Blomquist G. J., Prestwich G. D., ed.) str. 175. Academic Press, Orlando 1987.
15. Leal W. S.: Annu. Rev. Entomol. 43, 39 (1998).
16. Seybold S. J., Tittiger C.: Annu. Rev. Entomol. 48, 425 (2003).
17. Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H.: Biochem. J. 295, 517 (1993).
18. Blomquist G. J., Tillman J. A., Mpuru S., v knize: *Pheromone Communication in Social Insect: Ants, Wasp, Bees, Termites* (Vander Meer R. K., Breed M. D., Espelie K. E., Winston M., ed.) str. 34. Westview Press Boulder, Colorado 1998.
19. Blomquist G. J., Dillwith J. W., Adams J. G., v knize: *Pheromone Biochemistry* (Blomquist G. J., Prestwich G. D., ed.), str. 217. Academic Press, Orlando 1987.
20. Tamaki Y., v knize: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Kerkut G. A., Gilbert L. I. ed.) str. 145. Pergamon Press, Oxford 1985.
21. Jurenka R. A., Roelofs W. L., v knize: *Insect Lipids. Chemistry, Biochemistry, and Biology* (Stanley-Samuelson D. W., Nelson D. R., ed.) str. 353. University of Nebraska Press, Lincoln 1993.
22. Raina A. K., Klun J. A.: Science 225, 531 (1984).
23. Fang N., Teal P. E. A., Doolittle R. E., Tumlinson J. H.: Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 39 (1995).
24. Svatoš A., Kalinová B., Boland W.: Insect. Biochem. Mol. Biol. 29, 225 (1999).
25. Hoskovec M., Luxová A., Svatoš A., Boland W.: Tetrahedron 58, 9193 (2002).
26. Fang N., Teal P. E. A., Tumlinson J. H.: Arch. Insect Biochem. Physiol. 29, 243 (1995).
27. Soroker V., Hefetz A.: J. Insect Physiol. 46, 1097 (2000).
28. Plettner E., Slessor K. N., Winston M. L.: Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 31 (1998).
29. Slessor K. N., Kaminski L. A., King G. G., Borden J. H., Winston M. L.: Nature 332, 354 (1988).
30. Luxová A., Valterová I., Stránský K., Hovorka O., Svatoš A.: Chemoecology 13, 81 (2003).

Další citace jsou uvedeny v doprovodném materiálu na webových stránkách našeho časopisu:
<http://chemicke-listy.vscht.cz>

A. Luxová and I. Valterová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Biosynthesis of Insect Pheromones**

The review summarizes recent knowledge on chemical methods used in the research of biosynthetic pathways of insect pheromones. Precursors labelled with stable isotopes (^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{15}N , ^{31}P) or radioactive isotopes (^{14}C , ^3H) are used in different forms and their metabolites are searched for using spectral methods (MS, isotope-ratio-monitoring MS, ^{13}C NMR) or chromatographic methods (radio-HPLC or radio-GC). Specific examples and information are given on the pheromone biosynthesis in the insect genera of cockroaches (Blattodea), beetles (Coleoptera), flies (Diptera), butterflies and moths (Lepidoptera), ants and bees (Hymenoptera).

Další citace vztahující se k metodám výzkumu biosyntézy

- Chase J., Touhara K., Prestwich G. D., Schal C., Blomquist G. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6050 (1992).
- Vanderwel D., Johnston B., Oehlschlager A. C.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 875 (1992).
- Lanne B. S., Ivarsson P., Johnson P., Bergström G., Wassegren A. B.: *Insect Biochem.* 19, 163 (1989).
- Renwick J. A. A., Pitman G. B., Vité J. P.: *Naturwissenschaften* 63, 198 (1976).
- Barkawi L.: Biochemical and molecular studies of bark beetle in the genus *Dendroctonus* (Coleoptera, Scolytidae) PhD. thesis, p. 193, University of Reno, Nevada, 2002.
- Hunt D. W. A., Borden J. H., Pierce H. D., Slessor K. N., King G. G. S., Czyżewska E. K., *J. Chem. Ecol.* 12, 1579 (1986).
- Jones I. F., Berger R. S.: *Environ. Entomol.* 7, 666 (1978).
- Bjostad L. B., Roelofs W. L.: *J. Biol. Chem.* 256, 7936 (1981).
- Teal P. E. A., Tumlinson J. H.: *J. Chem. Ecol.* 12, 353 (1986).
- Morse D., Meighen E.: *Science* 226, 1434 (1984).
- Morse D., Meighen E.: *Insect. Biochem.* 17, 53 (1987).
- Ivarsson P., Birgersson G.: *J. Insect Physiol.* 41, 843 (1995).
- Lu F.: Origin and endocrine regulation of pheromone biosynthesis in the pine bark beetle, PhD. thesis, p. 152, University of Reno, Nevada 1999.
- Byers J. A.: *Insect. Biochem.* 11, 563 (1981).
- Gries G., Smirle M. J., Leufven A., Miller D. R., Borden J. H., Whitney H. S.: *Experientia* 46, 329 (1990).
- Chase J., Jurenka R. A., Schal C., Halamkar P. P., Blomquist G. J.: *Insect Biochem.* 20, 149 (1990).
- Dillwith J. W., Nelson J. H., Pomonis J. G., Nelson D. R., Blomquist G. J.: *J. Biol. Chem.* 257, 11305 (1982).
- Dwyer L. A., Blomquist G. J., Nelson J. H., Pomonis J. G.: *Biochim. Biophys. Acta* 663, 536 (1981).
- Petroski R. J., Bartelt R. J., Weisleder D.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 69 (1994).
- Bjostad L. B., Linn C. E., Du J. W., Roelofs W. L.: *J. Chem. Ecol.* 10, 1309 (1984).
- Tillman J. A., Hobbrook G. L., Dallara P. L., Schal C., Wood D. L., Blomquist G. J., Seybold S. J.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 705 (1998).
- Barkawi L. S., Francke W., Blomquist G. J.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 773 (2003).
- Henzell R. F., Lowe M. D.: *Science* 168, 1005 (1970).
- Byers J. A., Birgersson G.: *Naturwissenschaften* 77, 385 (1990).
- Plettner E., Slessor K. N., Winston M. L., Oliver J. E.: *Science* 271, 1851 (1996).
- Platzner I. T. in: *Modern isotope ratio mass spectrometry*, John Wiley and Sons, West Sussex, England 1997.
- Thompson S. N.: *Insect Biochem.* 20, 223 (1990).
- Chu A. J., Blomquist G. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 304 (1980).
- Blomquist G. J., Chu A. J., Nelson J. H., Pomonis J. G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 648 (1980).
- Halamkar P. P., Nelson J. H., Heisler C. R., Blomquist C. R., Blomquist G. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 526 (1985).
- Seybold S. J., Quilici D. R., Tillman J. A., Vanderwel D., Wood D. L., Blomquist G. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8393 (1995).
- Lahav S., Soroker V., Van der Meer R., Hefety A.: *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43, 203 (1998).
- Fan Y. L., Zurek L., Dykstra M. J., Schal C.: *Naturwissenschaften* 90, 121 (2003).

Další citace vztahující se k biosyntéze feromonů brouků

- Islam N., Bacala R., Moore A., Vanderwel D.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 201 (1999).
- Tumlinson J. H., Klein M. G., Doolittle R. E., Ladd T. L., Proveaux A. T.: *Science* 197, 789 (1977).
- Birgersson G., Byers J. A., Bergström G., Löfqvist J.: *J. Insect Physiol.* 36, 391 (1990).
- Borg-Karlson A. K., Ågren L., Dobson H., Bergström G.: *Experientia* 45, 531 (1988).
- Silverstein R. M., Rodin J. O., Burkholder W. E., Gorman J. E.: *Science*, 157, 85 (1967).
- Insoe M. N., Beroza M. in: *ACS Symposium Series 23, Pest management with Insect Sex Attractant* (Beroza M. Eds) p. 145, American Chemical Society, Washington D.C. 1976.
- Vanderwel D., Pierce H. D., Oehlschlager A. C., Borden J. H., Pierce A. M.: *Insect Biochem.* 20, 567 (1990).
- Zhang Q. H., Tolasch T., Schlyter F.: *J. Chem. Ecol.* 28, 1839 (2002).
- Francke W., Kitching W.: *Curr. Org. Chem.* 5, 233 (2001).
- Fletcher M. T., Wood B. J., Brereton I. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7666 (2002).
- Francke W., Vité J. P.: *Z. Angew. Entomol.* 96, 146 (1983).
- Pierce H. D., Conn J. E., Oehlschlager A. C., Borden J. H.: *J. Chem. Ecol.* 13, 1455 (1987).
- Nebeker T. E., Hodges J. D., Blanche C. E. in: *Beetle Pathogen Interaction in*

- Conifer Forest* (Schowalter T. D., Filip G. M., Eds.) p. 157, Academic Press, London 1993.
- Raffa K. F., Berryman A. A., Simasko J. W., Wong B. L.: *Environ. Entomol.* 14, 552 (1985).
- Birch M. C., Light D. M., Wood D. L., Browne L. E., Silverstein R. M., Bergot B. J., Ohloff G., West J. R., Young J. C.: *J. Chem. Ecol.* 6, 703 (1980).
- Silverstein R. M., Rodin J. O., Wood D. L.: *Science* 154, 509 (1966).
- Renwick J. A. A., Hughes P. R., Krull I. S.: *Science* 191, 199 (1976).
- Byers J. A.: *Science* 220, 624 (1983).
- Lindström M., Norin T., Birgersson G., Schlyter F.: *J. Chem. Ecol.* 15, 541 (1989).
- Hughes P. R., Renwick J. A. A.: *Physiol. Entomol.* 2, 117 (1977).
- Renwick J. A. A., Hughes P. R., Pitman G. B., Vité J. P.: *J. Insect Physiol.* 22, 725 (1976).
- Hall G. M., Tittiger C., Andrews G. L.: *Naturwissenschaften* 89, 79 (2002).
- Martin D., Bohlmann J., Gershenzon J.: *Naturwissenschaften* 90, 173 (2003).
- Rohmer M., Seeman M., Horbach S., Bringer-Mezar S., Sahn H.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2564 (1996).
- Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H. K., Rohmer M.: *Biochem. J.* 316, 73 (1996).
- Schwender J., Zeidler J., Groner R., Müller C., Focke M., Braun S., Lichtenthaler H. K.: *FEBS Letters* 414, 129 (1997).
- Lichtenhaler H. K., Schwender J., Dish A., Rohmer M.: *FEBS Letters* 400, 271 (1997).
- Leal W. S.: *Pure Appl. Chem.* 73, 613 (2001).
- Bartelt R. J., Weisleder D.: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 429 (1996).

Další citace vztahující se k biosyntéze feromonů much

- Dillwith J. W., Blomquist G. J., Nelson D. R.: *Insect Biochem.* 11, 247 (1981).
- Jallon J. M.: *Behav. Genet.* 14, 441 (1984).
- Ferveur J. F., Cobb M., Jallon J. M. in: *Neurobiology of Sensory Systems* (Naresh Singh R., Strausfeld N. J., Eds.) p. 397, Plenum Publishing Corp., New York 1989.
- Ferveur J. F., Cobb M., Oguma Y., Jallon J. M. in: *The Difference Between the Sexes* (Shortland R. V., Balaban E., Eds) p. 363, Cambridge University Press, Cambridge 1994.
- Rogoff W. M., Gretz G. H., Sonnet P. E., Schwarz M.: *Environ. Entomol.* 9, 605 (1980).
- Carlson D. A., Mayer M. S., Silhacek D. L., James J. D., Beroza M., Bieri B. A.: *Science* 201, 750 (1971).
- Uebel E. C., Schwartz M., Lusby W. R., Miller R. W., Sonnet P. E.: *Lloydia* 41, 63 (1978).
- Mpuru S., Reed J. R., Reitz R. C., Blomquist G. J.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 203 (1996).

Další citace vztahující se k biosyntéze feromonů motýlů

- Roelofs W. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 44 (1995).
- Roelofs W. L., Du J.-W., Tang X.-H., Robbins P. S., Eckenrode C. J.: *J. Chem. Ecol.* 11, 829 (1985).
- Roelofs W. L., Wolf W. A.: *J. Chem. Ecol.* 14, 2019 (1988).
- Fang N., Tumlinson J. H., Teal P. E., Oberlander H.: *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 22, 621 (1992).
- Tumlinson J. H., Teal P. E. A., Fang N.: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 451 (1996).
- Tumlinson J. H., Mitchell E. R., Doolittle R. E., Jackson D. M.: *J. Chem. Ecol.* 20, 579 (1994).
- Morse D., Meighen E. A.: *J. Chem. Ecol.* 16, 1485 (1990).
- Roelofs W. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 44 (1995).
- Foster S. P., Roelofs W. L.: *Insect. Biochem.* 18, 281 (1988).
- Foster S. P., Roelofs W. L.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 33, 135 (1996).
- Jurenka R. A.: *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 501 (1997).
- Foster S. P., Roelofs W. L.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 8, 1 (1988).
- Raina A. K., Jaffe H., Klun J. A., Ridgway R. L., Hayes D. K.: *J. Insect Physiol.* 33, 809 (1987).
- Raina A. K., Jaffe H., Kempe T. G., Keim P., Blacher R. W., Fales H. M., Riley C. T., Klun J. A., Ridgway R. L., Hazes D. K.: *Science* 244, 796 (1989).
- Raina A. K., Davis J. C., Stadelbacher E. A.: *Environ. Entomol.* 20, 1451 (1991).
- Tumlinson J. H., Brennan M. M., Doolittle R. E., Mitchell E. R., Brabham A., Mazomenos B. E., Baumhover A. H., Jackson D. M.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10, 2551 (1989).
- Fang N., Tumlinson J. H., Teal P. E. A.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30, 321 (1995).
- Fang N., Teal P. E. A., Tumlinson J. H.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 35 (1995).

Další citace vztahující se k biosyntéze feromonů blanokřídlých

- Röseler P. F.: *Insectes Soc.* 21, 249 (1974).
- Velthuis H. H. W.: *Z. Vergl. Physiol.* 70, 210 (1970).
- Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A., Tornback B.: *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.* 88, 631 (1987).

ENDOKANABINOIDY

ZDENĚK FIŠAR

Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 11, 120 00 Praha 2
zfishar@lf1.cuni.cz

Došlo 6.4.05, přijato 12.11.05.

Klíčová slova: kanabinoidy, anandamid, membrány, arachidonová kyselina

Obsah

1. Úvod
2. Endogenní kanabinoidy
3. Mechanismy působení
4. Biosyntéza a inaktivace endokanabinoidů
5. Buněčné membrány a kanabinoidy
6. Vztah struktury a aktivity kanabinoidů
7. Závěry

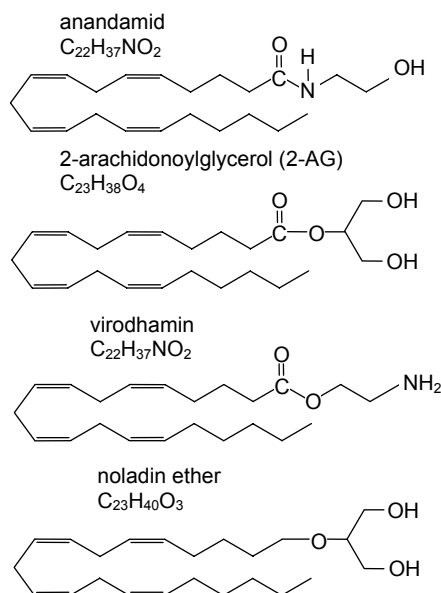
1. Úvod

Objev endogenních kanabinoidů a studium fyziologických funkcí kanabinoidního systému v mozku přinesl řadu důležitých poznatků o úloze membránových lipidů a mastných kyselin v přenosu nervového signálu. Specifické účinky kanabinoidů jsou zajištěny aktivací kanabinoidních receptorů, avšak díky lipofilnímu charakteru těchto látek může být řada jejich účinků zprostředkována i nerekceptorovými mechanismy, např. přes změnu vlastností lipidových částí buněčných membrán. Úlohu lipidových dvojvrstev v aktivitě kanabinoidního systému dokládá i skutečnost, že *i)* zdrojem a zásobárnou endogenních kanabinoidů jsou membránové lipidy a *ii)* hlavní endogenní kanabinoidy jsou odvozeny od kyseliny arachidonové, která je významnou složkou membránových lipidů. Vztah struktury a funkce rostlinných, endogenních nebo syntetických kanabinoidů a dalších molekul ovlivňujících kanabinoidní systém v mozku (inhibitorů membránových kanabinoidních přenašečů nebo enzymů katabolizujících kanabinoidy) je intenzivně studován s cílem nalézt léčiva, která by měla terapeutické účinky připisované fytokanabinoidům, aniž by vykazovala jejich současné negativní účinky na kognitivní funkce uživatele.

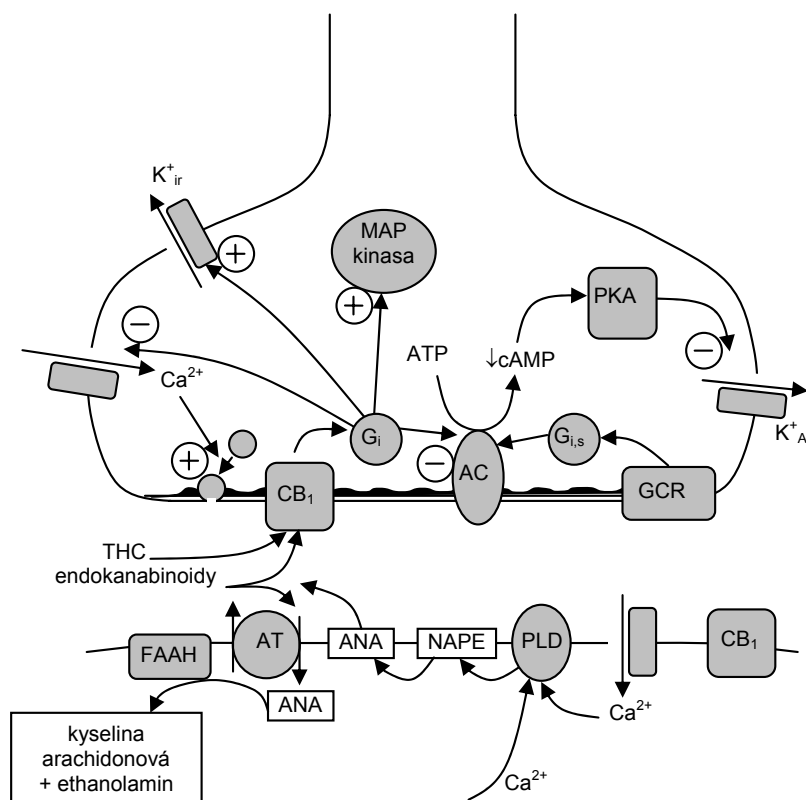
2. Endogenní kanabinoidy

Endogenními ligandy kanabinoidních receptorů (endokanabinoidy) jsou např. anandamid (*N*-arachidonylethanolamid), *sn*-2-arachidonoylglycerol (2-AG), noladin ether (2-arachidonoylglycerylether), virodhamin (*O*-arachidonylethanolamin), *N*-arachidonoyldopamin a snad i *N*-palmitoylethanolamid, oleamid a další^{1–7} (obr. 1). Endokanabinoidy jsou v mozku široce distribuovány a jsou syntetizovány a uvolňovány při stimulaci neuronů. Z mimobuněčného prostoru jsou odstraňovány selektivním saturačním systémem zpětného vychytávání a poté jsou nitrobuněčně hydrolyzovány (anandamid pravděpodobně na kyselinu arachidonovou a ethanolamin) hydrolasou amidu mastných kyselin (FAAH).

Anandamid vykazuje výrazně vyšší afinitu pro kanabinoidní receptor CB₁ (89 nmol l⁻¹) než pro receptor CB₂ (371 nmol l⁻¹)⁸. 2-AG má rovněž vyšší afinitu k CB₁ (472 nmol l⁻¹) než k CB₂ (1400 nmol l⁻¹) receptoru³. 2-AG soutěží s anandamidem o „uptake“ anandamidovým přenašečem. Enzym FAAH hydrolyzuje 2-AG čtyřikrát rychleji než anandamid. Identifikace palmitoylethanolamidu nebo oleamidu jako endogenních kanabinoidů je dosud sporná.



Obr. 1. Endogenní kanabinoidy

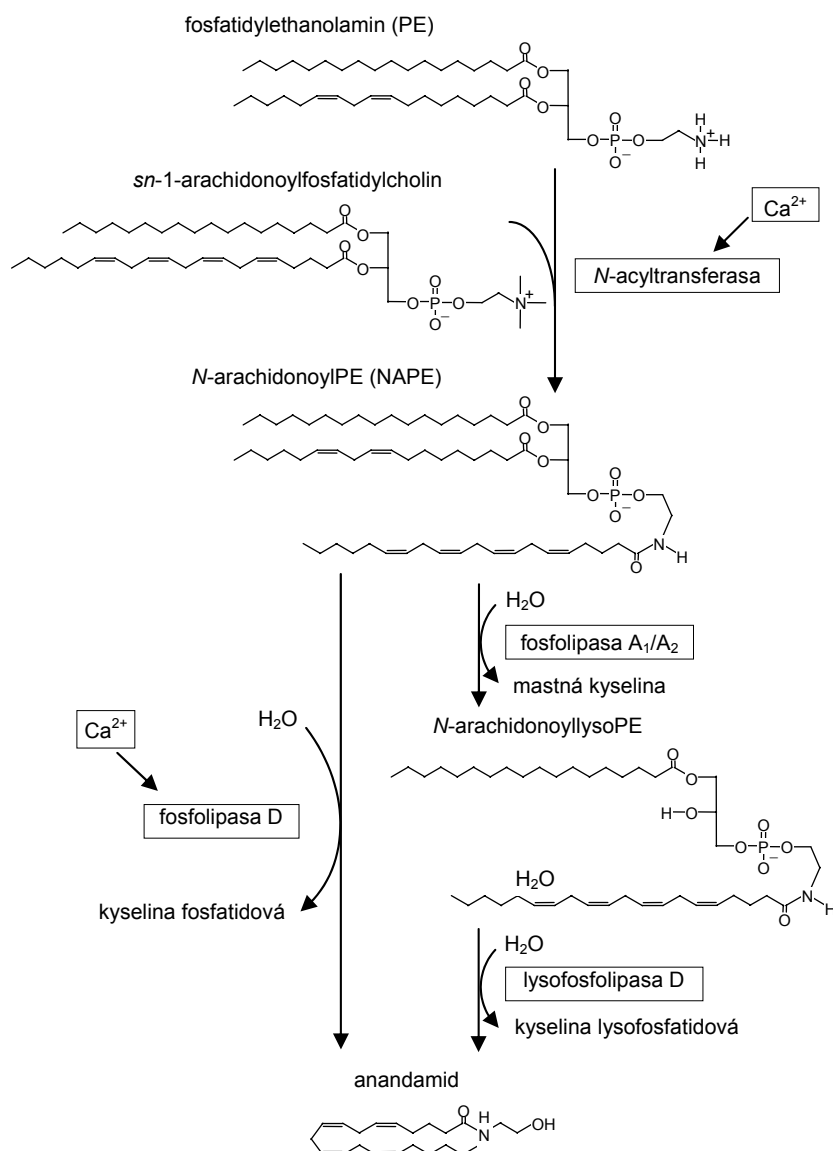


Obr. 2. **Mechanismy působení kanabinoidů**; pro syntézu endokanabinoidů je potřebné velké přechodné zvýšení nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} , kterého je dosaženo uvolněním Ca^{2+} z nitrobuňkových zásob (aktivací inositol-1,4,5-trifosfátového systému) nebo vstupem Ca^{2+} přes napětově řízené iontové kanály nebo přes interní iontové kanály aktivovaných receptorů. Může dojít ke stimulaci fosfolipasy, přičemž fosfolipasa D (PLD) katalyzuje hydrolýzu *N*-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (NAPE) a vzniká anandamid (ANA). Fosfolipasa C katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerollipasa potom katalyzuje vznik 2-arachidonoylglycerolu (není zobrazeno). Nově vytvořené endogenní kanabinoidy nebo externě dodané tetrahydrokanabinoly (THC) aktivují kanabinoidní receptory CB_1 lokalizované v presynaptické nebo postsynaptické membráně. Anandamid je z mimobuňkového prostředí odstraňován specifickým membránovým přenašečem (AT) a poté je v buňce hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a ethanolamin pomocí membránového enzymu, hydrolasy amidu mastných kyselin (FAAH). AT může přenášet i 2-arachidonoylglycerol, který je potom pomocí lipasy hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a glycerol (není zobrazeno). Aktivace CB_1 receptoru v presynaptickém nervovém zakončení aktivuje G proteiny, které stimulují mitogenem aktivovanou proteinkinasu (MAP kinasu) a inhibují adenylylcyklastu (AC), čímž se snižuje tvorba cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Dále G proteiny aktivované CB_1 receptorem inhibují napětově řízené kalciové kanály a stimulují určité draslíkové kanály (GIRK). Inhibice vstupu kalcia do presynaptického zakončení vede ke sníženému uvolňování různých neurotransmiterů. Snížení koncentrace cAMP vede ke snížené aktivitě proteinkinasy typu A (PKA), což způsobuje mimo jiné i menší fosforylaci draselných kanálů typu A a tím další zvýšení výstupu draslíkových iontů. Aktivaci CB_1 receptoru může být ovlivněna funkce řady dalších presynaptických receptorů napojených na G proteiny (GCR) a aktivujících či inhibujících AC

3. Mechanismy působení

Endokanabinoidy jsou lipofilní signální molekuly syntetizované *de novo* z membránových fosfolipidů v odezvě na postsynaptickou depolarizaci nebo aktivaci metabotropních glutamátových receptorů. V posledních letech bylo potvrzeno, že endokanabinoidy zprostředkují zpětný signál od postsynaptických neuronů k presynaptickým (obr. 2), tj. indukované uvolňování řady neurotransmiterů v mozku může být inhibováno aktivací presy-

naptických CB_1 receptorů lokalizovaných na různých typech nervových zakončení v mozku^{4,9,10}. Inhibice endokanabinoidy trvá až desítky sekund¹¹, tedy mnohem déle než např. inhibice vyvolaná uvolněním GABA a mnohem kratší dobu než je potřebná pro změnu synaptické síly vyvolanou nějakou formou synaptické plasticity. Fyziologická funkce kanabinoidního systému je velmi komplexní a zahrnuje motorickou koordinaci, paměť, chuť k jídlu, modulaci bolesti a neuroprotektci. Do těchto procesů jsou pravděpodobně zapojeny další podtypy kanabinoidních receptorů a kapsaicinové (vaniloidní) receptory.



Obr. 3. Biosyntéza anandamidu

Řadu farmakologických účinků kanabinoidů lze vysvětlit jejich interakcemi s neuromodulátory a neurotransmiterovými systémy; inhibice uvolňování neurotransmiterů agonisty CB_1 receptorů byla popsána pro acetylcholin, dopamin, kyselinu γ -aminomáselnou, histamin, serotonin, glutamát, noradrenalin, prostaglandiny a opioidní peptidy. Při interpretaci účinků kanabinoidů je však nutno mít na vědomí skutečnost, že inhibice uvolňování neurotransmiterů neznamena obecně snížení neuronální aktivity, neboť některé neurotransmitery aktivují i receptory inhibující přenos signálu. Za nejvýznamnější pro vznik efektu odměny, tolerance a fyzické závislosti na kanabinoidech jsou pravděpodobně odpovědné funkční interakce

kanabinoidního systému s dopaminergními a opioidními systémy¹². Většina účinků kanabinoidů je zprostředkována kanabinoidními receptory v CNS¹⁰, ale jsou známy i také jejich účinky, které jsou alespoň částečně nezávislé na receptorech, např. neuroprotektivní účinky při ischemii a hypoxii¹³. Předpokládá se proto, že některá působení endogenních kanabinoidů jsou zprostředkována jejich metabolity nebo přes nerekceptorové mechanismy¹⁴.

4. Biosyntéza a inaktivace endokanabinoidů

Anandamid, 2-AG a některé další endogenní kanabinoidy (obr. 1) jsou odvozeny od kyseliny arachidonové

(kyselina 5,8,11,14-ikosatetraenová, 20:4), která je jednou z nenasycených mastných kyselin obsažených ve fosfolipidech buněčných membrán. Kyselina arachidonová je nenasycená C_{20} mastná kyselina se čtyřmi dvojnými vazbami (nekonjugovanými); dvojná vazba na uhlíku C_{14} je vzdálena od koncového uhlíku o 6 uhlíkových atomů (jedná se o $n-6$ mastnou kyselinu). U lidí je kyselina arachidonová prekurzorem prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů a leukotrienů¹⁵. V mozku tvoří arachidonát až 10 % z celkových mastných kyselin. Arachidonát je v membránách ukládán a esterově vázán především ke glycerolovému uhlíku C_2 (*sn-2*) ve fosfolipidech a uvolňován je i) hydrolýzou těchto molekul fosfolipasou A_2 , ii) kombinovaným postupným působením fosfolipasy C, diacylglycerolkinasy a fosfolipasy A_2 , iii) hydrolýzou diacylglycerolipasou. Většina arachidonátu je inkorporována ve fosfatidylcholinu, fosfatidylinositolu a fosfatidylethanolaminu (PE).

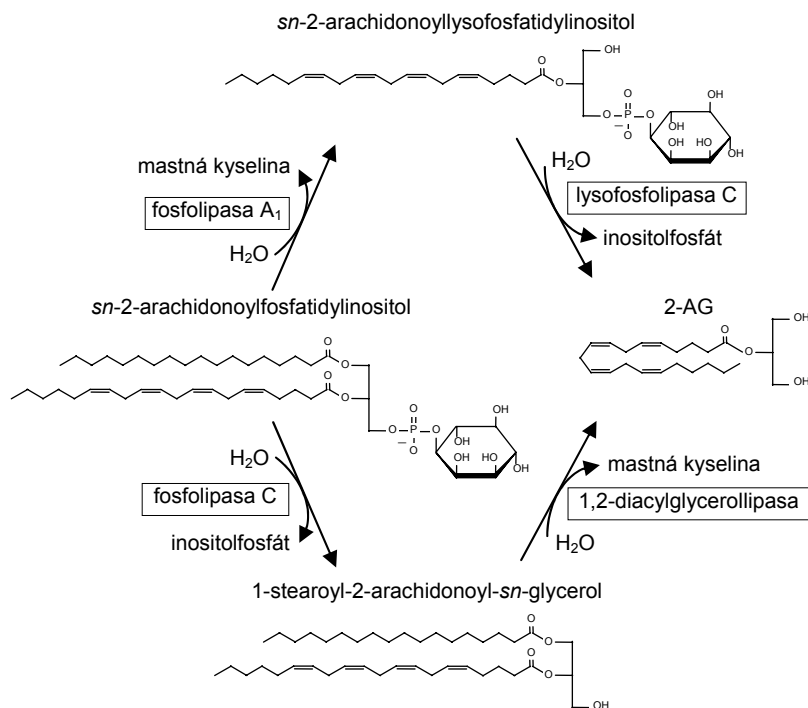
Anandamid i 2-AG nejsou zřejmě syntetizovány do zásoby, ale na požadavek, v odezvě na postsynaptickou depolarizaci nebo aktivaci receptorů^{11,16}. Jejich syntéza není dosud zcela známa, zdá se však, že anandamid může být v membránách uložen jako *N*-arachidonoylfosfatidylethanolamin (NAPE), tj. esterifikován na třetím uhlíku *sn*-glycerol-3-fosfátu¹⁷. Tento prekurzor anandamidu tvoří pouze asi 0,1 % ze všech *N*-acylethanolaminových fosfolipidů v neuronech¹⁸. Předpokládá se, že anandamid je z NAPE uvolňován přímo pomocí fosfolipasy D (PLD). Nově je studována i druhá možná cesta uvolňování anan-

damidu z NAPE (cit.¹⁹), a to jeho hydrolýzou fosfolipasou A_1 (PLA_1) nebo A_2 (PLA_2) na *N*-arachidonoyllysofosfatidylethanolamin s následným uvolněním anandamidu lysofosfolipasou D (obr. 3).

Obecně se předpokládá, že v mozku, stejně jako v jiných tkáních, je arachidonát esterifikován hlavně na *sn-2* pozici fosfolipidů se zbytky nasycených nebo mononenasycených mastných kyselin, jako je kyselina olejová (18:1), palmitová (16:0) nebo stearová (18:0), na pozici *sn-1* (cit.²⁰). To je v určitém rozporu se substrátovou specificitou *N*-acyltransferasy, která v mozku katalyzuje biosyntézu NAPE přenosem arachidonátové skupiny z *sn-1* uhlíku fosfolipidů na aminoskupinu PE (obr. 3). Bylo potvrzeno, že *sn-1* arachidonoylfosfolipidy jsou v mozku skutečně přítomny^{17,21} a tvoří cca 0,5 % celkových fosfolipidů.

Jak tvorba anandamidu, tak syntéza NAPE mohou probíhat paralelně a jsou spouštěny zvýšením nitrobuněčného Ca^{2+} . Při vysokých (nefyziologických) koncentracích arachidonátu a ethanolaminu je možná i přímá syntéza anandamidu katalyzovaná FAAH; tato syntéza zřejmě nemá význam ve fyziologické tvorbě anandamidu.

Rovněž biosyntéza 2-AG je v mozku vyvolána neuronální aktivitou provázenou zvýšením nitrobuněčných koncentrací Ca^{2+} . Na rozdíl od anandamidu, je v syntéze 2-AG zahrnuta stejná kaskáda enzymů jako při tvorbě druhých posílů – inositol-1,3,5-trifosfátu a 1,2-diacylglycerolu. 2-AG může vznikat z diacylglycerolu po hydrolýze membránových lipidů obsahujících zbytky kyseliny arachidonové.



Obr. 4. Biosyntéza 2-arachidonoylglycerolu (2-AG)

Hlavními zdroji 2-AG jsou pravděpodobně inositolové fosfolipidy nebo kyseliny fosfatidové. Rovněž 2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-fosfát, který tvoří významnou část (5,4 %) lysofosfatidových kyselin vyskytujících se v mozku, může být specifickou fosfatase²² defosforylován na 2-AG a obráceně 2-AG může být pomocí monoacylglycerolkinyasy konvertován na 2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-fosfát (cit.²³). Předpokládá se proto, že biosyntéza 2-AG je možná dvěma hlavními cestami⁷ (obr. 4):

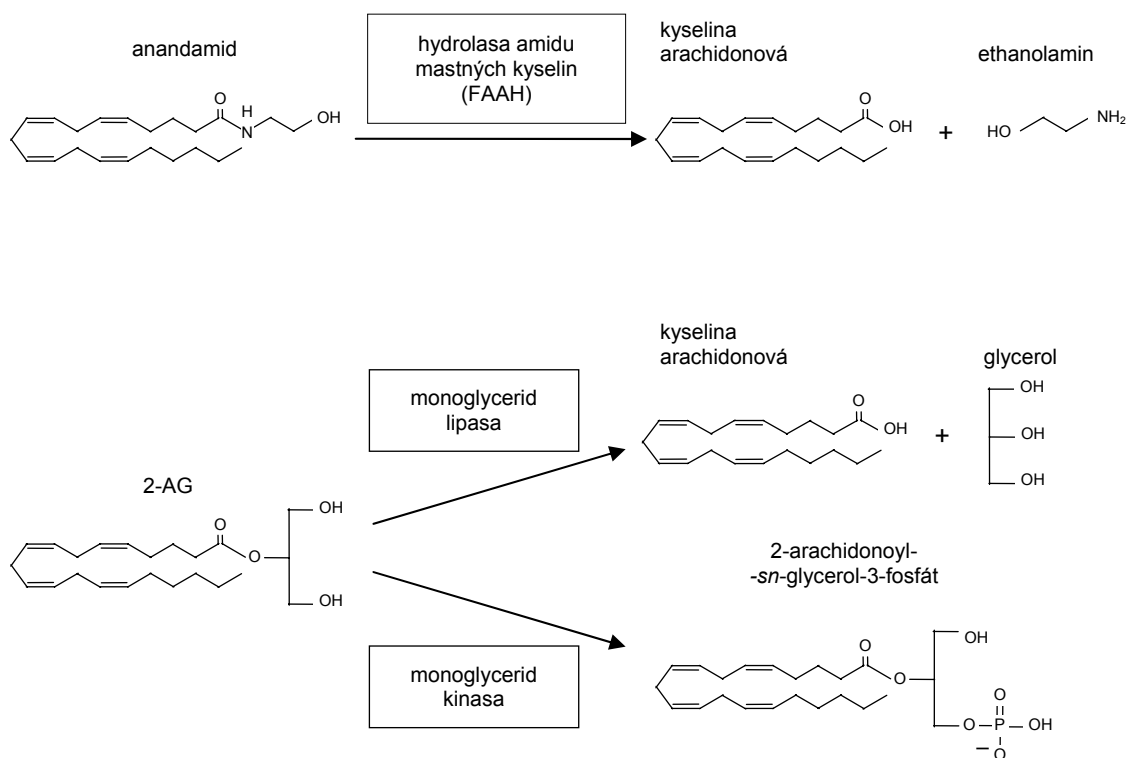
1. hydrolýzou membránových fosfolipidů pomocí aktivované fosfolipasy C (PLC) je produkován diacylglycerol (obvykle 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol), který je poté konvertován na 2-AG pomocí 1,2-diacylglycerollipasy;
2. fosfolipasa A₁ (PLA₁) produkuje lysofosfolipid, který může být dále hydrolyzován:
 - a) na 2-AG pomocí lysofosfolipasy C,
 - b) na kyselinu lysofosfatidovou pomocí lysofosfolipasy D a poté defosforylován na 2-AG.

Podobně jako jiné neurotransmitery jsou endokanabinoidy po jejich tvorbě a uvolnění rychle inaktivovány (obr. 5). Anandamid je transportován zpět do neuronů a glií pomocí specifického přenašečového systému a poté je hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a ethanolamin pomocí FAAH nebo jiných nitrobuněčných amidasových

enzymů. 2-AG je transportován do buněk podobným mechanismem jako anandamid. Předpoklad, že FAAH je odpovědný i za eliminaci 2-AG, vycházející ze skutečnosti, že FAAH katalyzuje hydrolýzu 2-AG *in vitro*, se nepotvrdil. Za hydrolýzu 2-AG v mozku je zřejmě odpovědná monoacylglycerollipasa, která konvertuje 2- a 1-mono-glyceridy na mastnou kyselinu a glycerol²⁴. Podobný mechanismus inaktivace je již dlouho znám pro monoaminové neurotransmitery, jako je serotonin, noradrenalin nebo dopamin, které jsou metabolizovány pomocí nitrobuněčné monoaminoxidasy a dovnitř buňky jsou rovněž transportovány specifickými přenašeči. Je proto možné, že podobně jako jsou některá antidepresiva inhibitory monoaminoxidasy nebo inhibitory zpětného vychytávání (reuptake) serotoninu nebo noradrenalinu, mohly by být i FAAH (cit.²⁵) nebo přenašeč pro kanabinoidy cílovými místy primárních účinků léků zasahujících do kanabinoidního systému v mozku.

5. Buněčné membrány a kanabinoidy

Kanabinoidy jsou látky, které se podobně jako řada dalších lipofilních molekul vážou (adsorbují) do lipidové dvojvrstvy²⁶. Není známo, zda jejich akumulace v lipidové



Obr. 5. Katabolismus endokanabinoidů

části biologických membrán je či není vztažena k některým vedlejším účinkům jejich užívání. Je však známo, že interakce protein-lipid-lipofilní molekula mohou ovlivnit funkci mnoha membránových systémů podílejících se na buněčných funkcích^{27,28}, včetně přenosu nervového signálu. I když membránové lipidy nejsou specifickými cílovými molekulami kanabinoidů, mohou hrát v mechanismech jejich účinků významnou roli a to nejen jako zdroje endogenních kanabinoidů, ale i jako molekuly vytvářející heterogenní prostředí určující farmakokinetiku kanabinoidů a umožňující či modulující interakce kanabinoidů se specifickými vazebnými místy. Lipofilní charakter agonistů a antagonistů kanabinoidních receptorů svědčí pro to, že specifické vazebné místo na jejich receptoru může být ukryto v hydrofobním vnitřku membrány.

Biologické membrány jsou komplexní systémy, které lze schematicky pojímat jako lipidové dvojvrstvy tvořící základ pro distribuci a funkci integrálních nebo periferních (adsorbovaných) proteinů, které uskutečňují řadu specifických membránových procesů. Umožňují udržování iontových a metabolických gradientů nezbytných pro většinu buněčných funkcí, včetně přenosu nervového signálu. Hlavními lipidovými složkami buněčných membrán jsou glycerofosfolipidy, jejichž základem je *sn*-glycerol-3-fosfát esterifikovaný na uhlících C₁ (*sn*-1) a C₂ (*sn*-2) mastnými kyselinami a na fosforylové skupině další skupinou. V mozku se hojně vyskytují i sfingolipidy, především sfingomyeliny a galaktocerebrosidy. Významnou složkou plasmatických membrán je také cholesterol. Membránové lipidy tvoří jen strukturní základ membrány, ale jsou také substráty fosfolipas a modulatory funkce řady membránových proteinů. Např. transportní mechanismy zahrnující receptory, iontové kanály, enzymy, přenašeče a pumpy jsou často regulovány membránovými lipidy a cholesterolem, samotnými i uspořádanými do lipidové dvojvrstvy^{29–33}. Celkově lze říci, že lipidové dvojvrstvy jsou heterogenní v horizontálním i vertikálním směru a úloha membránových lipidů a mastných kyselin v buněčných funkcích není zdaleka poznána. Rovněž existence a úloha hustotních fluktuací nebo oblastí s nenáhodným lipidovým složením (domény, rafty) je teprve studována^{34,35}.

Polární hlavičky membránových lipidů jsou obvykle tvořeny záporně nabitou fosfátovou skupinou s navázanými kladnými, zápornými, zwiterionickými nebo nenabítenými skupinami. Specifické ovlivnění funkcí membránových proteinů těmito polárními hlavičkami lze vysvětlit na základě elektrostatických interakcí, jejichž specifita je dána prostorovým rozložením náboje jak na povrchu proteinu, tak v polárních hlavičkách interagujících lipidů. Obtížnější je vysvětlit vysoké variability v délce a nasycenosti acylových řetězců, protože pro udržení struktury, uspořádanosti a určité fluidity lipidové dvojvrstvy není tato různorodost nezbytná. Pravděpodobným vysvětlením je možnost přizpůsobení se tvaru acylových řetězců hydrofobnímu povrchu membránových proteinů („hydrophobic matching“), což umožňuje specificky ovlivňovat vlastnosti proteinů³⁶. Proteiny vázající fosfolipidy jsou důležitou

složkou přenosu signálů, přenosu molekul a buněčného metabolismu³⁷. Uhlovodíkové řetězce lipidů vázajících se k proteinům jsou v oblasti proteinových vazebných míst dokonce více konformačně neuspořádané, než je tomu ve fluidní dvojvrstvě membrány³⁸.

Saturované a mononenasyčené mastné kyseliny mohou být syntetizovány v těle *de novo*, avšak esenciální polynenasycené mastné kyseliny jsou syntetizovány z potravních prekurzorů, linolové kyseliny (18:2) pro n-6 skupinu a α -linolenové kyseliny (18:3) pro n-3 skupinu mastných kyselin. V neuronech se vyskytují především arachidonová kyselina (20:4, n-6) a dokosaheksaenová kyselina (22:6, n-3) vázané v pozici *sn*-2 glycerolového základu fosfolipidů. Jak bylo uvedeno výše, je pro biosyntézu anandamidu důležitá vazba arachidonátu v pozici *sn*-1 fosfolipidů, která není častá, ale je postačující pro tvorbu tohoto endokanabinoidu.

Mimobuněčné, membránové i nitrobuněčné esenciální mastné kyseliny a jejich metabolity mohou ovlivňovat řadu dějů vztažených k transdukcí signálu, genové expresi, růstu či smrti buněk, motilitě a adhezi¹⁵. Z hlediska psychotropních účinků endogenních kanabinoidů (derivátů arachidonové kyseliny), je zajímavé, že úloha esenciálních nenasycených mastných kyselin je již dlouho diskutována v některých biochemických hypotézách afektivních poruch a schizofrenie. Tyto hypotézy vycházejí z předpokladu, že pro normální vývoj a funkci mozkových struktur je nezbytný normální neuronální fosfolipidový metabolismus. Ke vzniku příznaků schizofrenie potom může docházet např. v důsledku zvýšené rychlosti eliminace arachidonové a dokosaheksaenové kyseliny z neuronů³⁹. Membránové hypotézy afektivních poruch zase předpokládají, že zvýšený poměr mezi příjmem n-6 a n-3 esenciálních mastných kyselin může vést ke zvýšené náchylnosti ke vzniku deprese⁴⁰.

6. Vztah struktury a aktivity kanabinoidů

Specifitu interakcí kanabinoid-protein zajišťují mnohonásobné nekovalentní vazby mezi polárními a hydrofobními skupinami těchto molekul vyžadující vhodné prostorové uspořádání proteinového vazebného místa a molekuly kanabinoidu. Na nespecifické vazbě kanabinoidů do lipidové části buněčných membrán, tj. na interakcích kanabinoid-lipid, se podílí především hydrofobní efekt (při inkorporaci do membrány) a krátkodosahové van der Waalsovy síly (při interakcích se zbytky mastných kyselin v hydrofobním vnitřku dvojvrstvy).

Celkový tvar molekul endogenních kanabinoidů, podobně jako tvar molekul membránových lipidů, je určen hlavně konformací jejich uhlovodíkových řetězců. Změny prostorového uspořádání jsou přitom umožněny relativně volnými rotacemi kolem jednoduchých vazeb C–C. Dvojně vazby nenasycených mastných kyselin mají *cis* (Z) konfiguraci, což způsobuje rigidní ohyb o 30° v uhlovodíkovém řetězci. Větší zastoupení dvojných vazeb potom vede k velmi složitým tvarům molekul. Vztah

struktury a aktivity anandamidu i jiných kanabinoidů je v současné době intenzivně studován s cílem určit strukturní požadavky pro syntetické agonisty a antagonisty kanabinoidních receptorů a pro substráty či inhibitory FAAH a anandamidového přenašeče^{41,42}.

Významným rysem acylového řetězce arachidonové kyseliny je velká torzní pohyblivost umožněná skutečností, že *cis* dvojné vazby jsou odděleny jednou methylenovou skupinou, což dává těmto řetězcům větší flexibilitu ve srovnání s jinými nenasyčenými acylovými řetězci⁴³. Arachidonová kyselina se proto může vyskytovat v mnoha konformacích, z nichž čtyři se vyskytují nejčastěji: *i*) protažená, *ii*) U-tvar, *iii*) J-tvar a *iv*) spirálová. Ve vodě minimalizuje arachidonová kyselina expozici svých hydrofobních částí tím, že tvoří kompaktnější U-tvar⁴⁴. Podobně jako arachidonová kyselina, i anandamid se ve vodním prostředí vyskytuje v řadě různých konformací, přičemž převažují smíšené konformace protaženého tvaru a U-tvaru. Rovněž pro 2-AG ve vodním prostředí převažují struktury typu U-tvar. V nepolárním prostředí se vyskytuje protažený tvar i U-tvar. Protažený tvar a složený tvar (U-tvar) molekul anandamidu, 2-AG nebo arachidonátu jsou schematicky znázorněny na obr. 3, 4, 5.

Bylo potvrzeno, že pro vysokou afinitu vazby anandamidu k CB₁ receptoru je nezbytná přítomnost karbonylové skupiny v hlavičkové skupině anandamidu⁴⁵, oproti tomu hydroxylová skupina není pro receptorovou interakci významná. Vysokoafinní vazba dále vyžaduje vysokou flexibilitu acylového řetězce anandamidu, neboť pouze jeho analogy s třemi a více dvojnými vazbami vykazují vysokou afinitu k CB₁. Předpokládá se, že pro interakci anandamidu s CB₁ receptorem je potřebná jeho složená (zahnutá) konformace. Tuto hypotézu podporuje i porovnání možných tvarů molekuly anandamidu s tvarem molekuly Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC), kdy k dobrým překryvům molekulových objemů dochází pro složené konformace anandamidu (především U-tvar)^{46,47}. Lze tak vysvětlit skutečnost, že molekuly tak odlišné jako jsou endogenní kanabinoidy a Δ^9 -THC, aktivují stejné receptory. Podobně jako u anandamidu, rovněž ve struktuře Δ^9 -THC bylo identifikováno více skupin ovlivňujících aktivaci kanabinoidních receptorů, především fenolický hydroxyl, boční řetězec a methylové skupiny⁴⁸. Nezbytnou součástí kanabinoidního farmakoforu je také dostatečná délka satureovaného zbytku acylového řetězce. Dosavadní výsledky také ukazují, že CB₁ receptor, FAAH a anandamidový přenašeč mají poněkud odlišné požadavky pro vysokoafinní vazbu.

Předpokládá se, že *i*) některá onemocnění mohou být podmíněna nedostatečnou funkcí endokanabinoidního systému⁴⁹, *ii*) kanabinoidy mohou vykazovat terapeutické účinky v léčbě některých nemocí. Vztah struktury a funkce kanabinoidů a dalších molekul ovlivňujících kanabinoidní systém v mozku je proto intenzivně studován s cílem nalézt léčiva, která by měla terapeutické účinky připisované fyto-kanabinoidům^{50,51}, aniž by vykazovala současné negativní účinky na kognitivní funkce uživatele. Kromě agonistů a antagonistů CB₁ receptorů se jedná především o inhi-

bitory membránového anandamidového přenašeče nebo inhibitory enzymů katabolizujících kanabinoidy.

7. Závěry

Hlavní účinky kanabinoidů na centrální nervový systém jsou zprostředkovány kanabinoidními receptory CB₁. Endogenními agonisty těchto receptorů v mozku jsou především anandamid a 2-AG, které inhibují uvolňování různých neurotransmiterů z presynaptických zakončení. Vzhledem k lipofilním vlastnostem kanabinoidů dochází k jejich akumulaci v lipidové části buněčných membrán a k možnosti obsazovat vazebná místa lokalizovaná na hydrofobních částech integrálních proteinů. Je tak umožněno i nespecifické ovlivňování funkce nerekceptorových membránových proteinů, které se však na přenosu signálu podílejí. Ovlivněna může být rovněž funkce lipidové části buněčných membrán a úloha esenciálních mastných kyselin. Spektrum možných změn v kanabinoidním systému po dlouhodobém užívání kanabinoidů je tedy velmi široké a dosud málo známé; jejich pochopení souvisí s pokroky v poznání normálních buněčných funkcí, především v oblasti účinků endogenních kanabinoidů.

Hlavní endogenní kanabinoidy jsou odvozeny od arachidonové kyseliny, která je jednou z nejvýznamnějších nenasyčených mastných kyselin v mozku. Variabilita tvaru arachidonátu a tedy i acylového řetězce anandamidu či 2-AG je nezbytná pro aktivaci kanabinoidního receptoru a umožňuje přijmout molekulám endogenních kanabinoidů podobný tvar, jako mají mnohem rigidnější tetrahydrokanabinoly. Lze tak vysvětlit skutečnost, že endokanabinoidy a Δ^9 -THC aktivují stejné receptory. Poznání vztahu struktury a funkce kanabinoidů může pomoci při hledání látek působících terapeuticky u řady onemocnění, včetně poruch vyvolaných klinickou nedostatečností endokanabinoidního systému.

Tato práce vznikla s podporou grantu IGA MZ ČR č. NR8408-3/2005.

LITERATURA

1. Devane W. A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.: *Science* 258, 1946 (1992).
2. Hanuš L., Gopher A., Almog S., Mechoulam R.: *J. Med. Chem.* 36, 3032 (1993).
3. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanuš L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., Pertwee R. G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z.: *Biochem. Pharmacol.* 50, 83 (1995).
4. Barg J., Frider E., Hanuš L., Levy R., Matus-Leibovitch N., Heldman E., Bayewitch M., Mechoulam R., Vogel Z.: *Eur. J. Pharmacol.* 287, 145 (1995).

5. Mechoulam R., Fride E., Hanuš L., Sheskin T., Bisogno T., Di Marzo V., Bayewitch M., Vogel Z.: *Nature* 389, 25 (1997).
6. Hanuš L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I., Mechoulam R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3662 (2001).
7. Freund T. F., Katona I., Piomelli D.: *Physiol. Rev.* 83, 1017 (2003).
8. Showalter V. M., Compton D. R., Martin B. R., Abood M. E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 989 (1996).
9. Maejima T., Ohno-Shosaku T., Kano M.: *Neurosci. Res.* 40, 205 (2001).
10. Howlett A. C., Breivogel C. S., Childers S. R., Deadwyler S. A., Hampson R. E., Porrino L. J.: *Neuropharmacology* 47, 345 (2004).
11. Kreitzer A. C., Regehr W. G.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 324 (2002).
12. Tanda G., Goldberg S. R.: *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 115 (2003).
13. Hampson A., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 9. The Haworth Integrative Healing Press, New York 2002.
14. Adams I. B., Compton D. R., Martin B. R.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 1209 (1998).
15. Jiang W. G., Bryce R. P., Horrobin D. F.: *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 27, 179 (1998).
16. Varma N., Carlson G. C., Ledent C., Alger B. E.: *J. Neurosci.* 21:RC188, 1 (2001).
17. Cadas H., di Tomaso E., Piomelli D.: *J. Neurosci.* 17, 1226 (1997).
18. Hansen H. H., Hansen S. H., Schousboe A., Hansen H. S.: *J. Neurochem.* 75, 861 (2000).
19. Sun Y.-X., Tsuboi K., Okamoto Y., Tonai T., Murakami M., Kudo I., Ueda N.: *Biochem. J.* 380, 749 (2004).
20. Shetty H. U., Smith Q. R., Washizaki K., Rapoport S. I., Purdon A. D.: *J. Neurochem.* 67, 1702 (1996).
21. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y., Waku K.: *Eur. J. Biochem.* 240, 53 (1996).
22. Hiroshima M., Takenawa T.: *Biochem. J.* 336, 483 (1998).
23. Nakane S., Oka S., Arai S., Waku K., Ishima Y., Tokumura A., Sugiura T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 402, 51 (2002).
24. Dinh T. P., Freund T. F., Piomelli D.: *Chem. Phys. Lipids* 121, 149 (2002).
25. Cravatt B. F., Lichtman A. H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 469 (2003).
26. Herbette L. G., Chester D. W., Rhodes D. G.: *Biophys. J.* 49, 91 (1986).
27. Mason R. P., Rhodes D. G., Herbette L. G.: *J. Med. Chem.* 34, 869 (1991).
28. Seydel J. K., Velasco M. A., Coats E. A., Cordes H. P., Kunz B., Wiese M.: *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 205 (1992).
29. Shinitzky M., v knize: *Membrane Fluidity* (Kates M., Manson L. A., ed.), str. 585. Plenum Publ. Corp., New York 1984.
30. Srivastava L. K., Kazmi S. M., Blume A. J., Mishra R. K.: *Biochim. Biophys. Acta* 900, 175 (1987).
31. Scanlon S. M., Williams D. C., Schloss P.: *Biochemistry* 40, 10507 (2001).
32. Cornelius F.: *Biochemistry* 40, 8842 (2001).
33. Lee A. G.: *Biochim. Biophys. Acta* 1612, 1 (2003).
34. Barenholz Y.: *Prog. Lipid Res.* 41, 1 (2002).
35. Fielding C. J., Fielding P. E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 219 (2003).
36. Dumas F., Lebrun M. C., Tocanne J.-F.: *FEBS Lett.* 458, 271 (1999).
37. Hurley J. H., Tsujishita Y., Pearson M. A.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 737 (2000).
38. Marsh D.: *Protein Sci.* 12, 2109 (2003).
39. Horrobin D. F.: *Schizophr. Res.* 30, 193 (1998).
40. Hibbeln J. R., Salem N. Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1 (1995).
41. Sheskin T., Hanuš L., Slager J., Vogel Z., Mechoulam R.: *J. Med. Chem.* 40, 659 (1997).
42. Reggio P. H., Traore H.: *Chem. Phys. Lipids* 108, 15 (2000).
43. Rabinovich A. L., Ripatti P. O.: *Biochim. Biophys. Acta* 1085, 53 (1991).
44. Barnett-Norris J., Guarnieri F., Hurst D. P., Reggio P. H.: *J. Med. Chem.* 41, 4861 (1998).
45. Berglund B. A., Boring D. L., Wilken G. H., Makriyannis A., Howlett A. C., Lin S.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 59, 111 (1998).
46. Thomas B. F., Adams I. B., Mascarella S. W., Martin B. R., Razdan R. K.: *J. Med. Chem.* 39, 471 (1996).
47. Tong W., Collantes E. R., Welsh W. J., Berglund B. A., Howlett A. C.: *J. Med. Chem.* 41, 4207 (1998).
48. Iversen L. L., v knize: *The Science of Marijuana*, str. 42. Oxford Univ. Press, New York 2000.
49. Russo E. B.: *Neuro Endocrinol. Lett.* 25, 31 (2004).
50. Mechoulam R., Hanu L.: *Pain Res. Manag.* 6, 67 (2001).
51. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 11. The Haworth Integrative Healing Press, New York 2002.

Z. Fišar (*1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Endocannabinoids**

The mechanisms of action, biosynthesis, inactivation and structure – activity relationships of endocannabinoids are reviewed. The discovery of endogenous cannabinoid system was an important step in understanding the psychotropic action of cannabis. The activation of cannabinoid receptor CB₁ is responsible for psychotropic effects of cannabinoids; however, some effects of these drugs may be also mediated by nonreceptor mechanisms, e.g., due to changes in the lipid part of biological membranes. The role

of the lipid bilayer in the cannabinoid system activity is indicated by the fact that membrane lipids are the source and pantry of endocannabinoids and main endocannabinoids are derived from arachidonic acid, which is an important part of membrane lipids. The structure – activity

relationship of cannabinoids (plant, endogenous, synthetic) and other substances affecting the cannabinoid system is intensively studied. The purpose of the studies is the discovery of drugs with therapeutic actions similar to cannabis, but without its psychoactivity.

KYSELINA SORBOVÁ A JEJÍ DERIVÁTY JAKO SUROVINY PRO PŘÍPRAVU LISTOVÝCH ALKOHOLŮ

ELIŠKA LEITMANNOVÁ a LIBOR ČERVENÝ

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28, Praha 6
eliska.leitmannova@vscht.cz, libor.cerveny@vscht.cz

Došlo 17.2.05, přepracováno 13.10.05, přijato 19.1.06.

Klíčová slova: homogenní katalýza, kyselina sorbová,
listové alkoholy, selektivní hydrogenace

Obsah

1. Úvod
2. Přípravy listových alkoholů vycházející z kyseliny sorbové a jejích derivátů
 - 2.1. Heterogenně katalyzované hydrogenace
 - 2.2. Homogenně katalyzované hydrogenace
3. Závěr

1. Úvod

Jako listové alkoholy se označují (*E*)-hex-2-en-1-ol a (*Z*)-hex-3-en-1-ol. Jde o zajímavé sloučeniny používané v parfumářském průmyslu, připravované syntetickou cestou. Oba se vyznačují silnou, intenzivní vůní trávy, (*E*)-hex-2-en-1-ol má ve svých spodních tónech vůni ovocnou. Jsou velmi důležitými komponentami ve vůních (příp. i chutích) ovoce, zeleniny, listů a trávy. V proměnných množstvích jsou přítomny v zelených částech téměř všech rostlin¹.

(*Z*)-Hex-3-en-1-ol je bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, rozpustná v ethanolu a propylenglykolu a mísitelná s oleji. Vyznačuje se silnou, intenzivně svěží vůní trávy, která je méně ovocná než u (*E*)-hex-2-en-1-olu. *Robinia pseudoacacia* a olej z lístků moruše obsahují až 50 % tohoto listového alkoholu, lístky zeleného nefermentovaného čaje až 30 %.

Ačkoli je častou složkou v parfémových kompozicích, užívá se tento alkohol jen ve velmi nízkých koncentracích (1–5 ppm), protože patří mezi velmi silné odoranty. Používá se při výrobě umělých esenciálních olejů a aromat. Je spolu s muškátovým, levandulovým a pepřomátovým olejem složkou řady květinových vůní (např. šerikové). V aromatech našel tento alkohol uplatnění imitací máty pepřné a v různých ovocných směsích¹.

(*E*)-Hex-2-en-1-ol je rovněž bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, rozpustná v ethanolu a propylenglykolu a mísitelná s oleji. Ve srovnání s (*Z*)-hex-3-en-1-olem má

sladší vůni a ovocnější chuť a je často přirovnáván k vůni chryzantémové nebo vinné. Největší použití nachází v aromatech, je častou složkou umělé vůně červených jahod, používá se k obnově aroma v pomerančové šťávě, jejíž vůně se ztrácí zvláště při průmyslovém zpracování. V parfémtech bývá součástí umělého levandulového a muškátového oleje¹.

2. Přípravy listových alkoholů vycházející z kyseliny sorbové a jejích derivátů

Syntézy listových alkoholů jsou vzhledem k požadované stereospecifitě náročné několikastupňové operace, často doprovázené nízkými výtěžky. Slibné se zdají být takové postupy, které vycházejí z kyseliny (*E,E*)-hexa-2,4-dienové (sorbové) a jejích derivátů, a to hlavně díky komerční dostupnosti této kyseliny a teoreticky nízkému počtu reakčních stupňů. Byly popsány dvě syntetické cesty od methylesteru kyseliny sorbové k vonným hexenolům. První cesta spočívá v chemické redukci karboxylové funkce na alkohol s následnou katalytickou hydrogenací systému dvojných vazeb. V druhém případě se nejprve selektivně hydrogenuje dienový systém a teprve pak se redukuje karboxylová funkce hexenové kyseliny na výsledný alkohol².

Bylo zjištěno², že při prvním způsobu přípravy (schéma 1) probíhá redukce methyl-sorbátu na (*E,E*)-hexa-2,4-dien-1-ol velmi selektivně při použití LiAlH_4 v etheru. Redukce LiBH_4 v propan-2-olu byla provázena částečným neselektivním nasycením dvojných vazeb. Vzniklý (*E,E*)-hexa-2,4-dien-1-ol byl selektivně hydrogenován na (*Z*)-hex-3-en-1-ol s 98–99% selektivitou. Při druhé cestě (schéma 1), kdy se nejprve selektivně hydrogenuje dienový systém, probíhala² hydrogenace methyl-sorbátu za vzniku methyl-(*Z*)-hex-3-enoátu se selektivitou 93 %. Následná chemická redukce tohoto produktu LiAlH_4 na (*Z*)-hex-3-en-1-ol byla provázena tvorbou isomerních hexenolů, které zhoršovaly kvalitu a senzorické vlastnosti produktu. Z hlediska selektivity se zdá lepší provádět nejprve chemickou redukci a poté hydrogenaci.

2.1. Heterogenně katalyzované hydrogenace

V prvních pracích, kde byla hydrogenována kyselina sorbová na katalyzátorech na bázi ušlechtilých kovů, byla připravena³ pouze nasycená hexanová kyselina. Později se podařilo kyselinu sorbovou s poměrně vysokou selektivitou hydrogenovat na hex-2-enovou kyselinu⁴ (autoři nerozlišují *Z* a *E* konfiguraci). Reakce byla prováděna za pokojové teploty a při tlaku vodíku 0,1 MPa na Raneyově niklu nebo na paladiových katalyzátorech. Nejlepším paladio-

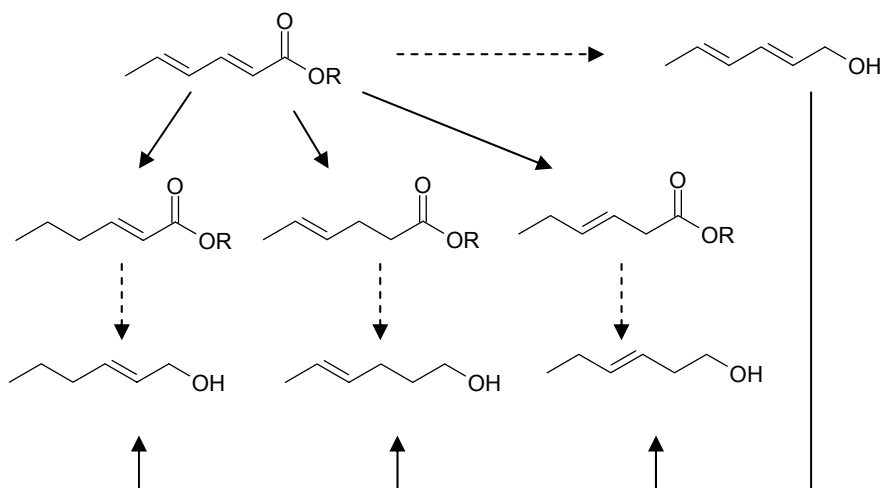


Schéma 1. Redukce kyseliny sorbové (příp. jejích derivátů) s následnou katalytickou hydrogenací (nejsou zahrnuty izomerační kroky); čárkované šipky – chemická redukce, plné šipky – hydrogenace

vým katalyzátorem bylo paladium na síranu barnatém (selektivita 89,6 % vzhledem ke hex-2-enové kyselině). Při srovnání rychlosti hydrogenace hexa-2,4-dienové kyseliny s rychlostí hydrogenace její sodné soli, která probíhala za stejných podmínek, bylo zjištěno, že kyselina byla hydrogenována znatelně rychleji⁴ než její sodná sůl. Hydrogenace sodné soli je však mnohem selektivnější vzhledem k zachování dvojné vazby v poloze 2. S Raneyovým niklem byla získána hex-2-enová kyselina se selektivitou 83 %. S platinovým katalyzátorem (Adamsův katalyzátor) byla získána především hexanová kyselina a jen malá množství kyselin nenasyčených⁵.

Další autoři^{6–9} srovnávali při hydrogenaci methylesteru kyseliny sorbové různé komerční kovové katalyzátory nanesené na aktivním uhlí jako nosiči. S platinovým, rhodiovým a rutheniovým katalyzátorem byl získán methylester (*E*)-hex-2-enové kyseliny (maximálně 27–29 % ve směsi) a methylester (*E*)-hex-4-enové kyseliny (maximálně 4 až 9 % ve směsi). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s Pd-katalyzátorem, který poskytl až 79 % methylesteru (*E*)-hex-2-enové kyseliny a 16 % methylesteru (*E*)-hex-4-enové kyseliny⁶. V novějších pracích^{7,8} vykazuje paladium opět nejlepší selektivitu vzhledem k methylesteru (*E*)-hex-2-enové kyseliny, přičemž jako vedlejší produkty byly získány v proměnlivých množstvích methylestery hex-3-enové a hex-4-enové kyseliny.

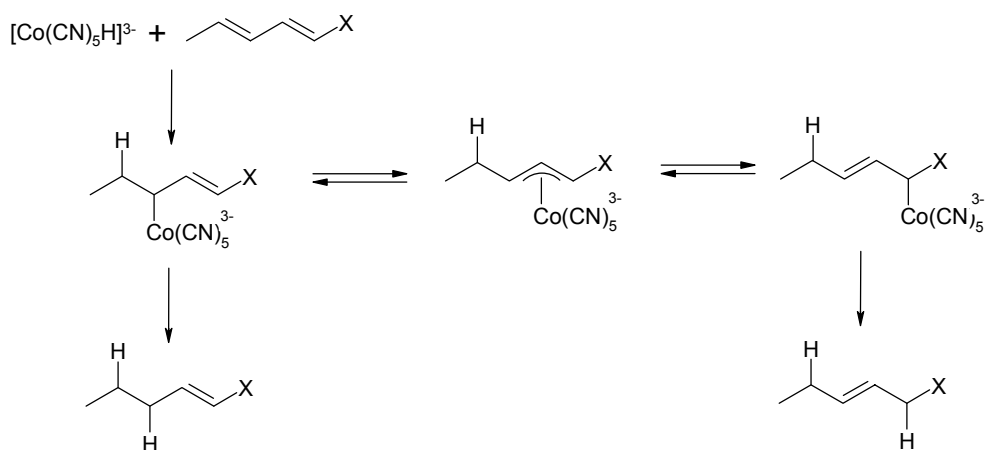
Všem popisovaným pracím je společné, že při úplné konverzi esteru kyseliny sorbové jsou primárně tvořeny estery hexenových kyselin dále hydrogenovány. Regioselektivně je možné připravit pouze ester (*E*)-hex-2-enové kyseliny. Dvojná vazba v poloze 2 je konjugována s karboxylovou funkcí a tím je její hydrogenace méně pravděpodobná než hydrogenace vazby v poloze 4.

Průběh adice vodíku na methyl-sorbát byl také sledován¹⁰ za použití rutheniové a paladiové černi jako kataly-

zátorů, které byly srovnány s homogenním katalyzátorem struktury $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$. Reakcí vznikaly methylestery hex-2-enové a hex-3-enové kyseliny a ty byly dále hydrogenovány na methyl-hexanoát. Největší selektivitu k tvorbě nenasyčených meziproduktů vykazovala paladiová čern. Nižší selektivitu měl rutheniový komplex a při použití rutheniové černi vznikalo především na počátku reakce značné množství methyl-hexanoátu. Komplex ruthenia katalyzoval 4,5- a 2,5-adici vodíku na dienový systém, za vzniku směsi methyl-hex-2-enoátu a hex-3-enoátu, zatímco použití paladiové černi vedlo převážně k 4,5-adici vodíku za vzniku majoritního produktu methyl-hex-2-enoátu. V přítomnosti těchto katalyzátorů neprobíhala 2,3-adice vodíku na dvojnou vazbu, která je v konjugaci s karbonylovou skupinou. Vzhledem k tomu, že výchozí methyl-sorbát má *E,E* konfiguraci, lze předpokládat, že se na komplex $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ koordinuje v *s-cis*-konformaci a hydrogenace probíhá π -allylovým mechanismem. Probíhá 4,5-adice vodíku za vzniku *Z*-isomeru. Isomer s konfigurací *E* pak vzniká 2,5-adicí vodíku.

2.2. Homogenně katalyzovaná hydrogenace

První homogenní katalyzátor^{11,12} použitý pro hydrogenaci kyseliny sorbové měl složení $\text{K}_3[\text{Co}(\text{CN})_5]$. Kyselina sorbová ve formě draselné soli byla za jeho přítomnosti selektivně hydrogenována na (*E*)-hex-2-enovou kyselinu. V další práci¹³ byla selektivita této reakce přesněji určena plynovou chromatografií. Při hydrogenaci ve vodě činily podíly (*E*)-hex-2-enové, (*E*)-hex-3-enové a (*E*)-hex-4-enové kyseliny po řadě 82, 17 a 1 %. V methanolu byla reakce mnohem selektivnější, (*E*)-hex-2-enová kyselina byla získána v 95% výtěžku. Aktivní částicí katalyzátoru byl hydrid $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}]^{3-}$. Současná tvorba jak kyseliny

Schéma 2. Hydrogenace dienů katalyzovaná $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{CN})_5\text{H}]^{3-}$; X = CO_2Me

hex-2-enové, tak i hex-3-enové byla vysvětlována¹⁴ přemyslem vznikajícího meziproductu (schéma 2).

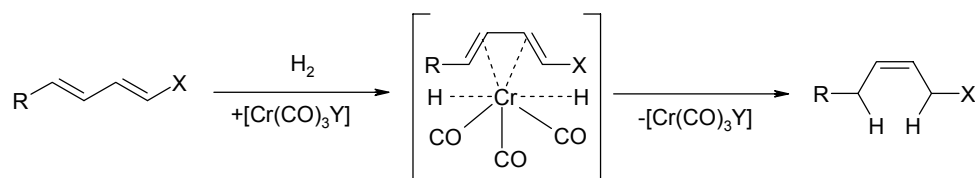
Dále byl zkoumán vliv katalyzátorů fázového přenosu na průběh reakce¹⁵. Při hydrogenaci natrium-sorbátu se selektivita k (*E*)-hex-2-enoátu jen mírně snižovala. Při hydrogenaci methyl-sorbátu se efekt zvýrazňoval: ve dvoufázovém systému voda-dichlormethan vznikaly methyl-(*E*)-hex-2-enoát a (*E*)-hex-3-enoát v poměru 65:35. V přítomnosti benzyltriethylamonium-chloridu vzrostl ve dvoufázovém systému podíl methyl-(*E*)-hex-3-enoátu na 75 %. Kyselina sorbová se za zvolených reakčních podmínek vůbec nehydrogenovala¹⁶. K podobnému výsledku dospěl Alper¹⁷, který prováděl hydrogenaci kalium-sorbátu a jako katalyzátor fázového přenosu používal β -cyklo-dextrin. Získal (*E*)-hex-2-enoát a (*E*)-hex-3-enoát ve výtěžcích 75, resp. 13 %.

Dále byly pro hydrogenaci kyseliny sorbové za alkalických podmínek použity¹⁸ jako katalyzátory různé rhodiové komplexy za pokojové teploty a tlaku vodíku 0,3 MPa. Zatímco Wilkinsonův katalyzátor $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$ i při malých konverzích poskytoval výhradně hexanovou kyselinu, s komplexem $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{Ph}_2\text{POOCH}_2\text{CH}=\text{CMe}_2)]$ (odvozeným záměnou jednoho PPh_3 ligandu) byla získána při úplné konverzi kyseliny sorbové směs se složením 52 % (*E*)-hex-4-enové kyseliny a 48 % hexanové kyseliny. Druhý zmiňovaný komplex byl navíc aktivnější. Kyselina

sorbová se koordinovala svou 2,3-dvojnou vazbu k iontu kovu. Další z použitých rhodiových¹⁹ katalyzátorů byl $[\text{H}_2\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Ph}_2\text{N}_3)_2(\text{PPh}_3)_2]$. V DMSO byla získána (*E*)-hex-2-enová kyselina společně s malým množstvím (*E*)-hex-3-enové kyseliny. Při teplotě nad 50 °C se (*E*)-hex-2-enová kyselina po úplné konverzi kyseliny sorbové hydrogenovala na hexanovou kyselinu.

Heinen²⁰ syntetizoval ve vodě rozpustný rutheniový komplex o složení $\{\text{RuCl}_2[\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3]_2\}$, který ve dvoufázovém systému voda-ethyl-acetát katalyzoval hydrogenaci kyseliny sorbové se selektivitou 82 % na (*E*)-hex-4-enovou kyselinu. Při jednofázovém provedení reakce bylo dosaženo jen 62% selektivity, zbytek výchozí látky byl hydrogenován až na hexanovou kyselinu.

Hydrogenace methyl-sorbátu na methylester (*Z*)-hex-3-enové kyseliny byla uskutečnitelná²¹ za přítomnosti komplexů $[\text{Cr}(\text{CO})_3]$, $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$, $[\text{W}(\text{CO})_3]$ a $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$. Aktivita různých komplexů se značně odlišovala v závislosti na ligandech, zatímco selektivita byla druhem arenového ligandu ovlivněna jen slabě. Nejlepší TOF (turnover frequency – míra aktivity) vykazoval komplex, který obsahoval methyl-3-methoxybenzoát jako arenový ligand. Dosažené hodnoty selektivity ležely mezi 91,8 a 98,9 % vztaženo na methyl-(*Z*)-hex-3-enoát. Už v této práci²¹ bylo zjištěno, že arenový ligand není pro reakci nezbytný, protože komplex $[\text{Cr}(\text{cykloheptatrien})(\text{CO})_3]$

Schéma 3. Hydrogenace dienů za přítomnosti komplexů $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$ komplexů; X – CO_2Me ; Y – aren

vykazoval vyšší aktivitu než $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$ komplexy. Bylo dokázáno²² (při použití deuteria), že se vodík přenášel přímo na uhlíkové atomy 2 a 5 methyl-sorbátu. 1,2-Adice vodíku a následná isomerace neprobíhala. Na základě těchto výsledků byl formulován reakční mechanismus, který je dodnes obecně přijímán (schéma 3).

Při studiu vlivu substituentů arenu na strukturu a katalytickou aktivitu katalytického komplexu $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$ bylo zjištěno, že elektronakceptorové substituenty arenu urychlují katalytickou reakci, zatímco elektrondonorové substituenty velkou měrou snižují aktivitu katalyzátoru²³. Jako modelová reakce při studiu tohoto vlivu sloužila hydrogenace methyl-sorbátu na methyl-(Z)-hex-3-enoát. Na většině katalyzátorů s různými substituenty bylo dosaženo 100 % výtěžku methyl-(Z)-hex-3-enoátu. Slabě vázaný arenový ligand zvyšoval aktivitu katalyzátoru. Při srovnání arenových komplexů se ukázalo, že čím větší byl rozdíl vazebných délek mezi atomem chromu a uhlíkovými atomy arenového ligandu²⁴, tím více probíhala požadovaná disociace. V komplexu $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$ (aren = 1,2,3-trimethoxybenzen) byla rovina tvořená C-atomy benzenového kruhu obzvláště silně deformovaná²³, takže tento komplex byl aktivní již při teplotě 80 °C. Ještě výraznější byl tento efekt u komplexů chromu s polyaromatickými sloučeninami jako je naftalen, anthracen nebo fenantren a s oxidem uhelnatým. Zatím neaktivnější sloučeninou byl komplex $[\text{Cr}(\text{naftalen})(\text{CO})_3]$, který katalyzoval stereoselektivní hydrogenaci methyl-sorbátu již při teplotě 30 °C a za tlaku vodíku 0,1 MPa. Příčinou této vysoké aktivity bylo pravděpodobně to²⁶, že naftalenový komplex v tetrahydrofuranu (THF) přechází na solvovaný komplex $[\text{Cr}(\text{CO})_3(\text{THF})_3]$. V nejnovějších pracích²⁷ byl syntetizován komplex chromu s podobně vysokou aktivitou. Byl to η^2 -methyl-akrylátový komplex $[\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}_3)]$.

Použití hexakarbonylchromu a $[\text{Cr}(\text{aren})(\text{CO})_3]$ komplexů má však řadu nevýhod, z nichž nejzávažnější je jejich toxicita, nepřiliš vysoká aktivita a nemožnost hydrogenace samotné kyseliny sorbové.

Alternativa ke komplexům chromu byla nalezena Heinenem²⁸. Ve vodě rozpustný komplex $[\text{RuCl}(\text{CO})\text{Cp}^*\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3]$ (Cp^* = pentamethylcyklopentadienyl) katalyzoval hydrogenaci kyseliny sorbové na (Z)-hex-3-enovou kyselinu ve dvoufázovém systému voda-heptan se selektivitou 66 % (konverze 68 %). Hlavním vznikajícím vedlejším produktem byla (se selektivitou 22 %) hexanová kyselina. Jako poměrně vhodný katalyzátor se ukázal kationtový komplex $[\text{RuCp}^*(\text{MeCN})_3]\text{Tf}^+$ ($\text{Tf} = \text{CF}_3\text{SO}_3^-$). Po disociaci acetonitrilových ligandů zde mohl po napojení dienu a vodíku vznikat podobný přechodný stav, jako se tvořil u komplexů chromu. Byl získán vysoce aktivní katalytický systém, který produkoval (Z)-hex-3-enovou kyselinu se selektivitou 67 %. Dalšího pokroku bylo dosaženo použitím dvoufázového systému s nitromethanem jako polární fází, protože oproti systému s vodou zůstal katalyzátor v polární fázi a nepřecházel do fáze heptanové. Kyselina sorbová a její ethylester byly hydrogenovány ve dvoufázovém systému nitromethan-heptan se selektivitou 75 % na (Z)-hex-3-enovou kyselinu, resp. 84 % na ethyl-(Z)-hex-3-enoát. Tento katalytický systém však vykazoval některé nevýhody, a to nízkou aktivitu, selektivitu do 90 %, a nemožnost průmyslového využití z důvodů toxicity a explozivitu rozpouštědla.

Z nepřítomnosti dalších ligandů v komplexu $[\text{RuCp}^*(\text{MeCN})_3]\text{Tf}^+$ by mohlo být vyvozeno, že za vysokou stereoselektivitu reakce je zodpovědný pouze kationtový fragment RuCp^* . Proto byl navržen následující reakční mechanismus (viz. schéma 4).

Napojení dienového systému, ve kterém se dien vy-

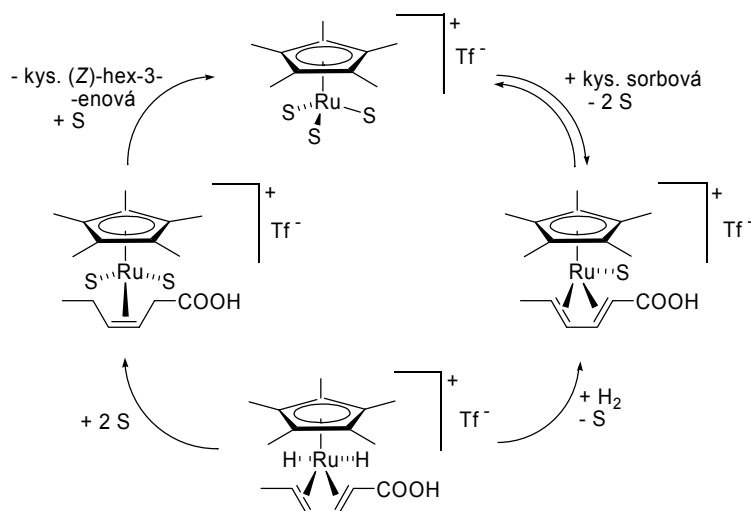


Schéma 4. Postulovaný mechanismus hydrogenace kyseliny sorbové na (Z)-hex-3-enovou kyselinu; S – rozpouštědlo

skytuje v *s-cis*-konformaci dvojných vazeb, dokázal Mashima²⁹ na základě komplexační reakce (*E,E,E,E*)-1,8-difenyl-1,3,5,7-oktatetraenu s $[\text{RuClCp}^*]_4$. Také Faganem³⁰ popsal komplex $[\text{RuCp}^*(\text{dien})]$ obsahující dien v *s-cis*-konformaci. Po vzniku π -komplexu s kyselinou sorbovou se oxidačně aduje jedna molekula vodíku. V takto vzniklém hydridovém komplexu jsou pozice 2 a 5 v molekule kyseliny sorbové k oběma hydridovým ligandům přímo natočeny, což činí přenos do těchto pozic velmi pravděpodobným. V konečném stupni katalytického cyklu disociuje vytvořená (*Z*)-hex-3-enová kyselina od rutheniového centra a vzniká solvatovaný komplex RuCp^* , na který se znovu může napojit kyselina sorbová. Jedna strana katalyticky aktivního centra je blokována ligandem Cp^* , zatímco druhá strana je k dispozici pro reakce s molekulami substrátu.

Proto byly v práci³¹ syntetizovány modelové komplexy RuCp^* , tj. $[\text{RuCp}^*(\eta^4\text{-MeCH=CHCH=CHCO}_2\text{H})]^+\text{X}^-$ (kde X^- je triflát nebo $\{\text{B}[\text{3,5-(CF}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3]_4\}^-$ (BARF)), které jsou velmi účinnými katalyzátory pro hydrogenaci kyseliny sorbové na (*Z*)-hex-3-enovou kyselinu a hexa-2,4-dien-1-olu (sorbového alkoholu) na (*Z*)-hex-3-en-1-ol za mírných reakčních podmínek v dvoufázovém systému. První z katalyzátorů může být použit v dvoufázovém systému jako je nitromethan-dibutylether, ethylenglykol-MTBE (methyl-*tert*-butylether) nebo sulfolan-MTBE, ve kterých komplex zůstává v polární fázi. Po reakci se komplex snadno separuje dekantací. Získané výsledky ukázaly, že „obnažený“ $[\text{RuCp}^*]^+$ kation je aktivnější než dříve použité rutheniové komplexy. K přezkoušení reakčního mechanismu byly provedeny pokusy³² s různě značeným vodíkem. V jednom bylo při hydrogenaci použito deuterium, v druhém byly provedeny pokusy s H_2 obohaceným o paravodík. Bylo zjištěno, že se značený vodík vázal výhradně v pozicích 2 a 5 kyseliny sorbové, což dokazuje mechanismus 1,4-adice vodíku.

3. Závěr

V práci jsou shrnuty známé postupy přípravy tzv. listových alkoholů, (*Z*)-hex-3-en-1-olu a (*E*)-hex-2-en-1-olu, vycházející z kyseliny sorbové a jejích derivátů. Oba alkoholy patří mezi vonné látky se značným komerčním využitím. Bylo sledováno využití heterogenních katalyzátorů pro hydrogenaci derivátů kyseliny sorbové. Použitím katalyzátorů na bázi vzácných kovů nanášených na aktivním uhlí bylo dokázáno, že selektivity maximálně 86 % (v případě paladia) při hydrogenaci bylo možné dosáhnout pouze ve směru hydrogenace dvojně vazby v poloze 4 za vzniku methyl-(*E*)-hex-2-enoátu, jehož redukcí lze získat (*E*)-hex-2-en-1-ol.

Pro zvýšení selektivity hydrogenace se přešlo na použití homogenních katalyzátorů. Prvním z velmi selektivních homogenních katalyzátorů byl organokovový komplex na bázi rhodia, který katalyzoval hydrogenaci kyseliny sorbové na (*E*)-hex-2-enovou kyselinu s velmi vysokou selektivitou. Pro přípravu methyl-(*Z*)-hex-3-enoátu lze

použít komplexy typu $[(\text{aren})\text{Cr}(\text{CO})_3]$. S takovými komplexy bylo možné získat methyl-(*Z*)-hex-3-enoát v téměř 100% výtěžku. Kvůli mnoha nevýhodám komplexů chromu byly hledány jiné katalyzátory. Nejaktivnější a nejselektivnější z komplexů typu RuCp^* v dvoufázovém systému ethylenglykol-MTBE katalyzoval hydrogenaci kyseliny sorbové na (*Z*)-hex-3-enovou kyselinu se selektivitou až 96 %. Tento postup se dosud jeví jako nejslibnější.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za finanční podporu tohoto projektu (203/03/H140 a 104/03/0409).

LITERATURA

- Arctander S.: *Perfume and Flavour Chemicals* (Aroma chemicals) II., No. 2053. Montclair, New York 1969.
- Vasilev A. A., Poddubnaya S. S., Cherkaev G. V., Novikov N. A.: Zh. Vses. Khim. Obshch. Im. D. I. Mendelejeva 32, 117 (1987).
- Ingold C. K., Shah L. D.: J. Chem. Soc. 1933, 886.
- Farmer E. H., Hughes L. A.: J. Chem. Soc. 1934, 1929.
- Farmer E. H., Galley R. A. E.: J. Chem. Soc. 1933, 687.
- Červený L., Chloubová I.: Seifen-Öle-Fette-Wachse 116, 549 (1990).
- Klusoň P., Kukula P., Kyslingerová E., Červený L.: React. Kinet. Catal. Lett. 59, 93 (1996).
- Kukula P., Červený L.: Appl. Catal., A 177, 79 (1999).
- Červený L., Fialová E., Růžička V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 54, 101 (1986).
- Freidlin L. Ch., Litvin E. F., Karimov K. G.: Zh. Org. Khim. 44, 2531 (1974).
- De Vries B.: Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap.: Proc. Ser. B 63, 443 (1960).
- Kwiatkiewicz J., Mador I. L., Sezler J. K.: J. Am. Chem. Soc. 84, 304 (1962).
- Mabrouk A. F., Dutton H. J., Copan J. C.: J. Am. Oil Chem. Soc. 41, 153 (1964).
- James B. R.: *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 8, str. 305. Pergamon Press, Oxford 1982.
- Rager D. L., Habib M. M.: J. Mol. Catal. 7, 365 (1980).
- Rager D. L., Habib M. M., Fauth D. J.: J. Org. Chem. 45, 3880 (1980).
- Lee J. T., Alter H.: J. Org. Chem. 55, 1815 (1990).
- Iraqi A., Fairfax N. R., Presto S. A., Cupertino D. C., Irvine D. J., Cole-Hamilton D. J.: J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1991, 1929.
- Kameda N., Igarashi R.: J. Chem. Soc. Jpn. 6, 577 (1994).
- Heinen J., Sandoval M. T., Driessen-Hoelscher B.: Catal. Today 48, 273 (1999).

21. Cais M., Frankel E. N., Rejoan A.: *Tetrahedron Lett.* 1968, 1919.
22. Frankel E. N., Selke E., Glass C. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 2446 (1968).
23. Le Maux P., Saillard J. Y., Grandjean D., Jaouen G.: *J. Org. Chem.* 45, 4526 (1980).
24. Shibasaki M., Sodeoka M.: *Synthesis* 1993, 643.
25. Cais M., Frankel D., Weidenbaum K.: *Coord. Chem. Rev.* 16, 27 (1975).
26. Cais M., Yagupsky G.: *Inorg. Chim. Acta* 12, L27 (1975).
27. Kündig E. P., Kondratenko M., Romanens P.: *Angev. Chem.* 40, 590 (1975).
28. Driessen-Hoelscher B., Heinen J.: *J. Organomet. Chem.* 570, 141 (1998).
29. Mashima K., Fukumoto H., Tani K.: *Organometallics* 17, 410 (1998).
30. Fagan P. J., Mahoney W. S., Calabrese J. C., Williams I. D.: *Organometallics* 9, 1843 (1990).
31. Steines S., Englert U., Driessen-Hoelscher B.: *Chem. Commun.* 3, 217 (2000).
32. Niessen H. G., Schleyer D., Wiemann S., Bargon J., Steines S., Driessen-Hoelscher B.: *Magn. Res. Chem.* 38, 747 (2000).

E. Leitmannová and L. Červený (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Sorbic Acid and Its Derivatives as a Material for Leaf Alcohol Synthesis**

(*E*)-Hex-2-en-1-ol and (*Z*)-hex-3-en-1-ol are usually referred to as the leaf alcohols. The alcohols are of special interest, as they are used in perfume industry and food processing as powerful additives to flavors and fragrances. The review deals with their synthesis starting from the (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienoic acid or its derivatives. One of its problems is the required stereospecificity and regioselectivity. The most selective heterogeneous and homogeneous catalysts for their synthesis are discussed.

ANTIFUNGÁLNÍ PROTEINY ROSTLIN – KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, MOŽNOSTI VYUŽITÍ

VERONIKA HEŘMANOVÁ^{a,b}, JAN BARTA^a
a VLADISLAV ČURNÝ^b

^aKatedra rostlinné výroby, ^bBiotechnologické centrum,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice
vhermanova@centrum.cz

Došlo 26.5.05, přijato 30.6.05.

Klíčová slova: antifungální proteiny, stresové proteiny
rostlin, rostlinné β -glukanasy, rostlinné chitinasy

Obsah

1. Úvod
2. Reakce rostliny na infekční agens
3. Klasifikace antifungálních proteinů
 - 3.1. Proteiny PR-1
 - 3.2. Proteiny PR-2 (β -glukanasy)
 - 3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)
 - 3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)
 - 3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatinu)
 - 3.6. Defensiny, thioniny
 - 3.7. Proteiny podobné cyklofilinu
 - 3.8. Proteiny inaktivující ribosomy
 - 3.9. Proteiny přenosu lipidů
 - 3.10. Inhibitory proteas
 - 3.11. Ostatní
4. Možnosti využití antifungálních proteinů
5. Závěr

1. Úvod

Antifungální proteiny jsou specifické stresové obranné proteiny, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. U vyšších organismů jsou tyto proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného systému – vrozené imunity. Výskyt těchto proteinů není ovšem omezen pouze na vyšší organismy, ale obdobné proteiny byly nalezeny i u hmyzu, rostlin a mikroorganismů^{1,2}.

Studium antifungálních proteinů nabývá v posledních letech na významu. Vzhledem k tomu, že tyto proteiny jsou součástí přirozených obranných systémů člověka, ale i živočichů a rostlin, existuje možnost jejich využití proti houbovým patogenům. Zájem o antifungální proteiny pro-

jevily jak obory humánní a veterinární medicíny, tak i obory zemědělské či potravinářské¹.

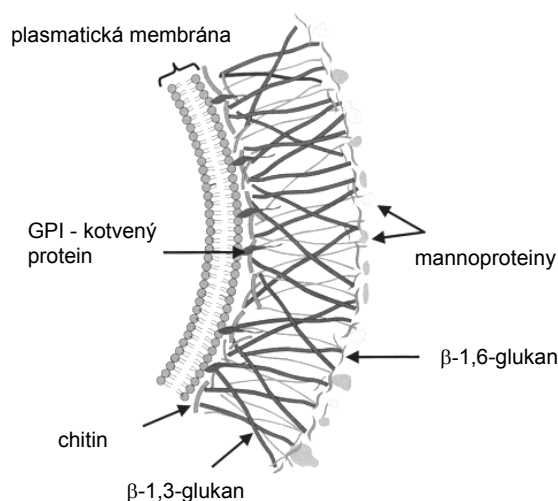
2. Reakce rostliny na patogenní organismy

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořily v průběhu koevoluce velmi spletité vzájemné vztahy. U patogenů se vyvinuly systémy, pomocí kterých napadají rostliny; rostliny získaly schopnost se účinně bránit infekčním agens. Průnik patogenů do buněk je ztížen řadou mechanických bariér (krycí pletiva, vosky, kutikula, buněčná stěna), avšak ani tyto struktury nejsou pro specializované patogeny nepřekonatelnou překážkou³. Z pohledu metabolismu a genové exprese dochází při kontaktu buňky s patogenem k řadě změn, jejichž cílem je omezit působení infekčního organismu v rostlině. Látka spouštějící tuto obrannou reakci na buněčné úrovni je tzv. elicitor^{3,4}, kterým bývá specifický metabolit identifikovatelný receptorem hostitelské rostliny. Většina obranných reakcí rostlin je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. Přenos od aktivovaných receptorů k DNA je možný více systémy. Jedná se především o fosfoinositidový systém, při kterém jsou hydrolyzou lipidů plasmatické membrány rostlinné buňky generovány dvě signální sloučeniny (inositol-1,4,5-trisfosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinasy a posléze i expresi genů⁴. Následná obranná reakce zahrnuje tvorbu nekrotizace (hypersenzitivní reakce), syntézu sloučenin s antibiotickým účinkem (fytoncidů) a syntézu specifických stresových proteinů^{2,5}. Hypersenzitivní reakce patří mezi nejúčinnější obranné mechanismy⁶. V napadené buňce během krátké doby naroste koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku, což vede k rychlé zkáze napadené buňky⁴. Hypersenzitivní reakce je pro okolní buňky často spouštěcím mechanismem pro syntézu fytoncidů a stresových proteinů PR (zkratka pochází z anglického označení „pathogenesis-related proteins“), nebo-li proteinů souvisejících s patogenezí^{6,7}. Mezi fytoicidy se řadí nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy^{3,4}. Proteiny PR jsou definovány jako stresové proteiny, jejichž syntéza je indukovaná přítomností specifického infekčního organismu^{2,4,6,8}. PR proteiny tvoří velmi početnou a různorodou skupinu. V současnosti jsou rostlinné proteiny PR klasifikovány do 14 skupin⁶.

3. Klasifikace antifungálních proteinů rostlin

Antifungální proteiny tvoří rozsáhlou a různorodou skupinu. Do současnosti bylo izolováno několik set těchto

proteinů a lze říci, že nové jsou objevovány téměř denně². Velký počet antifungálních proteinů, jejich různorodost i fakt, že jsou stále objevovány nové, ztěžuje jejich klasifikaci. Antifungální proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s dříve popsanou skupinou proteinů, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností^{2,6} nebo mechanismu účinku¹. Přehlednou klasifikaci antifungálních proteinů uvádějí ve své práci Selitrennikoff (2001), nebo Theis a Stahl (2004). Většina autorů^{1–3} se shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám proteinů PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách⁶. Obdobné antifungální proteiny byly izolovány i z jiných než rostlinných zdrojů. Takové proteiny se označují jako proteiny podobné rostlinným PR proteinům, nebo-li PR-1/5-like proteiny¹. K základním pěti skupinám rostlinných antifungálních proteinů jsou dnes řazeny další skupiny – defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklophilinu (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs), proteiny přenosu lipidů (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs) a inhibitory proteas^{1,2,6}. Z doposud známých skupin antifungálních proteinů byl mechanismus účinku zcela popsán pouze u skupiny PR-2 a PR-3 proteinů², které narušují základní stavební struktury buněčné stěny hub (viz obr 1). PR-2 proteiny (β-glukanasy) hydrolyzují strukturu β-glukanů, PR-3 (chitinasy) narušují chitinové polymery buněčné stěny.



Obr. 1. Schéma stavby buněčné stěny hub (GPI – glykofosfatidylinositol); převzato a upraveno z lit.²

3.1. Proteiny PR-1

Proteiny PR-1 vykazují podobnost vůči skupině proteinů bohatých na cystein. Jedná se o významnou skupinu PR proteinů, které se často využívají jako markery pro studium indukované rezistence rostlin⁶. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15–17 kDa (cit.²). Proteiny PR-1 byly poprvé izolovány z tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)⁹, později byly nalezeny u mnoha dalších rostlin (např. *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Arabidopsis thaliana* L.)^{6,10,11}. Antifungální aktivita byla u těchto proteinů prokázána proti řadě houbových patogenů – *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora parasitica* a *Peronospora tabaci*¹¹. Stabilitní struktura většiny proteinů PR-1, odolná proteasové degradaci, je zajištěna přítomností šesti cysteinových zbytků, které zajišťují tvorbu sulfidických můstků⁶. Mechanismus účinku proteinů PR-1 není znám. Předpokládá se, že mechanismus antifungální aktivity rostlinných proteinů PR-1 je obdobný jako v případě proteinu označovaného helothermin². Helothermin je živočišný antifungální protein (PR-1-like protein), který u cílových buněk interaguje s proteiny membránových kanálků a inhibuje tak propouštění vápenatých iontů, následkem čehož dochází k lyzi buněk¹².

3.2. Proteiny PR-2 (β-glukanasy)

Společným znakem proteinů této skupiny je β-1,3-endoglukanasová aktivita. Vzhledem k enzymové aktivitě PR-2, spočívá jejich mechanismus účinku v hydrolyze struktury β-1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupně oslabování buněčných stěn vede následně k lyzi buněk. V primární struktuře β-glukanas je vždy přítomná oblast dvou reziduí kyseliny glutamové. Tato oblast je považována za aktivní místo, umožňující navázání na strukturu β-glukanu a štěpení β-glykosidických vazeb¹. Na základě analýzy aminokyselinové sekvence jsou PR-2 proteiny děleny do tří skupin^{2,13,14}. První skupina představuje bazické, intracelulární proteiny s velikostí přibližně 33 kDa, druhá a třetí skupina zahrnuje kyselé extracelulární proteiny o velikosti 36 kDa. Bazické PR-2 proteiny jsou produkovány ve formě prekurzorů, jejichž enzymová aktivita je dána posttranslačními úpravami¹⁵. Bazické isoformy vykazují 50 až 250 krát vyšší aktivitu než kyselé isoformy PR-2 proteinů¹⁶. Antifungální aktivita byla zjištěna již na mikromolární úrovni (50 μg ml⁻¹) proti celé řadě organismů – např. *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus*². Proteiny PR-2 byly nalezeny u řady rostlin^{15–18}. Expresí proteinů PR-2 je u rostlin tabáku indukována jak přítomností viru mozaiky tabáku¹⁶, tak i na základě infekce inkompatibilními rasami patogenních druhů *Pseudomonas tabaci* nebo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*¹⁹. U rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byla zjištěna β-1,3-glukanasová aktivita u zásobního proteinu hlíz, patatinu¹⁵. Následně byla dokázána antifungální aktivita tohoto proteinu vůči patogenu *Phytophthora infestans*¹³.

3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)

Jedná se o skupinu proteinů PR, které vykazují endochitinasovou aktivitu. Tato aktivita je u bazických chitinas pětikrát vyšší než u kyselých¹⁶. Hmotnost většiny proteinů PR-3 se pohybuje v rozmezí 26–43 kDa. Rostlinné chitinasy jsou na základě struktury děleny do čtyř skupin¹. Chitinasy I třídy obsahují *N*-terminální doménu bohatou na cystein, která se skládá ze 40 aminokyselin (aglutininová doména obilného klíčku), a heveinu podobnou doménu (tzv. „hevein-like“ doménu), která má schopnost vazby na chitin. Proteiny PR-3 třídy II jsou podobné chitinasam první skupiny, ale postrádají *N*-terminální doménu a jejich hmotnost je 27–28 kDa. Třída III nevykazuje podobnost vůči žádné ze skupin chitinas. Velikost je 28–30 kDa. Třída IV je podobná proteinům první třídy, ale proteiny jsou z důvodu čtyřnásobné delece prokazatelně menší^{1,2}. Proteiny PR-3 byly izolovány z celé řady rostlin – tabáku, okurky, fazolu, hrachu, obilovin, ale i z mnoha dalších^{20–22}. Antifungální aktivitu vykazují proti řadě houbových organismů – *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*^{21,23,24}. Mechanismus účinku proteinů PR-3 je dán jejich enzymovou aktivitou. Jedná se o endochitinasy, které narušují chitin přítomný v buněčné stěně hub²⁵. Antifungální aktivita rostlinných endochitinas je *in vitro* synergisticky zvyšována přítomností proteinů PR-2 (cit.²⁶).

3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)

Jedná se o významnou skupinu proteinů PR majících schopnost vazby na chitin buněčných stěn hub. Molekulová hmotnost je od 3,1 do 20 kDa (cit.¹). Pro kyselé proteiny PR-4 je nejčastěji uváděno 13–14,5 kDa (cit.^{2,3}). Proteiny PR-4 vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a degradaci proteasami²⁷. Skupina proteinů PR-4 je na základě struktury klasifikována do dvou tříd¹. Proteiny PR-4 třídy I mají *N*-terminální doménu vázající se na chitin, která je podobná doméně přítomné u heveinu²⁸. Z tohoto důvodu se tato třída řadí do nadtřídy lektinů vázajících se na chitin. Do této skupiny patří např. proteiny Win 1 a Win 2, které byly izolovány z brambor (*Solanum tuberosum* L.)²⁹. Proteiny PR-4 třídy II na chitin se vázající doménu neobsahují. PR-4 proteiny byly opět izolovány z celé řady rostlin^{14,30,32}. Spektrum houbových organismů, vůči kterým vykazují antifungální aktivitu, je velmi široké – např. *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*². Mechanismus účinku proteinů PR-4 není zcela objasněn. Proteiny PR-4 třídy I mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny²⁷, a tím narušovat polaritu a růst buněk¹⁴. Mechanismus účinku proteinů PR-4 třídy II, které postrádají vazebnou doménu, je nejasný².

3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatinu)

Tyto antifungální proteiny o velikosti 24–25 kDa (cit.^{2,3,33}) vykazují vysokou podobnost primární struktury s thaumatinem (angl. „thaumatin-like protein“, TLPs). Thaumatin je sladce chutnající protein izolovaný z jihoafrické rostliny *Thaumatococcus danielli* Benth². Proteiny PR-5 byly nalezeny u celé řady rostlin – např. *Hordeum vulgare* L.³⁴, *Zea mays* L.³⁵, *Nicotiana tabacum* L.³⁶, ale i mnoha dalších. Přítomnost 16 cysteinových zbytků, které tvoří 8 disulfidických můstků, poskytuje proteinům PR-5 vysokou stabilitu vůči změnám teploty, pH a degradaci proteasami⁸. Struktura byla doposud determinována pouze u thaumatinu (*T. danielli*)³⁷, zeamatinu (*Zea mays*)³⁵ a PR-5d proteinu (*N. tabacum*)³⁶. Mechanismus účinku těchto antifungálních proteinů není doposud znám. Různá pozorování více či méně objasňují působení proteinů PR-5. Některé proteiny PR-5 způsobují změny v permeabilitě buněčných membrán – zeamatin způsobuje rychlou lyzi buněk houby *Neurospora crassa*, a to i při 4° C (cit.³⁸). U ostatních proteinů PR-5 byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita a schopnost vázat se na β -glukan buněčných stěn³⁴. Osmotin (zdroj *N. tabacum*) způsobuje chaos při stavbě buněčné stěny hub³⁹. Proteiny PR-5 jsou účinné proti širokému spektru houbových patogenů. Nejznámějším proteinem PR-5 je zeamatin, o jehož využití se vážně uvažuje i v lékařství, a to z důvodu jeho účinnosti proti kvasinkám *Candida albicans* a *C. vaginitis*⁴⁰.

3.6. Defensiny a thioniny

Defensiny a thioniny jsou variabilní skupina malých (5 kDa; 45–54 aminokyselinových zbytků), proteinů bohatých na cystein^{2,3}. Antimikrobiální aktivita rostlinných thioninů je známa již od začátku 40. let, kdy byly získány pšeničné thioniny⁴¹. Rostlinné defensiny byly poprvé získány z pšenice (*Triticum aestivum* L.). Vzhledem k strukturální podobnosti s thioniny byly zpočátku defensiny označeny jako γ -thioniny a staly se podskupinou thioninů⁴². Později byla skupina γ -thioninů přejmenována na rostlinné defensiny⁴³. Rostlinné thioniny a defensiny byly do současnosti izolovány z mnoha rostlin^{3,44,45}. Inhibiční aktivita byla prokázána proti řadě houbových patogenů – *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Candida albicans*². Stabilní strukturu těmto proteinům poskytuje přítomnost sulfidických můstků. Nejčastěji se jedná o čtyři až pět sulfidických můstků^{43,45}. Thioniny jsou syntetizovány ve formě větších prekurzorů (15 kDa), které jsou uvnitř vlastních buněk neaktivní. Odštěpením terminální sekvence se stávají toxickými³. Mechanismus účinku této skupiny proteinů není zcela znám. Při ošetření houby *N. crassa* defensiny Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* L.) a DM-AMP1 (*Dahlia merckii* L.) byla zjištěna schopnost vazby na specifické

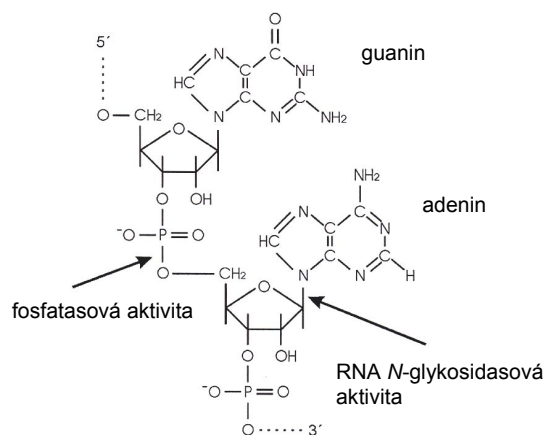
membránové receptory, následkem čehož docházelo k ztrátě iontů K^+ a lyzi buněk⁴⁴.

3.7. Proteiny podobné cyklofilinu

Tyto rostlinné antifungální proteiny (nejčastěji 18 kDa)^{46,47} jsou strukturálně podobné cyklofilinům (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), tedy proteinům, které představují intracelulární receptory pro cyklosporin^{2,48}. Poprvé byly tyto proteiny z rostlin izolovány v roce 1990, kdy byla nalezena cDNA těchto proteinů v rostlinách *Lycopersicon esculentum* Mill., *Zea mays* L., a *Brassica napus* L.⁴⁸. Zástupcem této skupiny jsou proteiny mungin (*Phaseolus mungo* L.) a CLAP (*Cicer arietinum* L.)⁴⁷. Proteiny CL jsou aktivní proti řadě houbových patogenů – *R. solani*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *Coprinus comatus*. Mechanismus účinku těchto proteinů nebyl dostatečně objasněn, mungin *in vitro* inhibuje α -amylasu a vykazuje β -glukosidasovou aktivitu⁴⁶.

3.8. Proteiny inaktivující ribosomy

Proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs) jsou *N*-glykosidasy, které odbourávají purin z rRNA, což způsobuje rozpad ribosomů a zastavení syntézy proteinů (viz. obr. 2)^{1,2}. Jedná se o skupinu proteinů, které se nacházejí v podstatě u všech organismů. Rostlinné RIPs byly nalezeny např. u druhů *Mirabilis expansa* Ruiz & Pavon⁴⁹, *Pisum sativum* L.⁵⁰, *Zea mays* L., *Ricinus communis* L.⁵¹. Proteiny inaktivující ribosomy jsou rozděleny do tří skupin. Třída I zahrnuje jednořetězové *N*-glykosidasy s hmotností 11–30 kDa. Proteiny třídy II obsahují dva řetězce, a to lektin (B řetězec), který se váže na buňky a *N*-glykosidasu (A řetězec). Mole-



Obr. 2. Působení proteinů inaktivujících ribosomy; proteiny inaktivující ribosomy vykazují fosfatasovou aktivitu narušující fosfodiesterové vazby a RNA *N*-glykosidasovou aktivitu, která deadenyluje rRNA. Převzato a upraveno z lit.¹

kulová hmotnost je přibližně 60 kDa (cit.^{1,2}). Do této třídy patří např. ricin, ebulin a nigrin. Proteiny třídy III jsou složeny ze čtyř řetězců, které jsou organizovány jako dva dimery shodné s typem třídy II. Antifungální aktivita byla doposud popsána pouze u malého počtu zástupců proteinů RI (cit.²). Řetězec B (lektin) se váže na buňky hub a vytváří v buněčné stěně kanálky, pomocí kterých *N*-glykosidasový řetězec A proniká do buněk, kde poškozuje ribosomy⁵². Není známo, jakým způsobem do buněk pronikají proteiny třídy I, které neobsahují řetězec B (cit.²). Kromě antifungálního účinku vykazují tyto proteiny i silnou toxicitu vůči živočišným buňkám⁵².

3.9. Proteiny přenosu lipidů

Proteiny této skupiny (8–9 kDa) zajišťují přenos fosfolipidů mezi membránami (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs)⁵³. Struktura těchto proteinů je zcela specifická. Jsou stabilizovány čtyřmi disulfidickými můstky a vytvářejí centrální dutinu v podobě jakéhosi tunelu. Tyto proteiny jsou aktivní vůči řadě bakterií a hub, ale mechanismus účinku není znám⁵¹. Existují hypotézy, které tvrdí, že tyto proteiny mají schopnost začlenit se do buněčné membrány hub tak, že centrální hydrofóbní dutina vytvoří póry, které umožní odliv intracelulárních iontů a v konečném důsledku způsobí smrt buňky. Jaký je vztah mezi tímto účinkem a funkcí přenosu lipidů není jasné².

3.10. Inhibitory proteas

Inhibitory proteas patří k nejčastěji se vyskytujícím antifungálním proteinům rostlin¹. Cysteinové inhibitory proteas byly izolovány z velkého počtu rostlin^{2,54,55} a vytvářejí čtvrtou skupinu cystatinů, tzv. fyto-cystatiny. Fyto-cystatiny jsou jednoduché polypeptidy o velikosti 10 až 12 kDa (cit.²), které vykazují antifungální aktivitu vůči řadě zástupců fytopatogenních hub – *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* a *Fusarium*⁵⁶. Princip antifungální aktivity inhibitorů proteas není znám². Z hlediska ochrany rostlin je významná i schopnost těchto proteinů inhibovat trávicí enzymy hmyzích škůdců – především trypsin a α -amylasu. U inhibitorů proteas byla popsána bifunkčnost – inhibice trávicích enzymů i antifungální aktivita. Nejpodrobněji byla antifungální aktivita bifunkčních proteinů popsána u proteinu zeamatinu (*Z. mays* L.)³⁸. Inhibitory proteas, izolované např. z ječmene nebo pšenice, nebyly z hlediska antifungální aktivity studovány.

3.11. Ostatní

Existuje celá řada rostlinných antifungálních proteinů, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin. Snakin-1 byl izolován z brambor (*Solanum tuberosum* L.), má velikost 6,9 kDa a je účinný již při koncentraci 10 μ M (cit.⁵⁷). Antifungální účinky vykazuje i 30 kDa velký glykoprotein izolovaný z rostliny *Engelmannia pinnatifida*

Nutt.⁵⁸ Ani u jednoho z těchto proteinů není znám mechanismus účinku.

4. Možnosti využití antifungálních proteinů

Možností využít antifungální proteiny jako zajímavou alternativu chemických fungicidních látek se zabývá mnoho oborů. Podle údajů¹ z roku 2004 bylo v osmi evropských zemích povoleno používání nisinu ke konzervaci potravin. Nisin je antimikrobiální protein produkovaný kmeny bakterie *Lactococcus lactis*⁵⁹. Další oblast využití antifungálních proteinů je farmacie. Ve fázi klinických testů se v současnosti nachází živočišný antifungální protein heliomyacin izolovaný z organismu *Heliothis virescens*⁶⁰ a uvažuje se o využití kukuřičného proteinu zeamatinu při léčbě kandidózy způsobené kvasinkou *Candida albicans*^{33,40}. U skupiny proteinů inaktivujících ribosomy (RIPs) byla zjištěna rozdílná toxicita vůči nádorovým a normálním buňkám člověka. Existuje teoretická možnost využití těchto proteinů jako selektivních protinádorových léků a imunotoxinů^{61,62}.

Vzhledem k tomu, že rostliny vytvářejí antifungální proteiny jako vlastní obranný systém, nabízí se využití těchto proteinů při ochraně zemědělských plodin. Detekce změn v přítomnosti a množství specifických PR proteinů (zejména PR-1 proteinů, β -glukanas, chitinas) se využívá při studiu indukované rezistence rostlin – proteiny PR se v tomto případě označují jako tzv. ISR („induced systemic resistance“) markery⁵. Možností zvýšit rezistenci rostlin expresí genů antifungálních proteinů v transgenních rostlinách se zabývá mnoho prací. Zvýšené rezistence bylo dosaženo např. u rostlin tabáku vůči patogenu *Alternaria alternata* po vnesení *tlp* genů rýže⁶², vůči padlí (*Sphaerotheca panosa*) u rostlin rýže po vnesení genu *Ace-AMPI* (syntéza proteinů podobných thaumatinu)⁶³, nebo u transgenních linií pšenice vůči fytopatogenní houbě *Fusarium graminearum* po vnesení genů kódujících chitinasy, β -glukanasy a TL proteiny⁶⁴. Zvyšování rezistence rostlin vůči rostlinným patogenům s využitím specifických rostlinných proteinů je v současnosti nejvýznamnější oblastí využití antifungálních proteinů.

5. Závěr

Antifungální proteiny rostlin jsou v současné době řazeny do 11 tříd. Tyto specifické proteiny jsou významnou součástí obranného systému všech rostlin. Antifungální vlastnosti těchto proteinů mohou být v budoucnosti významným nástrojem v boji proti patogenním organismům v mnoha oborech. Přestože jsou nové rostlinné antifungální proteiny objevovány téměř denně, víme o těchto výjimečných proteinech velmi málo. Budoucí využití antifungálních proteinů je podmíněno znalostí jejich specifických vlastností. Jedná se především o významné vlastnosti jako jsou selektivita, synergismus, imunologické vlastnos-

ti, možné křížové reakce s receptory hostitele (člověka), nebo vznik rezistence u cílového patogenu. U většiny antifungálních proteinů je také nutné doplnit chybějící informace o mechanismu účinku jejich působení.

Referát vznikl v rámci řešení projektu GA ČR č. 521/03/P036. Autoři děkují za finanční podporu.

LITERATURA

1. Theis T., Stahl U.: Cell. Mol. Life Sci. 6, 437 (2004).
2. Selitrennikoff C. P.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 2883 (2001).
3. Terras F. R.: Dissertation. K. U. Leuven, Belgium 1994.
4. Gloser J., Prášil I. v knize: Fyziologie stresu (Procházka S., ed.) kap. 15. Academia, Praha 1998.
5. Heil M., Bostock R. M.: Ann. Bot. 89, 503 (2002).
6. van Loon L. C., van Strien E. A.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 85 (1999).
7. Kombrink E., Schmelzer E.: Eur. J. Plant Pathol. 107, 69 (2001).
8. Breiteneder H.: Allergy 59, 479 (2004).
9. van Loon L. C., Kammen A.: Virology 40, 1 (1970).
10. Agrawal G. K., Jwa N. S., Rakwal R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 157 (2000).
11. Niederman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger E.: Plant Physiol. 108, 17 (1995).
12. Morrisette J., Kratzschmar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B. M., Patel J. R., Moss R. L., Schleuning W. D., Coronado R., Possani L. D.: Biophys. J. 68, 2280 (1995).
13. Tonon C., Guevara C., Daleo G., Oliva C.: J. Phytopathology 150, 189 (2002).
14. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., Mikkelsen J. D.: Plant Physiol. 113, 83 (1997).
15. Tonon C., Daleo G., Oliva C.: Plant Physiol. Bioch. 39, 849 (2001).
16. Linthorst H. J. M.: Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123 (1991).
17. Zemanek A. B., Ko T.-S., Thimmapuram J., Hamerschlag F. A., Korban S. S.: J. Plant Physiol. 8, 887 (2002).
18. Kim, Y. J., Hwang B. K.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 50, 103 (1997).
19. Meins F. Jr., Ahl P.: Plant Sci. 61, 155 (1989).
20. Graham L. S., Sticklen M. B.: Can. J. Bot. 72, 1057 (1994).
21. Zavareh A. H., Tehrani A. S., Mohammadi M.: Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 69, 555 (2004).
22. Lee S. C., Hwang B. K.: Planta, v tisku (2005).
23. Taira T., Yamagami T., Aso Y., Ishiguro M., Ishihara M. 2001: Biosci. Biotechnol. Biochem. 65, 2710 (2001).
24. Kong L., Anderson J. M., Ohm H. W.: Genome 48, 29 (2005).

25. Sela-Burlage M. B., Ponstein A. S., Vlomans S. A., Melchers L. S., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C.: *Plant Physiol.* 88, 936 (1993).
26. Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C.: *Plant J.* 8, 97 (1995).
27. Bormann C., Baier D., Horr I., Raps C., Berger J., Jung G., Schwartz H.: *J. Bacteriol.* 181, 7421 (1999).
28. van Damme E. J., Charels D., Roy S., Tierens K., Barre A., Martins J. C., Rouge P., van Leuven F., Does M., Peumans W. J.: *Plant Physiol.* 119, 1547 (1999).
29. Friedrich L., Moyer M., Ward E., Ryals J.: *Mol. Gen. Genet.* 230, 113 (1991).
30. Caporale C., Facchiano A., Bertini L., Leonardi L., Chilosi G., Buonocore V., Caruso C.: *J. Mol. Model.* 9, 9 (2003).
31. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., J. D. Mikkelsen S. M.: *Plant Physiol.* 113, 83 (1997).
32. Koo J. C., Lee S. Y., Chun H. J., Cheong Y. H., Choi J. S., Kawabata S. I.: *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 80 (1998).
33. Gavrović-Jankulović M., Ćirković T., Vučković O., Atanasković-Marković M., Petersen A., Golgić G.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 805 (2002).
34. Osmond R. I. W., Hrmova M., Fontaine F., Imberty A., Fincher G. B.: *Eur. J. Biochem.* 268, 4190 (2001).
35. Batalia M. A., Monzingo A. F., Ernst S., Roberts W., Robertus J. D.: *Nat. Struct. Biol.* 3, 19 (1996).
36. Koiwa H., Kato H., Nakatsu T., Oda J., Yamada Y., Sato F.: *J. Mol. Biol.* 286, 1137 (1999).
37. Ogata C. M., Gordon P. F., De Vos A. M., Kim S. H.: *J. Mol. Biol.* 228, 893 (1992).
38. Roberts W. K., Selitrennikoff C. P.: *J. Gen. Microbiol.* 136, 1771 (1990).
39. Yun D. J., Ibeas J. I., Lee H., Coca M. A., Narasimhan M. L., Uesono Y., Hasegawa P. M., Pardo J. M., Bressan R. A.: *Mol. Cell* 1, 807 (1998).
40. Stevens D. A., Calderon L., Martinez M., Clemons K. V., Wilson S. J., Selitrennikoff C. P.: *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 361 (2002).
41. Balls A. K., Hale W. S.: *Cereal Chem.* 17, 243 (1940).
42. Colilla F. J., Rocher R., Mendez E.: *FEBS Lett.* 270, 191 (1990).
43. Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P., Osborn R. W.: *Plant Physiol.* 108, 1353 (1995).
44. Thevissen K., Francois I. E., Takemoto J. Y., Ferket K. K., Meert E. M., Cammue B. P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 169 (2003).
45. Lay F. T., Brugliera F., Anderson M. A.: *Plant Physiol.* 131, 1283 (2003).
46. Ye X. Y., Ng T. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1111 (2000).
47. Ye X. Y., Ng T. B.: *Life Sci.* 70, 1129 (2002).
48. Gasser C. S., Gunning D. A., Budelier K. A., Brown S. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9519 (1990).
49. Vivanco J. M., Savary B. J., Flores H. E.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (1999).
50. Nielson K., Payne G. A., Boston R. S.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (2001).
51. Park S. W., Lawrence C. B., Linden J. C., Vivanco J. M.: *Plant Physiol.* 130, 164 (2002).
52. Peumas W. J., Hao Q., Van Damme J. M.: *FASEB J.* 15, 1493 (2001).
53. Kader J. C.: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 627 (1996).
54. Park K. S., Cheong J. J., Lee S. J., Suh M. C., Choi D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 509 (2000).
55. Soares-Costa A., Beltrami L. M., Thiemann O. H., Henrique-Silva F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1194 (2002).
56. Joshi B. N., Sainani M. N., Bastawade K. B., Gupta V. S., Ranjekar P. K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382 (1998).
57. Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 16 (1999).
58. Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M.: *Biochem. J.* 15, 723 (1996).
59. Breukink E., De Kruijff B.: *Biochem. Biophys. Acta* 1462, 223 (1999).
60. Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
61. Sandvig K., van Deurs B.: *EMBO J.* 19, 5943 (2000).
62. Velazhahan R., Muthukrishnan S.: *Bilogia Plantarum* 47, 347 (2003).
63. Li X., Gasic K., Cammue B., Broekaert W., Korban S. S.: *Planta* 218, 226 (2003).
64. Ahnand A., Zhou T., Trick H. N., Gill B. S., Bockus W. W., Muthukrishnan S.: *J. Exp. Bot.* 38, 1101 (2003).

V. Heřmanová^{a,b}, J. Bárta^a, and V. Čurn^b
^aDepartment of Plant Production, ^bBiotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice): **Antifungal Plant Proteins – Classification, Characterization and Potential Applications**

This short review is focused on antifungal plant proteins, their classification and characterization. There are 11 groups of the proteins: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 proteins, defensins, thionins, CLPs, RIPs, LTPs, and protease inhibitors. The mechanisms of action of these proteins are as different as their sources and include degradation of fungal cell wall polymers, formation of membrane channels or damage of cellular ribosomes. The mode of action of many proteins remains unknown. The range of fungi that are inhibited by these proteins is very broad, including pathogens of many plants. The genes encoding antifungal proteins can be used to create transgenic plants with increased fungal field resistance. Some antifungal proteins (e.g. zeamatin) are tested for therapeutical use.

VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA OBSAH POLYFENOLŮ A ANTI- OXIDAČNÍ AKTIVITU HLÍZ BRAMBOR

JAROMÍR LACHMAN^a, KAREL HAMOUZ^b,
JAROSLAV ČEPL^c, VLADIMÍR PIVEC^a,
MILOSLAV ŠULC^a a PETR DVOŘÁK^b

^a Katedra chemie, ^b Katedra rostlinné výroby, Česká země-
dělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6
Suchbát, ^c Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského
2366, 580 01 Havlíčkův Brod
lachman@af.czu.cz

Došlo 17.1.06, přijato 23.3.06.

Klíčová slova: hlízy brambor, polyfenoly, antioxidační
aktivita, žluté a fialové odrůdy, stanoviště, hnojení

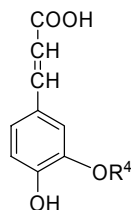
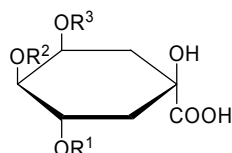
Úvod

V poslední době se v bramborových hlízách intenzivně studují látky, které mohou mít v lidské výživě významné postavení i přes nižší obsah¹. Významnou skupinu látek, která je v poslední době v bramborách intenzivně zkoumána, jsou látky s antioxidačními účinky^{2–6}. Jednu z nejrozšířenějších skupin antioxidantů představují fenolové látky, z nichž v bramborách je nejvíce zastoupena chlorogenová kyselina a její isomery^{3,4,7} a kávová kyselina

Tabulka I

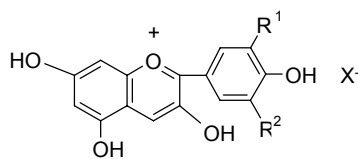
Hlavní fenolové kyseliny v hlízách brambor

Triviální název	Systematický název
Ferulová kyselina	4-hydroxy-3-methoxyfenylprop-3-enová 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
Kávová kyselina	3,4-dihydroxyfenylprop-3-enová 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



Látka	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Chlorogenová kyselina		H	H	
Isochlorogenová kyselina <i>a</i>			H	
Isochlorogenová kyselina <i>b</i>		H		
Kryptochlorogenová kyselina	H		H	
Neochlorogenová kyselina	H	H		
Kávová kyselina				H
Ferulová kyselina				CH ₃

Obr. 1. Struktura fenolkarboxylových kyselin v hlízách brambor



Obr. 2. Aglykony anthokyanů brambor

Látka	R ¹	R ²
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

(tab. I, obr. 1). V současné době jsou prováděny šlechtitelské pokusy s cílem zvýšit antioxidační aktivitu brambor navýšením obsahu fenolových látek a karotenoidů jako hlavních složek přispívajících k jejich antioxidační aktivitě⁸ nebo zvýšením obsahu selenu navýšením jeho obsahu ve výživě brambor⁹. Flavonoidy a u barevných odrůd také anthokyaniny (obr. 2), jsou zastoupeny hlavně v buněčných vakuolách peridermu, zvláště ve tkáních hlíz transgenických brambor¹⁰. Anthokyaniny jsou přítomny buď jako neacylované glykosidy nebo glykosidy acylované převážně *p*-kumarovou kyselinou¹¹. Byla nalezena pozitivní korelace¹² mezi antioxidační aktivitou a obsahem celkových polyfenolů a anthokyanů se závěrem, že především tyto látky hrají podstatnou roli v antioxidační kapacitě brambor. Ačkoliv obsah těchto látek ve slupkách brambor je 0,9–1,6 násobek obsahu v dužnině hlíz, příspěvek slupky k celkovému obsahu fenolových látek a anthokyanů činil pouze 20 %. Obsah chlorogenové kyseliny hraje významnou roli v antioxidačním potenciálu hlíz¹³, což však nebylo potvrzeno pro volnou aminokyselinu L-tyrosin. K celkové antioxidační aktivitě přispívají i karotenoidy obsažené v dužnině bramborových hlíz v rozsahu 0,5–1 mg v kg čerstvé hmoty u bíle zbarvených odrůd a dosahujících hodnot až 20 mg v kilogramu čerstvé hmoty u brambor se žlutě až oranžově zbarvenou dužninou¹⁴. Brambory s červeně zbarvenou dužninou obsahují anthokyaniny¹⁵ v závislosti na tom, zda mají dužninu hlíz zbarvenou pouze částečně nebo úplně. Tyto odrůdy obsahují 69–350 mg anthokyanů na 1 kg čerstvé hmoty a u fialově zbarvených odrůd brambor bývá jejich obsah 55–171 mg kg⁻¹ čerstvé hmoty¹⁶.

Jak bylo zjištěno, mohou být některé specie rodu *Solanum* vhodným zdrojem genů pro akumulaci antioxidantů

brambor, jejich obsah je však také ve značné míře ovlivněn agrotechnickými postupy pěstování a environmentálními faktory. Vztah mezi antioxidační kapacitou bramborových hlíz a obsahem flavonoidů je složitý¹⁷ a i když chlorogenová kyselina je hlavním antioxidantem hlíz brambor^{18,19}, objevují se stále další účinné fenolové antioxidanty, např. alkylferuláty obsažené v lipofilní frakci²⁰. Celkový obsah polyfenolových látek a anthokyanů je rozdílný v různých stádiích zralosti hlíz^{21,22}, je ovlivněn různými environmentálními podmínkami, např. delšími dny a nižšími teplotami²³ nebo způsobem a dávkami hnojení^{24,25}.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem bylo hlavním cílem této studie stanovit rozdíly v obsahu celkových polyfenolů a v antioxidační aktivitě mezi odrůdami s bíle až žlutě zbarvenou dužninou a fialově zbarvenými odrůdami a určit vliv klimatických podmínek stanoviště a hnojení, se zvláštním důrazem na draslík, na tyto dva vybrané kvalitativní parametry hlíz brambor.

Experimentální část

Polní pokusy

V přesných polních pokusech na čtyřech lokalitách v České republice s rozdílnou nadmořskou výškou byly vypěstovány jednotným způsobem podle zásad běžné agrotechniky čtyři odrůdy brambor (Impala, Karin, Ditta, Saturna), na stanovišti Suchdol navíc dvě odrůdy s fialovou barvou dužniny Valfi a Violette. Základní charakteristika jednotlivých stanovišť z hlediska nadmořské výšky, klimatických podmínek, půdních podmínek a zásoby živin v půdě je uvedena v tab. II. Předplodinou v pokusech byla ozimá pšenice, na podzim byl zaorán

Tabulka II

Charakteristika pokusných stanovišť

Stanoviště	Nadmoř. výška [m]	Prům. roč. teplota [°C]	Roční srážky [mm]	Půdní typ a druh	Zásoba živin v půdě [mg kg ⁻¹]		
					P	K	Mg
Přerov n. Labem	178	8,8	622	HM-ph,h	134	201	73
Praha-Suchdol	286	8,2	510	HM-h	175	245	210
Lípa	505	7,7	632	HPg-ph	93	154	94
Stachy	860	6,3	755	HPp-hp	248	124	134
Valečov	460	6,9	649	HPg-ph,h	171	203	161

Půdní typy: HM – hnědozem typická, HPg – kambizem kyselá pseudoglejová (hnědá půda oglejená), HPp – kryptopodzol (hnědá půda podzolová); Půdní druhy: ph – písčitohlinitá, hp – hlinitopísčítá, h – hlinitá

chlévkový hnůj v dávce 30 t ha⁻¹ společně s P a K hnojivem v dávkách podle zásoby živin v půdě. Na jaře byla na uvláčený pozemek rozmetána dusíkatá hnojiva, a to 2/3 z celkové dávky 120 kg N ha⁻¹ a zbytek dávky byl aplikován po vzejití porostu. Pozemek byl prokypřen do hloubky 15–18 cm a vytvořeny brázdy. Vlastní pokusy byly založeny ve čtyřech opakováních ve sponu 75 × 30 cm, velikost parcely 300 cm (4 řádky) × 720 cm. Před vzejitím trsů byl aplikován preemergentní herbicid Afalon 45 SC (linuron 450 g) v dávce 1,5 l ha⁻¹. Před zapojením porostu bylo provedeno nahrnutí zeminy na hrůbky. Během vegetace bylo jedenkrát provedeno ošetření insekticidem proti mandelince bramborové a 5–7 ošetření fungicidy proti plísni bramborové podle potřeby na jednotlivých stanovištích.

Druhý pokus byl založen na stanovišti Valečov (tab. II), kde byl sledován vliv různé úrovně hnojení živinami N, P, K, Mg na obsah celkových polyfenolů. Pokus byl realizován se dvěma odrůdami Ditta a Karin, agrotechnika byla shodná jako u prvního pokusu. Varianty hnojení byly následující: varianta 1: bez hnojení průmyslovými hnojivy; varianta 2: N 100 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 130 kg ha⁻¹, MgO 50 kg ha⁻¹; varianta 3: N 100 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 200 kg ha⁻¹, MgO 100 kg ha⁻¹; varianta 4: N 180 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 130 kg ha⁻¹, MgO 50 kg ha⁻¹.

Po sklizni ve fyziologické zralosti byly z jednotlivých opakování každého pokusu odebrány vzorky hlíz k laboratorním rozborům, které byly provedeny na Katedře chemie České zemědělské univerzity v Praze. Pro stanovení obsahu polyfenolů byly vzorky hned po sklizni zmrazeny a poté mrazově sublimovány.

Analytické metody

Mrazová sublimace

Hlízy brambor byly lyofilizovány na lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Leybold-Heraeus, Německo) a po vysušení a stabilizaci v exsíkátoru byly rozemlety na prášek v laboratorním mlýnku a poté extrahovány 80% vodným roztokem ethanolu po 24 h (15 min v ultrazvukové lázni a 1 h na třepačce). Navážka vzorků byla 10 g. Získané extrakty byly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk a doplněny 80% vodným ethanolom po rysku, ke stanovení byly pipetovány 0,5 ml alikvotní podíly.

Stanovení celkových polyfenolů (CP) Folinovým-Ciocalteauovým činidlem

Ke stanovení byla použita modifikovaná metoda²⁶ s Folinovým-Ciocalteauovým činidlem. Vzorek (0,5 ml) byl pipetován do 50 ml odměrné baňky a zředěn destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 2,5 ml Folinova-Ciocalteauova činidla (PENTA, Česká republika) a po promíchání 7,5 ml 20% roztoku karbonátu sodného. Po 2 hodinách stání při laboratorní teplotě byla změřena absorbance na spektrofotometru Heλios γ (Spectronic Unicam, Velká Británie) při vlnové délce λ=765 nm proti slepému pokusu. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalen-

ty gallové kyseliny (v g kg⁻¹ sušiny, gallová kyselina Merck, Německo). Průměrné hodnoty byly získány ze tří paralelních stanovení.

Stanovení antioxidační antiradikálové aktivity (AAA) metodou s DPPH•

AAA byla měřena po reakci se stabilním volným radikálem 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem (DPPH•)²⁷. Těsně před stanovením byl připraven čerstvý roztok DPPH (25 mg DPPH bylo rozpuštěno v 1 l methanolu, Sigma Aldrich). Fialový roztok DPPH• (3 ml) byl odpipetován do plastických kyvet o tloušťce 1 cm a byla změřena absorbance při vlnové délce λ=515 nm na spektrofotometru Heλios γ (Spectronic Unicam, Velká Británie) (t₀). Poté bylo přidáno 5 μl vzorku a po promíchání tyčinkou byla reakční směs ponechána stát 5 min. Po pětiminutovém stání při laboratorní teplotě byla opět změřena absorbance (t₅) a AAA byla vyjádřena z poklesu absorbance v % dle vztahu: % inaktivace = 100 – [(A_{t5}/A_{t0}) × 100]. Průměrné výsledky byly získány ze sedmi paralelních stanovení a vyjádřeny jako ekvivalenty askorbové kyseliny (mg kg⁻¹ sušiny, askorbová kyselina, Sigma, Německo). Hodnota R² pro askorbovou kyselinu byla 0,9991.

Statistické zhodnocení

Výsledky byly statisticky zpracovány metodou variace analýzy – Tukeyho testem na hladině významnosti P = 0,05.

Výsledky a diskuse

Obsah celkových polyfenolů

Vliv stanoviště

Na čtyřech stanovištích, která se výrazně lišila nadmořskou výškou, klimatickými a půdními podmínkami, nebylo dosaženo statisticky průkazného rozdílu v obsahu celkových polyfenolů v hlízách. Byl však zjištěn zajímavý trend vyššího obsahu celkových polyfenolů na stanovišti Stachy (minimálně o 11,4 % vyšší obsah celkových polyfenolů proti ostatním stanovištím – tab. III). Stanoviště Stachy se od ostatních výrazně odlišuje nejvyšší nadmořskou výškou, nejnižší průměrnou roční teplotou, nejvyšším úhrnem srážek a nejnižší úrodností půdy (tab. II). Uvedený trend na stanovišti Stachy se potvrdil u všech čtyř pokusných odrůd. Rozdíly v obsahu CP mezi dalšími třemi stanovišti byly minimální. Naše výsledky ukazují, že drsnější klimatické podmínky v polohách s vyšší nadmořskou výškou způsobily mírné zvýšení obsahu celkových polyfenolových látek. Potvrdily se tak výsledky našich dřívějších pokusů, které prokázaly, že výše položená chladnější stanoviště s vyšším úhrnem srážek poskytují hlízy s vyšším obsahem celkových polyfenolů²⁸. O vlivu lokality není v literatuře dostatek prokazatelných poznatků a přikládá se větší význam jiným faktorům: vlivu odrůdy, vlivu ročníku a stresovým faktorům, jako jsou mechanické poškození hlíz, napadení patogeny a působení světla na hlízy⁶. Po-

Tabulka III

Vliv čtyř stanovišť na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny)

Stanoviště	Odrůda	Celkové polyfenoly [g kg^{-1} sušiny]	Průměr stanoviště	% (Přerov n.L.=100 %)
Přerov n. L.	Impala	3,052	2,93	100,0
	Karin	3,261		
	Ditta	2,885		
	Saturna	2,523		
Suchdol	Impala	3,282	2,962	101,1
	Karin	3,441		
	Ditta	2,664		
	Saturna	2,461		
Lípa	Impala	3,232	2,904	99,1
	Karin	3,676		
	Ditta	2,461		
	Saturna	2,248		
Stachy	Impala	3,826	3,295	112,5
	Karin	3,589		
	Ditta	3,153		
	Saturna	2,612		

 $D_{\min 0,05} = 0,5034$ (stanoviště), $D_{\min 0,05} = 0,339$ (odrůda)

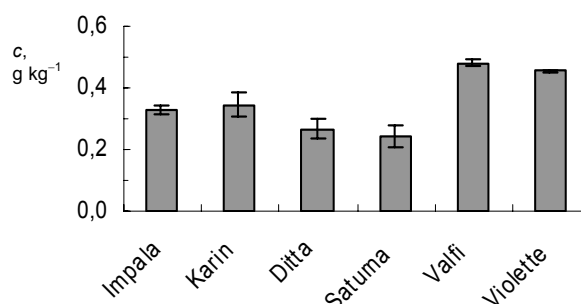
dobné výsledky byly získány i při pěstování brambor ve státě Colorado (delší dny a nižší teploty), které měly 1,4 až 2,5 krát vyšší obsah anthokyanů a celkových polyfenolů ve srovnání s bramborami vypěstovanými v Texasu²².

Vliv odrůdy

Odrůda měla ze sledovaných faktorů největší vliv na obsah CP v hlízách. Ze šesti pokusných odrůd byly čtyři odrůdy s tradiční žlutou barvou dužniny, dvě odrůdy měly barvu dužniny fialovou. Odrůdy s fialovou barvou dužniny dosáhly průkazně vyššího obsahu CP proti odrůdám se žlutou dužninou (obr. 3). Odrůdy s fialovou dužninou obsahovaly v průměru proti odrůdám se žlutou dužninou o 58,1 % více celkových polyfenolů. U odrůd se žlutou barvou dužniny dosáhly nejvyššího obsahu CP odrůdy Karin (3,44 g kg^{-1} sušiny) a Impala (3,28 g kg^{-1} sušiny), které se průkazně lišily od odrůd Ditta (2,66 g kg^{-1} sušiny) a Saturna (2,46 g kg^{-1} sušiny). Rozdíl v obsahu CP mezi odrůdami s fialovou dužninou (Valfi, Violette) nebyl průkazný. Naše výsledky jsou plně v souladu s dříve publikovanými poznatky o průkazném vlivu odrůdy na obsah celkových polyfenolů, chlorogenové kyseliny a anthokyanů^{6,28–30}, i když v některých pracích byl tento vliv označen jako slabší³¹. Vyšší obsah celkových polyfenolů u odrůd s fialovou barvou dužniny souvisí s vysokým podílem anthokyanů, které u odrůd s bílou nebo žlutě zbarvenou dužninou nejsou přítomny.

Vliv hnojení

Významným faktorem ovlivňujícím kvalitativní parametry brambor je způsob jejich pěstování a hnojení. Konvenční a ekologický způsob pěstování způsobuje rozdíly v obsahu nitrátů³² (nižší u ekologicky pěstovaných brambor bez použití průmyslových hnojiv) a askorbové a chlorogenové kyseliny^{28,33} (vyšší u ekologicky pěstovaných brambor). Použití NPK hnojiva v dávce 120 kg ha^{-1} zvyšuje obsah sušiny a současně snižuje obsah fenolových sloučenin³⁴, avšak v některých experimentech nebyl zjištěn žádný vliv dusíku³¹. Rozdíly v obsahu CP mezi čtyřmi pokusnými variantami hnojení se pohybovaly v rozmezí



Obr. 3. Vliv odrůdy na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny) na stanovišti Praha-Suchdol; $D_{\min 0,05} = 0,599$

Tabulka IV

Vliv variant hnojení na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny), stanoviště Valečov

Varianta hnojení ^a	Odrůda	Celkové polyfenoly [g kg^{-1} sušiny]	Průměr varianty hnojení	% (varianta 2=100 %)
1	Karin	3,598	3,158	96,5
	Ditta	2,717		
2	Karin	3,623	3,272	100,0
	Ditta	2,922		
3	Karin	3,137	2,947	90,1
	Ditta	2,756		
4	Karin	3,136	3,045	93,1
	Ditta	2,954		

 $D_{\min 0,05} = 0,649$ (varianta hnojení), $D_{\min 0,05} = 0,279$ (odrůda)

^a Pozn.: Var. 1 – N 0 kg ha^{-1} , P_2O_5 0 kg ha^{-1} , K_2O 0 kg ha^{-1} , MgO 0 kg ha^{-1} – bez hnojení průmyslovými hnojiv, Var. 2 – N 100 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 130 kg ha^{-1} , MgO 50 kg ha^{-1} , Var. 3 – N 100 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 200 kg ha^{-1} , MgO 100 kg ha^{-1} , Var. 4 – N 180 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 130 kg ha^{-1} , MgO 50 kg ha^{-1}

9,9 %, ale nebyly statisticky průkazné (tab. IV). Nejvyšší obsah CP byl zjištěn u varianty č. 2 s běžnými dávkami živin N, P, K a Mg. Nejvýraznější trend poklesu obsahu CP byl zjištěn u varianty č. 3 se zvýšenou dávkou K a Mg proti ostatním variantám. Tento výsledek koresponduje s poznatkem³⁵, podle nichž použití draselných hnojiv pozitivně ovlivnilo obsah fenolů a barevné změny dužniny. Někteří autoři⁶ řadí K hnojení mezi faktory, které obsah CP ovlivňují v menší míře, avšak potvrzují³⁶, že K snižuje obsah tyrosinu a chlorogenové kyseliny. Nižší obsah polyfenolů v bramborových hlízách pěstovaných za vyšších přídavek draslíku může přispívat k nižšímu enzymovému hnědnutí, i když hlavním faktorem ovlivňujícím hnědnutí je především aktivita fenylamoniaklyasy³⁷. Vyšší dávky draslí-

ku snižují také obsah redukujících sacharidů³⁸ významných při barevných změnách tepelně zpracovaných brambor.

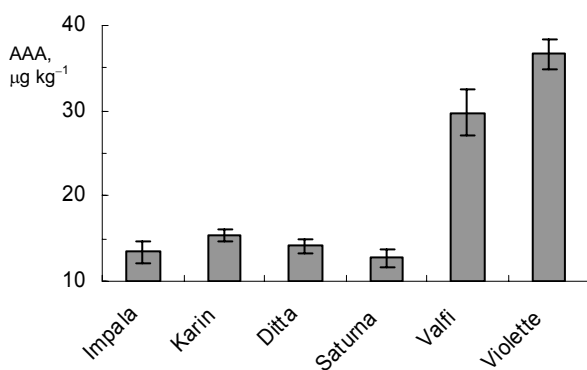
Antioxidační antiradikálová aktivita

Vliv odrůdy

Odrůdy s fialovou barvou dužniny Violette a Valfi vykázaly průkazně vyšší antioxidační aktivitu proti všem odrůdám se žlutou dužninou (obr. 4), což je v souladu s výsledky i dalších autorů¹². Nejvyšší AAA byla zjištěna u odrůdy Violette, u odrůdy Valfi byla o 18,6 % nižší a u odrůd se žlutou dužninou se pohyboval pokles AAA v rozmezí 65,0 až 57,9 %. Vyšší antioxidační antiradikálová aktivita u odrůd s fialově zbarvenou dužninou souvisí zřejmě s vyšším obsahem celkových polyfenolů ve srovnání s odrůdami se žlutě zbarvenou dužninou^{5,8,12}.

Závěr

Byly nalezeny významné rozdíly v obsahu celkových polyfenolů mezi odrůdami se žlutou dužninou Karin a Impala na jedné straně a odrůdami Ditta a Saturna na straně druhé. Významně vyšší obsah celkových polyfenolů je charakteristický pro odrůdy s fialově zbarvenou dužninou Valfi a Violette ve srovnání s odrůdami bíle a žlutě zbarvenými. Obsahu celkových polyfenolů odpovídá i antioxidační kapacita, která je nejvyšší u odrůd Violette a Valfi, zatímco u odrůd se žlutou barvou dužniny byla tato hodnota pouze v rozmezí $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ hodnoty odrůd s fialově zbarvenou dužninou. Drsnější klimatické podmínky stanoviště Stachy s vyšší nadmořskou výškou a vyšším úhrnem srážek měly za příčinu zřetelný trend k vyššímu obsahu celkových polyfenolových látek. Vyšší dávky draslíku resp. hořčiku v agrotechnických postupech naopak způsobily nižší akumulaci celkových polyfenolových látek.



Obr. 4. Vliv odrůdy na úroveň antioxidační aktivity ($\mu\text{g EAK kg}^{-1}$ sušiny) – stanoviště Praha-Suchbát; $D_{\min 0,05} = 3,489$;

*EAK – ekvivalent askorbové kyseliny

Práce je řešena v rámci grantového projektu MZ ČR NAZV č. 1G46058 a Výzkumného záměru MŠMT č. 6046070901

LITERATURA

1. Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 98, 373 (2004).
2. Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V.: Rostl. Vyr. 46, 231 (2000).
3. Lachman J., Hamouz K., Orsák M.: Chem. Listy 99, 474 (2005).
4. Lachman J., Hamouz K.: Plant Soil Environ. 51, 477 (2005).
5. Brown C. R.: Am. J. Pot. Res. 82, 163 (2005).
6. Friedman M.: J. Agric. Food Chem. 45, 1523 (1997).
7. Niggeweg R., Michael A. J., Martin C.: Nature Biotechnol. 2, 746 (2004).
8. Brown C. R., Culley D., Yang C. P., Durst R., Wrolstad R.: J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130, 174 (2005).
9. Hlušek J., Jůzl M., Čepl J., Lošák T.: Chem. Listy 99, 515 (2005).
10. Kosieradzka I., Borucki W., Matysiak-Kata I., Szopa J., Sawosz E.: J. Anim. Feed Sci. 13, 87 (2004).
11. Eichhorn S., Winterhalter P.: Food Res. Int. 38, 943 (2005).
12. Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: Am. J. Pot. Res. 82, 271 (2005).
13. Delgado E., Sulaiman M. I., Pawelzik E.: Pot. Res. 44, 207 (2001).
14. Brown C. R.: Am. J. Pot. Res. 82, 163 (2005).
15. Fossen T., Øvstedal D. O., Slimestad R., Andersen Ø. M.: Food Chem. 81, 433 (2003).
16. Brown C. R., Wrolstad R., Durst R., Yang C. P., Clevidence B.: Am. J. Pot. Res. 80, 241 (2003).
17. Lukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Skala J., Fecka I., Cisowski W., Szopa J.: J. Agric. Food Chem. 52, 1526 (2004).
18. Clifford M. N.: J. Sci. Food Agric. 79, 362 (1999).
19. Percival G. C., Baird L.: J. Agric. Food Chem. 48, 2476 (2000).
20. Yunoki K., Musa R., Kinoshita M., Tazaki H., Oda Y., Masao O.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 68, 2619 (2004).
21. Lewis C. E., Walker J. R. L., Lancaster J. E., Sutton K. H.: J. Sci. Food Agric. 79, 311 (1999).
22. Laerke P. E., Christiansen J., Veierskov B.: Postharvest Biol. Technol. 26, 99 (2002).
23. Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: Am. J. Pot. Res. 81, 187 (2004).
24. Hajšlová J., Schulzová V., Slanina P., Janne K., Hellenas K. E., Andersson C.: Food Add. Contam. 22, 514 (2005).
25. Kumar P., Pandey S. K., Singh S. V., Rawal S., Kumar D.: Ind. J. Agric. Sci. 74, 177 (2004).
26. Lachman J., Hosnedl V., Pivec V., Orsák M.: *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*, Brno, 7–11 July 1998, Proc. Conf. (Vaculová K., Ehrenerbergerová J., ed.), str. 118. Brno 1998.
27. Molyneux P.: Songklanakarin J. Sci. Technol. 26, 211 (2004).
28. Hamouz K., Lachman J., Vokál B., Pivec V.: Rostl. Vyr. 45, 293 (1999a).
29. Pawelzik E., Delgado E., Poberezny J., Rogozińska I.: *Abstr. 14th Triennial Conference of the EAPR, Sorrento, 2–7 May, 1999* (Assessorato Agricoltura Regione Campania ed.), str. 635. Sorrento 1999.
30. Zgórska K., Frydecka-Mazurczyk A.: Biul. IHAR Jadwisin 213, 253 (2000).
31. Lugasi A., Almeida D. P. F., Dworschak E.: Acta Alimentaria 28, 183 (1999).
32. Hamouz K., Čepl J., Vokál B., Lachman J.: Rostl. Vyr. 45, 495 (1999b).
33. Zarzecka K., Gugala M.: Plant Soil Environ. 49, 237 (2003).
34. Mehta A., Singh S. P.: J. Food Sci. Technol. Mysore 41, 542 (2004).
35. Kaldy M. S., Lynch D. R.: Am. Pot. J. 60, 375 (1983).
36. Míča B., Vokál B.: *Bramborářství* 3, 3 (1995).
37. Cantos E., Tudela J. A., Gil M. I., Espin J. C.: J. Agric. Food Chem. 50, 3015 (2002).
38. Moinuddin U. S.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 35, 1047 (2004).

J. Lachman^a, K. Hamouz^b, J. Čepl^c, V. Pivec^a, M. Šulc^a, and P. Dvořák^b (^a Department of Chemistry, ^b Department of Plant Production, Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic, ^c Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic): **The Effect of Selected Factors on Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Potato Tubers**

The total polyphenol (TP) content in and antioxidant activity of potato tubers of four yellow-fleshed varieties and two purple-fleshed varieties from the 2004 harvest were assayed. The TP content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant antiradical activity by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. Significant differences in the TP content between the groups of yellow-fleshed varieties were found. Significant differences between yellow and purple-fleshed potatoes were also found in antioxidant activity both between yellow and purple-fleshed varieties and within purple-fleshed varieties. The higher potatoes-growing regions showed an apparent tendency to higher TP contents in analyzed varieties. In some varieties the effect of four variants of growing was assayed and a significant effect of high potassium doses (200 and 130 kg K₂O per hectare) on the decrease in TP was estimated.

CUKERNÁ NESACHAROSOVÁ SLADIDLA A PŘÍBUZNÉ LÁTKY

JANA ČOPÍKOVÁ^a, OLDŘICH LAPČÍK^b,
MICHAL UHER^c, JITKA MORAVCOVÁ^b
a PAVEL DRAŠAR^{b,d}

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, FBPT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav chemie přírodních látek, FBPT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^d Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Došlo 14.3.06, přijato 3.5.06.

Klíčová slova: sladidlo, přírodní sladidlo, přídavná látka, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Přírodní sladidla podle české legislativy
3. Alditoly
4. Fruktany a fruktooligosacharidy
5. Invertní cukr a med
6. Nový produkt se sladkou chutí – Shugr
7. Závěr

1. Úvod

V článku používaný termín „sladidlo“ se váže na látku komerčně (a legálně) používané jako potraviny a pomocné nebo přídavné látky. Typickým zástupcem je sacharosa, pro kterou známe legislativní a obchodní termín cukr bílý a která je důležitou potravinářskou a průmyslovou surovinou a zároveň i potravinou. Sacharosa dodává potravinám příjemnou sladkou chuť, na kterou jsme zvyklí, je součástí hmoty potravin, přispívá k jejich energetické hodnotě a při potravinářských nebo kulinářských procesech podléhá hydrolýze, karamelizaci a Maillardově reakci. Produkty těchto reakcí přispívají k vůni, barvě a chuti potravin.

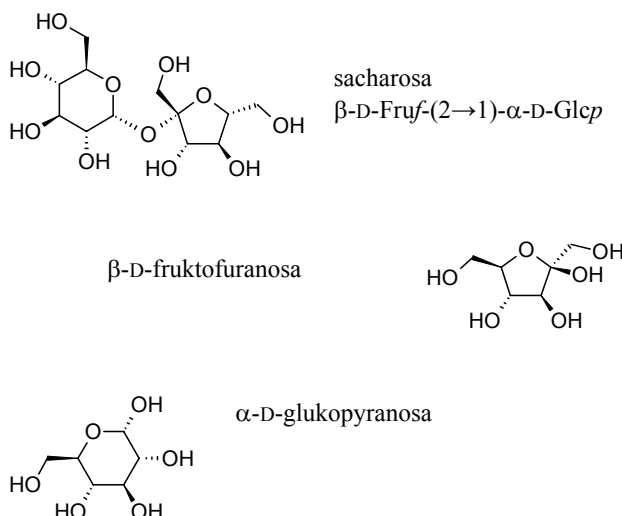
Sacharosa má dlouhou historii; její hlavní rozvoj však nastal díky pěstování třtiny (*Saccharum officinarum* L.) v Americe, z níž se do Evropy dovážel hlavně surový cukr, který byl zde dále rafinován. Během blokády přístavů za napoleonských válek se v Evropě rozšířilo pěstování cukrové řepy (*Beta vulgaris* L.), a tím se sacharosa začala po celé Evropě¹ vyrábět z řepy. Cukr bílý je komodita, se kterou se obchoduje na burze, a ročně se ho vyrobí kolem

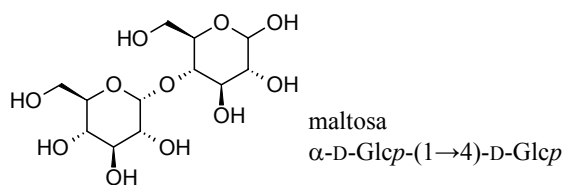
144 milionů tun a jen malá část slouží jako chemická surovina². Spotřeba cukru se ve vyspělých zemích pohybuje od 30 do 50 kg na osobu ročně¹ a v České republice kolísá kolem 40 kg na osobu a rok, což je jedna z nejvyšších spotřeb v Evropě². V Evropské unii má být výroba cukru od 1. července 2006 regulována³.

Sacharosa je v potravinách nahrazována v podstatě ze tří důvodů, zaprvé je to snaha snižovat energetickou hodnotu potravin, zadruhé snaha vyhovět požadavkům na dostupnost potravin, které nezpůsobují kazivost zubů⁴, a zatřetí, což je skutečně důležité, potřeba zásobovat trh potravinami vhodnými pro diabetiky. Protože složení neboli receptury potravinářských výrobků a doma připravených potravin obsahujících sacharosu mají více jak dvousetletou tradici, nelze sacharosu vždy jednoduše nahradit. Složitost tohoto úkolu může být ilustrována například na rozdílech v chuti a trzích úspěšných těchto značek nealkoholických nápojů, které však jsou vyráběny v různých oblastech, kde se liší cena a dostupnost jiných průmyslových sladidel.

2. Přírodní sladidla podle české legislativy

Podle legislativy České republiky⁵ se „druh přírodní sladidla“ dělí do tří skupin, mezi které patří např. cukr extra bílý, bílý a polobílý, tekuté výrobky z cukru, a samostatnou třetí skupinu tvoří „dextróza, fruktóza a glukózový sirup“. Dextróza je D-glukosa; glukosový sirup, v české odborné literatuře nazývaný škrobový sirup, je produkt částečné kyselé hydrolýzy škrobu. Škrobový sirup obsahuje 20 % D-glukosy vedle řady jejích oligomerů. Při výrobě potravin se uplatňuje další produkt, získaný enzymovou hydrolýzou škrobu, obsahující téměř 50 % maltosy; má nízký obsah D-glukosy a zbytek sušiny tvoří oligomery





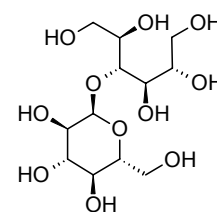
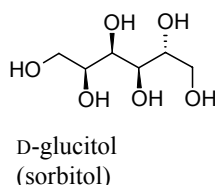
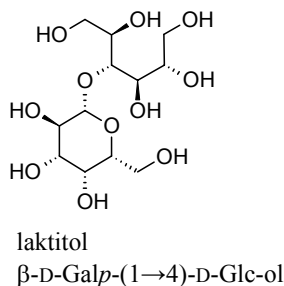
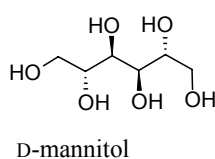
D-glukosy. Tento produkt se nazývá maltosový sirup. Oba komerční produkty jsou dodávány s obsahem 80 % sušiny. Pokud glukosový sirup obsahuje více než 5 % D-fruktosy, je dle legislativy označován jako glukózo-fruktózový sirup. Mezi přírodní sladidla v české legislativě není zahrnuta isoglukosa, což je sladidlo, které se vyrábí enzymovou isomerací D-glukosy vzniklé hydrolýzou škrobu⁶. Isomerací D-glukosy se získá produkt, který může obsahovat 42 až 55 % D-fruktosy. Isoglukosa s obsahem D-fruktosy 42 % má stejnou sladivost jako sacharosa. Produkt se sušinou kolem 80 % podléhá stejným regulačním pravidlům jako cukr^{7,8}.

3. Alditoly

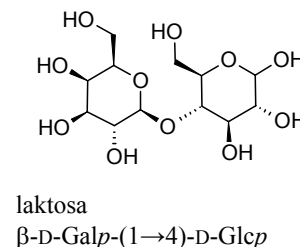
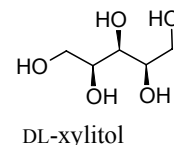
Vyhláška č.431/2005 ze sbírky zákonů, částka 148, určuje přídavné látky, které se mohou při výrobě potravin používat⁹. Mezi tyto přídavné látky patří také alditoly, které v určitých případech mohou nahrazovat přírodní sladidla. Jsou to D-glucitol (nazývaný též v praxi sorbitol, sorbit a sorbitolový sirup; E 420), D-mannitol (E 421), isomalt (E953), maltitol a maltitolový sirup (E 965), laktitol (E 966) a DL-xylitol (E 967). Podle vyčerpávající zprávy komise BCC C-230 z roku 2000/2001 se ve světě vyrábí kolem 1,4 milionů tun polyolů, D-glucitol tvoří 48 % výroby, DL-xylitol 12 %, D-mannitol 11 % a maltitol 10 % (cit.^{10,11}).

Z přehledu fyzikálních vlastností legislativou povolených alditolů (tab. I) vyplývá, že jejich sladivost je většinou nižší ve srovnání se sacharosou. Dále mají vyšší endotermní rozpouštěcí entalpii, což při požití vyvolává chladivý pocit v ústech. Z hlediska technologického je důležité, že roztoky alditolů mají ve srovnání s roztoky sacharosy při stejné koncentraci vyšší bod varu a z hlediska zdravotního je důležité, že mají laxativní účinky a nejsou kariogenní. Alditoly jsou v lidském těle fermentovány v tlustém střevě, kdy vznikají nižší mastné kyseliny, a tudíž mají určitou nízkou energetickou hodnotu.

Všechny uvedené alditoly se vyrábějí průmyslově katalytickou redukcí příslušné aldosa, případně ketosa. Surovinou pro D-glucitol a maltitol je hydrolyzátní škrobu



maltitol
 α -D-Glcp-(1→4)-D-Glc-ol



nebo sacharosy. Hydrolýzou sacharosy vzniká ekvimolární směs D-glukosy a D-fruktosy^{10,11}. Tyto monosacharidy je možné rozdělit chromatograficky a D-glukosu zredukovat na D-glucitol. Redukcí D-fruktosy vzniká ekvimolární směs D-glucitolu a D-mannitolu a z této směsi lze opět chromatograficky získat oba alditoly nebo v některých aplikacích je možné použít i jejich směs. D-Glucitol se vyrábí od roku 1950 v krystalické formě nebo jako sirup. Tekutá forma se uplatňuje především v recepturách zubních past a je surovinou při výrobě vitamínu C. Krystalický D-glucitol se používá především v potravinářství, je součástí cukrovinek, diabetického pečiva, konzervárenských výrobků a navíc se využívá jeho schopnost zvyšovat množství vody*, která je k dispozici v potravinovém substrátu a není chemicky vázána v pevném produktu¹², tj. působit jako zvlhčovač (alditoly snižují aktivitu vody, tedy výrobek nevysychá a nejvíce se činí DL-xylitol, avšak kvůli ceně se používá D-glucitol). D-Mannitol, jehož produkce je nízká, má použití jako excipient ve farmacii. Maltitol se vyrábí zejména ve formě sirupu, který se používá

* Pro vodu, která je k dispozici v potravinovém substrátu a není chemicky vázána, byl zaveden termín aktivita vody se zkratkou a_w . Aktivita vody je definována jako poměr tlaku vodní páry potravin k tlaku páry destilované vody při určité teplotě. Hodnoty aktivity vody se pohybují v rozmezí od 0,00 (suchá látka) do 1,0 (destilovaná voda). Potraviny se podle a_w dělí na tři velké skupiny: potraviny velmi vlhké (HMF – high moisture foods) s a_w 1,00–0,90; středně vlhké (IMF – intermediate moisture foods) s a_w 0,90–0,60 a suché (LMF – low moisture foods) s a_w < 0,60

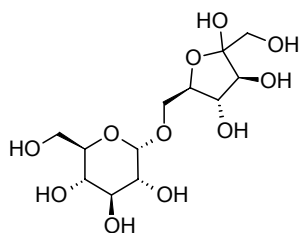
Tabulka I
Fyzikální vlastnosti sacharosy a vybraných alditolů^{40,41}

Alditol	Relativní sladivost ^a	Energetická hodnota [kJ g ⁻¹]	LT ^b [g/den)	Rozpustnost při 25 °C [g/100 g H ₂ O]	Rozpouštěcí entalpie [J g ⁻¹]	Teplota tání [°C]	Hygroskopicitá
Sacharosa	1	17	> 100	185	-18	160–186	nízká
D-Glucitol	0,6	10	50	235	-111	99–101	střední
D-Mannitol	0,5	10	20	22	-121	165–169	velmi nízká
Maltitol	0,9	10	60–90	175	-23	144–147	nízká
Xylitol	1	10	50–90	200	-153	92–95	vysoká
Laktitol · H ₂ O	0,3–0,4	10	20–50	140	-58	95–101	nízká
Isomalt	0,4	10	50–70	39	-39	145–150	velmi nízká
Erythritol	0,6–0,7	0	125	61	-180	119–123	velmi nízká

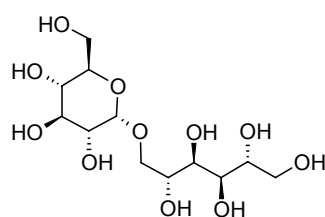
^a Vztaženo na sacharosu, ^b LT, tj. „Laxation threshold“ – maximální doporučená denní dávka na osobu

do receptur různých potravin, a v práškové formě je surovinou do čokolád.

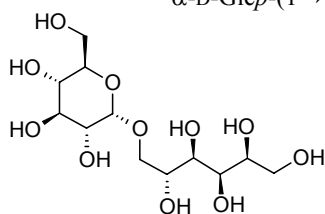
D-Xylitol se vyrábí redukcí D-xylosy, která se získá hydrolýzou hemicelulos bohatých na D-xylosu, např. ze dřeva břízy nebo kukuřičného šustí^{10,11}. Díky vysoké hodnotě endotermní rozpouštěcí entalpie se D-xylitol používá



isomaltulosa
 α -D-Glcp-(1→6)-D-Fruf



1-O- α -D-glukopyranosyl-D-mannitol
 α -D-Glcp-(1→1)-D-Man-ol



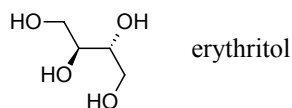
6-O- α -D-glukopyranosyl-D-glucitol
 α -D-Glcp-(1→6)-D-Glc-ol

ve žvýkačkách, kde se tato jeho vlastnost vhodně doplňuje s chladivým účinkem aromatických kompozic^{13–20}.

Laktosa se izoluje ze syrovátky ultrafiltrací nebo ionexovou chromatografií^{21–23} a její redukcí se získá laktitol^{24,25}. Laktitol má uplatnění v mléčných výrobcích a je cukernou složkou diabetických mléčných čokolád; je též používán při léčení hepatické encefalopatie. Z laktosy se m.j. připravují i prebiotické galaktooligosacharidy²⁶.

Nejmladším alditolem, který je povolen v Evropské unii a je směsí dvou látek, je palatinit^{27–30}. Jeho obchodní název v potravinářství je izomalt a ve farmacii²⁹ galenIQTM. Při jeho výrobě je sacharosa pomocí enzymu glykosyltransferasy transformována na palatinosu (isomaltulosa, 6-O- α -D-glukopyranosyl-D-fruktosa), která je potom redukována na palatinit (isomalt), což je ekvimolární směs 1-O- α -D-glukopyranosyl-D-mannitolu a 6-O- α -D-glukopyranosyl-D-glucitolu. Isomalt je surovinou do cukrovinek a dalších sladkých potravin³¹.

V České republice zatím není povolen erythritol, který se vyrábí fermentací roztoků D-glukosy^{32–36}. Na rozdíl od ostatních alditolů erythritol díky malé molekule prochází stěnou tenkého střeva a je z organismu vylučován močí³⁷. Erythritol je povolen v USA a Japonsku, Evropská unie doposud pouze publikovala studii, kde se používání erythritolu doporučuje³⁸.



Kromě vyjmenovaných alditolů, což jsou definované chemické sloučeniny, se ještě vyrábí sirupy nebo jejich sušené produkty, které vznikly redukcí směsí oligosacharidů, případně polysacharidů s nižší molekulovou hmotností. Jsou to redukované škrobové hydrolyzáty, jako např. maltodextriny nebo redukované fruktany³⁹.

Světový trh je alditoly v podstatě nasycen a s výjimkou isomaltu se očekává malý růst produkce. Historicky má průmysl alditolů své kořeny v Evropě, která nemohla soutěžit s výrobou škrobu z kukuřice v USA. Proto řada velkých výrobců alditolů má své sídlo v Evropě, i když v současné době dochází k velkým akvizicím. Mezi největší výrobce alditolů patří společnosti jako jsou Cerestar (Belgie), Roquette Frères (Francie) a SPI Polyols (USA). Hlavním výrobcem laktitolu je Danisco (Dánsko) a isomaltu doposud Südzucker (NSR), kterému na tento produkt skončil patent, a tudíž začíná být vyráběn například společností Cerestar. Jako ve všech odvětvích průmyslu, je očekáván velký růst výroby alditolů v Číně, i když doposud produkce základních potravinářských komodit nedostačuje požadavkům obyvatelstva¹¹.

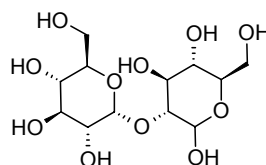
4. Fruktany a fruktooligosacharidy

Inulin je zásobním polysacharidem mnoha rostlin, například se nachází v cibulích tulipánů a narcisů, artyčocích, juce, avšak jeho průmyslovým zdrojem je hlavně čekanka. Inulin je polysacharid, který obsahuje převážně D-fruktosu, terminální jednotkou je D-glukosa a jeho stupeň polymerizace bývá udáván $n \leq 140$. Fruktosové jednotky jsou spojeny glykosidovými vazbami (1→2)-β. Hydrolýzou inulinu se získá směs nižších oligomerů, které se nazývají fruktooligosacharidy (FOS). Inulin a jeho nižší oligomery se uplatňují jako prebiotika, tj. příznivě ovlivňují střevní mikrofloru, a zároveň se nižší oligomery používají jako diabetická sladidla^{42,43}. Kromě toho je možné získat směs nižších oligomerů fermentačním procesem⁴⁴ a vzniklé oligomery pak mají stejné uplatnění jako oligomery vzniklé hydrolýzou inulinu. Obchodní směs s obvyklým stupněm polymerizace $n = 3$ až 5 je často nazývána Neosugar, Actilight nebo může mít název Raftilosa, obsahuje zejména kestosu ($n = 0$), nystosu ($n = 1$) a fruktosyl-nystosu ($n = 2$)^{42,45,50}. Tyto obchodní směsi mají sladivost kolem 50 % v porovnání se sacharosou a mohou se kombi-

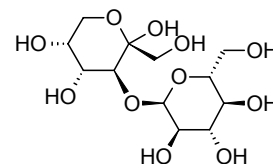
novat s povolenými přídatnými látkami jako jsou Acesulfam K nebo Aspartam. Světovými výrobci inulinu, jeho hydrolyzátů a případně derivátů jsou např. společnosti Orafit Group (Belgie)⁴² a Cargill (USA)⁴⁶.

5. Invertní cukr a med

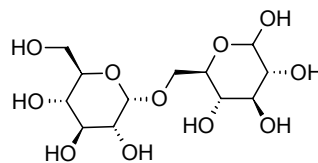
Invertní cukr je směs 50 % D-glukosy a 50 % D-fruktosy, která se vyrábí průmyslově a může se připravovat i v domácnostech. Využívá se buď kyselé nebo enzymové hydrolýzy sacharosy^{10,11}. Pro svůj obsah D-fruktosy je poněkud sladší než sacharosa a to asi 1,5krát. Tekuté invertní cukry, ve kterých je sacharosa hydrolyzována jen částečně⁵, se používají kromě slazení i jako zvlhčovač. V přírodním medu je nejvíce zastoupena⁴⁷ D-fruktosa (38 %) a D-glukosa (30 %), přičemž celkový obsah redukujících cukrů je zhruba 77 %. Dále med obsahuje do 1 % sacharosy, až 6 % tvoří další disacharidy, jako maltosa (4-O-α-D-glukopyranosyl-D-glukosa), kojibiosa (2-O-α-D-glukopyranosyl-D-glukosa), turanosa (3-O-α-D-glukopyranosyl-D-



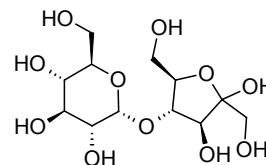
kojibiosa
α-D-Glcp-(1→2)-D-Glcp



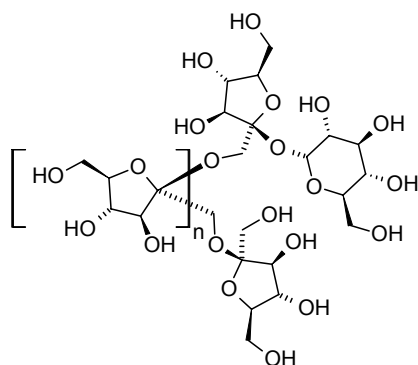
turanosa
α-Glcp-(1→3)-D-Fruf



isomaltosa
α-D-Glcp-(1→6)-D-Glcp

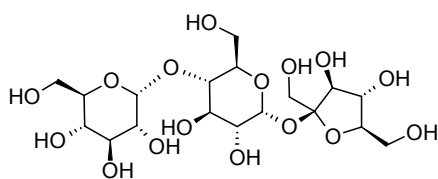


maltulosa
α-D-Glcp-(1→4)-D-Fruf

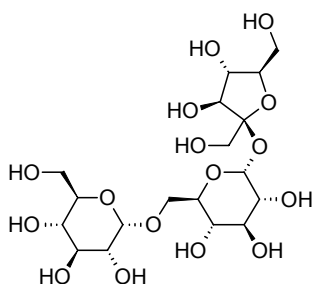


inulin, $n \leq 140$

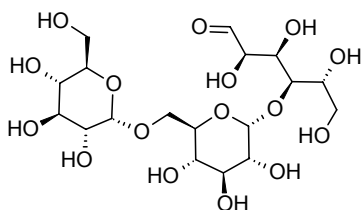
β-D-Fruf-(2-->1)-[β-D-Fruf-(2-->1)]_n-β-D-Fruf-(2<-->1)-α-D-Glcp



erlosa

 α -D-Glcp-(1→4)[β -D-Fruf-(2→1)]- α -D-Glcp

theanderosa

 α -D-Glcp-(1→6)[β -D-Fruf-(2→1)]- α -D-Glcp

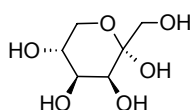
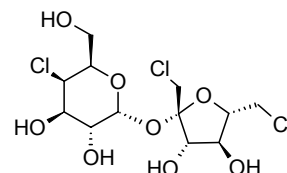
panosa

 α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

-D-fruktosa), isomaltosa (6-*O*- α -D-glukopyranosyl-D-glukosa), a maltulosa (4-*O*- α -D-glukopyranosyl-D-fruktosa). Dále může obsahovat až 4 % oligosacharidů, jako například erlosy, theanderosy a panosy⁴⁸. Invertní cukr se za med nesmí vydávat a nesmí se jím med⁵ ani porušovat.

6. Nový produkt se sladkou chutí – Shugr

Zajímavý je relativně nový produkt uvedený na trh v roce 2005 firmou Swiss Research, divize Health Sciences Group⁴⁹, a který je nazván „shugr“. Je označován jako přírodní (či 99,5 % přírodní) sladidlo, které chutná a je pociťováno v ústech stejně jako třtinový cukr a nemá žádný dodatečný chuťový podtón (aftertaste). Z potravinářského hlediska je hodnocen jako nekalorické sladidlo a je údajně možno s ním vařit a péci jako s cukrem, včetně kynutí, hnědnutí a karamelizace. Shugr se vyrábí jako patentovaná směs erythritolu, maltodextrinu, D-tagatosy s přídavkem malého množství (méně než 0,005 g na čajovou lžičku) sukralosy⁵⁰ [(1,6-dichlor-1,6-dideoxy- β -D-frukto-

 α -D-tagatofuranosa

sukralosa

furanosyl)-4-chlor-4-deoxy- α -D-galaktopyranosid; 4,1',6'-trichlor-4,1',6'-trideoxygalaktosacharosa)], čímž přívlastek „přírodní“ ztrácí svůj přírodní lesk. A to i kdybychom vzali maltodextrin, který reklama citlivě označuje jako „pocházející z kukuřičného škrobu“, za surovinu „přírodní“. Je vcelku logické, že shugr má potravinářské označení GRAS (Generally Recognized as Safe) od FDA (U.S. Food & Drug Administration). Shugr, i proto, že se dávákuje 1:1 ve srovnání se sacharosou, je zatím poněkud drahý; stojí v maloobchodě (USA) asi 1000 Kč kg⁻¹.

7. Závěr

Nahlédnutí do nepřehledného hájemství sekundárních metabolitů je drobnou pomůckou, která může být významná pro potravinářského, farmaceutického, či kteréhokoliv chemika, neboť může napomoci širšímu využití citovaných látek v rámci „obnovitelných zdrojů“ zelené chemie. Výčet používaných sladkých látek zde uvedených je nutno brát jako ukázkou několika zajímavých příkladů ilustrující nepřehlednou krásu chemie přírodních látek, které mohou být považovány za typické příklady, a nikoli jako vyčerpávající přehled tak, jak se započatá série článků, zamýšlená m.j. i jako učební pomůcky začíná rozvíjet⁵¹. Pro další informace odkazujeme na uvedené literární zdroje.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305. Autoři dále děkují doc. Ing. Karlu Kefurtovi, CSc. za cenné názvoslovné konzultace.

LITERATURA

1. <http://www.fao.org> (staženo 5.4.2006).
2. http://www.spolvyziva.cz/zprava_o_vyzive/zprava_4.php (staženo 5.4.2006).
3. http://ec.europa.eu/agriculture/capreform/sugar/index_en.htm (staženo 5.4.2006).
4. Hamilton-Miller J. M. T.: J. Med. Microbiol. 50, 299

- (2001).
5. Vyhláška č. 76/2003 Sb. částka 32.
 6. Weidenbach G., Bonse D., Meyer B.: US Patent 4665025
 7. OECD, 2004, OECD Agricultural Outlook: 2004–2013, OECD, Paris, Glossary
 8. <http://register.consilium.eu.int/pdf/cs/06/st05/st05588.cs06.pdf> (staženo 7.7.2006).
 9. Vyhláška č. 431/2005 Sb., částka 148.
 10. BCC Research C-230 *The Global Market for Polyols*, October 2001.
 11. Anonym: Int. Sugar J. 104, 352 (2002).
 12. <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76457> (staženo 24.4.2006).
 13. <http://www.xylitolforyou.com/mission.html> (staženo 5.4.2006).
 14. <http://www.pentosesugar.com/part2-1.html> (staženo 5.4.2006).
 15. <http://www.xylitolworks.com/production.html> (staženo 5.4.2006).
 16. <http://www.xylitol.net/eng/index.php> (staženo 5.4.2006).
 17. Buckl H., Fahn R., Hofstadt C. E.: DE Patent 3980719 (1971).
 18. Melaja A. J., Hamalainen L.: US Patent 4008285 (1977).
 19. <http://www.tifac.org.in/news/view6.htm> (staženo 5.4.2006).
 20. http://www.ynhh.org/online/nutrition/advisor/sugar_alcohol.html (staženo 5.4.2006).
 21. Durham R. J., Sleight R. W., Hourigan J. A.: Australian J. Dairy Techn. 59, 138 (2004).
 22. Theoleyre M. A.: FR Patent 2 844 280 A1 (2004).
 23. Pederson H. T. Jr.: US Patent 4202909 (1980).
 24. Heikkilä H., Nygren J., Sarkki M.-L., Gros H., Eroma O.-P., Pearson J., Pepper T.: US Patent 6395893 (2002).
 25. Myers C., Heikkilä H., Nikander H., Nurmi J., Nygren J., Perkkäläinen P., Pepper T., Pitkänen I., Valkonen J.: US Patent 6872414 (2005).
 26. Rudolfová J., Čurda¹: Chem. Listy 99, 168 (2005).
 27. Schiweck H.: Proc. ERGOB Conf. 1978, 138.
 28. Bollinger H.: Gordian 5, 92 (1978).
 29. <http://www.palatinit.com/en/Company/> (staženo 5.4.2006).
 30. Duflot P., Fouache C.: US Patent 6204378 (2001).
 31. Šmídová I., Čopíková J., Sikora A., Maryška M.: Chem. Listy 98, 142 (2004).
 32. Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt: EU patent 0625578, viz: <http://legal.european-patent-office.org/dg3/pdf/t000737du1.pdf> (staženo 5.4.2006).
 33. Horikita H., Hattori N., Takagi Y., Kawaguchi G., Maeda T.: US Patent 4923812 (1990).
 34. Sasaki T., Kasumi T., Kubo N., Kainuma K., Wako K., Ishizuka H., Kawaguchi G., Oda T.: US Patent 4939091 (1990).
 35. Abe S., Satoshi M.: US Patent 5902739 (1990).
 36. Lin S.-J., Wen C.-Y., Hsu W.-H., Liou G.-Y., Chu W.-S.: US Patent 6448053 (2002).
 37. Arrigoni E., Brouns F., Amado R.: British J. Nutr. 94, 643 (2005).
 38. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out175_en.pdf#search='Erythritol, (staženo 5.4.2006).
 39. Vogel M., Kunz M., Kowalczyk J., Munir M.: Eur. Pat. Appl. EP 657106 (1995); US 5585480 (1996).
 40. <http://www.spipolyols.com/pdfs/PolyolCompareChart.pdf> (staženo 9.4.2006).
 41. Bubník Z., Kadlec P., Urban D., Bruhns M.: *Sugar Technologists Manual*. Bartens, Berlín (1995).
 42. <http://www.orafti.com/orafti/orafti.nsf/splashcontent?readform> (staženo 7.7.2006).
 43. http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html#Iic. (staženo 7.7.2006).
 44. Sangeetha P. T., Ramesha M. N., Prapulla S. G.: Trends Food Sci. Technol. 16, 442 (2005).
 45. <http://www.danone-institut.cz/files/2004.03/> (staženo 7.7.2006).
 46. <http://www.cargill.com/index.htm> (staženo 7.7.2006).
 47. <http://www.nhb.org/foodtech/defdoc.html> (staženo 17.4.2006).
 48. Crane E. (ed.): *Honey: A Comprehensive Survey*. Heinemann, London 1975.
 49. <http://www.shugr.com/> (staženo 17. 4. 2006).
 50. Moravcová J.: Chem. Listy 95, 202 (2001).
 51. Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).

J. Čopíková^a, O. Lapčík^b, M. Uher^c, J. Moravcová^b, and P. Drašar^{b,d} (^a*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^c*Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*, ^d*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Non-sucrose Saccharide Sweeteners and Related Compounds**

A brief survey of the most frequently occurring non-sucrose saccharide sweeteners and related compounds aims to show the importance of this group of compounds, which can be utilised, among others, in food and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of this group of mostly secondary metabolites are illustrated. The article is also meant for teachers and students.

BIOLOGICKY AKTIVNÍ PYRAZINY PŘÍRODNÍHO A SYNTETICKÉHO PŮVODU

MARTIN DOLEŽAL

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové 5
martin.dolezal@faf.cuni.cz

Došlo 2.11.05, přepracováno 21.3.06, přijato 11.5.06.

Klíčová slova: pyrazin, flavoranty, fragaranty, chemická léčiva, vývoj léčiv

Obsah

1. Úvod
2. Význam derivátů pyrazinu v přírodě
 - 2.1. Nežádoucí a toxické vlastnosti pyrazinů
3. Deriváty pyrazinu syntetického původu
4. Závěr

1. Úvod

Před více než čtyřiceti lety vyšel v Chemických listech souborný referát s názvem Chemie pyrazinu autorů Libora Nováčka, Karla Paláta a Milana Čeladníka¹. Za uplynulou dobu bylo v této oblasti organické chemie získáno velké množství závažných informací, které se přímo dotýkají našeho každodenního života, zejm. potravin, kosmetiky a v neposlední řadě i nových léčiv. Pyrazin, 1,4-diazin, představuje vysoce symetrickou molekulu. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů a chová se jako slabá dvojsytná báze ($pK_1 = 0,57$; $pK_2 = -5,51$)². Pyrazinové jádro je planární útvar, který může být znázorněn jako rezonanční hybrid několika základních struktur (viz schéma 1). Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel-Craftsovým aromatickým substitucím. Přímý elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíkových atomů pyrazinu, a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou

příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou z tohoto důvodu substituce nukleofilní³.

Pyraziny se v přírodních zdrojích vyskytují v relativně malých množstvích, často se jedná o těkavé a dosti nestálé molekuly, proto byl dlouhou dobu počet známých derivátů přírodního původu relativně malý. Možnosti identifikace takových sloučenin se zlepšily ve 2. polovině 20. století zavedením velmi citlivých analytických metod (HPLC a hmotnostní spektrometrie). Rovněž počet synteticky získaných sloučenin nebyl do 1. poloviny 20. století příliš vysoký, obrát v oblasti syntézy pyrazinových sloučenin nastal zejména na přelomu 70. a 80. let minulého století⁴.

2. Význam derivátů pyrazinu v přírodě

Od 70. let 20. století byla intenzivně studována role jednoduchých látek odvozených od pyrazinu v přírodě, především v rostlinách či hmyzu, kde těkavé pyraziny plní úlohu atraktantů, feromonů či signálních látek^{5,6}, např. alkylované pyraziny jsou součástí poplašných feromonů různých druhů mravenců⁷. Paralelně byly podobné látky objeveny i v potravinách, a následně zjišťovány i jejich senzorické vlastnosti (vonidla, chutidla). Alkylované, vinylované, alkoxylované pyraziny, popř. alkylsulfanylpyraziny představují významnou skupinu těkavých sloučenin běžně se vyskytujících v naší potravě, kde významným způsobem ovlivňují jejich organoleptické vlastnosti. Typickým příkladem jsou vařené, pečené či smažené produkty rostlinného či živočišného původu⁸. Mechanismus tvorby pyrazinového jádra v přírodních zdrojích spočívá v autokondenzaci α -aminokarbonylových sloučenin (viz schéma 2), příp. kondenzaci α,β -dikarbonylových a α,β -diaminosloučenin (viz schéma 3), vznikajících při fermentaci sacharidů a bílkovin^{9,10}.

Důležitou skupinu látek představují dihydropyraziny, které plní např. i v lidském těle velmi významné funkce (indukce apoptózy, aktivace mitogenem aktivované proteinkinasy, indukce mutagenese)¹¹. 1,4-Dihydropyrazinový kruh je esenciální součástí biochemicky důležitých molekul, jako jsou 1,5-dihydroflaviny a luciferiny¹². Aminopyraziny hrají významnou roli v bioluminiscenčních procesech, resp. v antioxidační terapii. Zajímavými sloučenina-

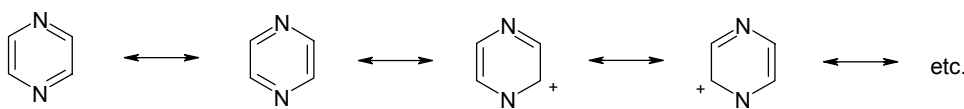


Schéma 1. Rezonanční hybridy pyrazinového kruhu

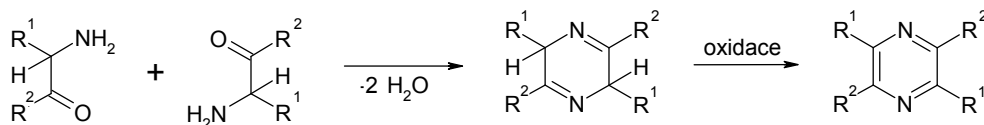


Schéma 2. Autokondenzace α -aminokarbonylových sloučenin na derivát dihydropyrazinu a následná oxidace za mírných podmínek na výsledný substituovaný pyrazin

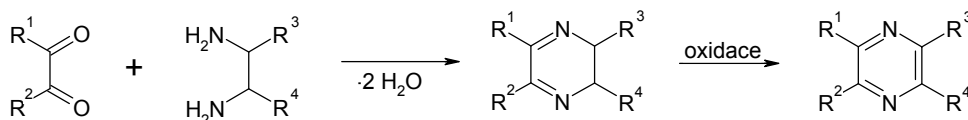
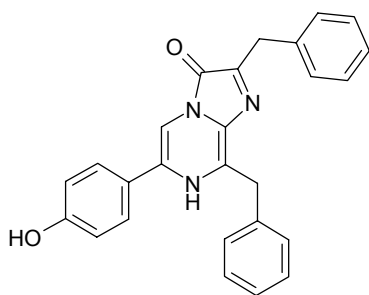


Schéma 3. Kondenzace α,β -dikarbonylových a α,β -diaminosloučenin

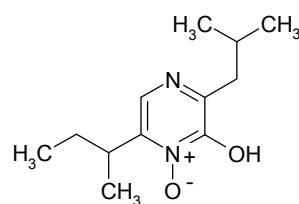
mi z tohoto hlediska jsou např. coelenterazin (imidazolopyrazinonový derivát) a jeho deriváty, které představují nové „vůdčí“ struktury v oblasti vývoje nových léčiv pro antioxidační terapii¹³.



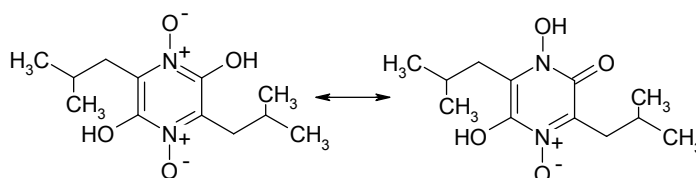
coelenterazin

Přiboudlina obsahuje 2,5-dimethyl-, 2,5-diethyl-, trimethyl-, tetramethyl- a triethylmethylpyrazin. *Galbanum*, tj. klejoprskyřice z ločidla galbanového, se skládá mj. z alkyl- a methoxyalkylpyrazinů. Na kvalitě, tzn. především na chuti a vůni, kakaového másla a kakaových bobů se výraznou měrou podílejí 2,3-dimethylpyrazin, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin, trimethylpyrazin, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazin a tetramethylpyrazin. Zjišťování kvalitativního a kvantitativního zastoupení těchto sloučenin se používá při analytickém hodnocení kakaových bo-

bů. Velké množství alkyl- a vinylpyrazinů bylo identifikováno v kávových a sojových bobech, ve vařeném hovězím masu, smažených burských oříscích, sýrech, pivu a vínu¹⁴. Bondarovich¹⁵ izoloval a identifikoval velké množství pyrazinů a dihydropyrazinů, které vytvářejí kávové aroma. Zároveň bylo zjištěno, že se složení směsi těchto těkavých pyrazinových sloučenin rychle mění, a v závislosti na tom se mění, resp. ztrácí aroma zkoumaných potravin, tj. nejen pražené kávy, ale i dalších pečených či vařených potravin. Alkylované a alkoxylované pyraziny se nacházejí v červeném vínu (např. Cabernet Sauvignon), kde se např. obsah 3-isopropyl-2-methoxypyrazinu¹⁶ pohybuje v koncentraci okolo 9 ng l⁻¹. Tři extrémně „vonící“ pyraziny, tj. 3-isopropyl-2-methoxypyrazin, 2-sec-butyl-3-methoxypyrazin a 3-isobutyl-3-methoxypyrazin byly identifikovány v zeleném hrášku. Pyrazinové deriváty se významným způsobem projevují na chuti a vůni vařených a pečených brambor a chlebové kůrky¹⁷.



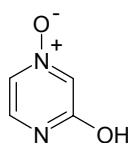
kyselina aspergillová



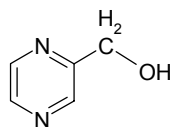
kyselina pulcherriminová a její tautomerní forma

Pyrazinové sloučeniny jsou vytvářeny rovněž celou řadou plísní, např. baktericidně účinné antibiotikum aspergillová kyselina (6-*sec*-butyl-2-hydroxy-3-isobutylpyrazin 1-oxid) byla izolována již v roce 1943 z *Aspergillus flavus*¹⁸, příp. antifungálně aktivní pigment pulcherriminová kyselina je produkována kvasinkou *Candida pulcherrima*¹⁹. Pro jejich vysokou toxicitu se terapeuticky nepoužívají.

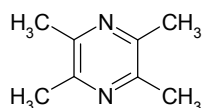
Velmi jednoduchou strukturu mají emimycin, tj. 3-hydroxypyrazin 1-oxid, antifungálně aktivní sloučenina izolovaná z kmene *Streptomyces* No. 2020-1 (cit.²⁰), fungicidní pyrazinmethanol²¹, a dále tetramethylpyrazin, získaný z kmene *Bacillus subtilis* a *B. natto*²².



emimycin



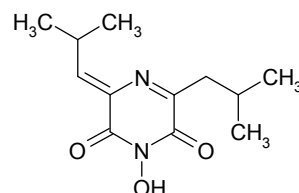
pyrazinmethanol



tetramethylpyrazin

V roce 1993 byl z čínské rostliny *Ligusticum wallichii*, později i z africké rostliny *Jatropha podagrica*, izolován tetramethylpyrazin a pojmenován jako ligustrazin. Jedná se o účinnou substanci drogy používané v tradiční čínské medicíně při léčbě srdečního a mozkového infarktu (vazodilatační, antiagregační účinek). Nedávno bylo zjištěno, že látka na molekulární úrovni zvyšuje hladinu cAMP díky inhibici fosfodiesterasy^{23,24}.

Z poslední doby je třeba jmenovat flutimid, metabolit izolovaný z plísně *Delitshia coferaspora*. Je to částečně oxidovaný pyrazinový derivát s výraznou protivirovou aktivitou (inhibitor endonukleasy). Jeho syntetické analogy charakteru pyrazin-2,6-dionů jsou intenzivně studovány jako potenciální léčiva²⁵.

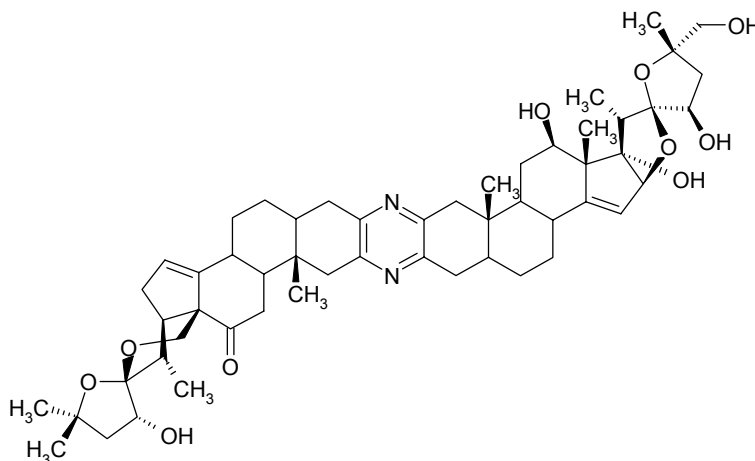


flutimid

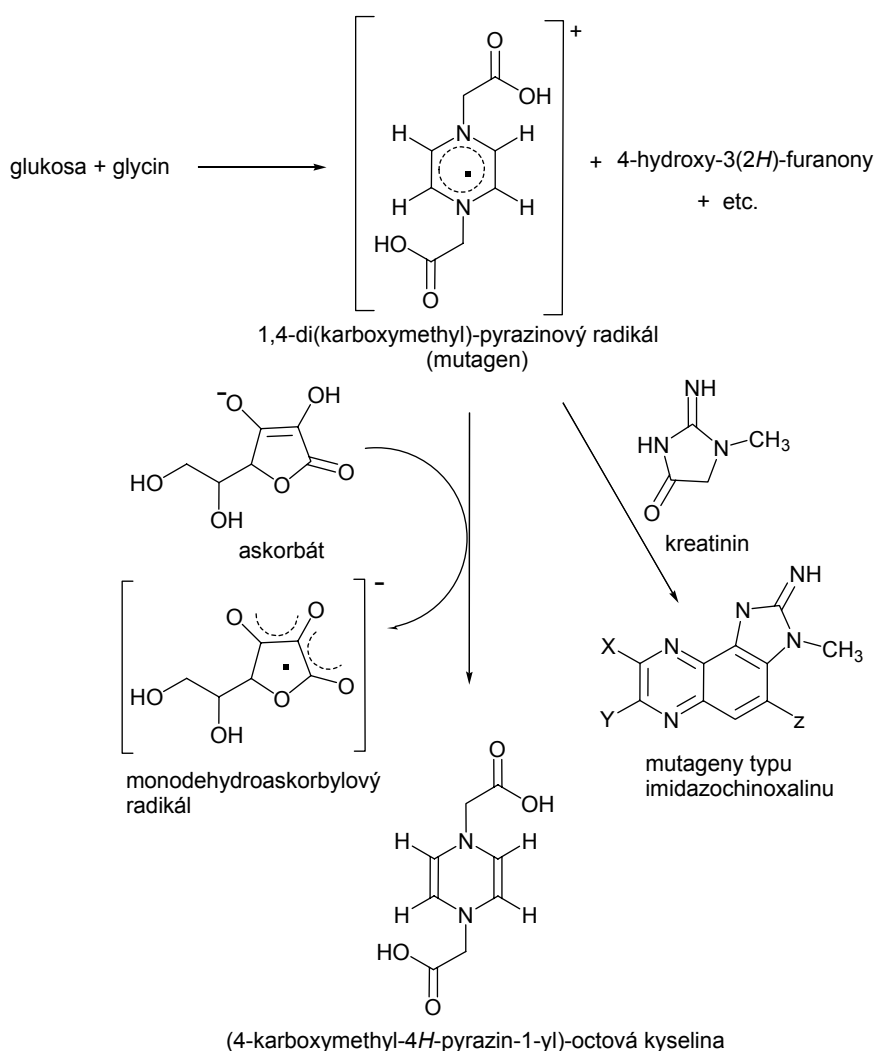
Rovněž mořští živočichové či rostliny produkují deriváty pyrazinu. Jako potenciální protinádorové látky jsou studovány pyraziny substituované steroidem, příkladem může být cefalostatin izolovaný z mořských červů *Cephalodiscus gilchristi*, případně jeho strukturní variace ritteraziny, které byly získány z *Ritterella tokioka*²⁶.

2.1. Nežádoucí a toxické vlastnosti pyrazinů

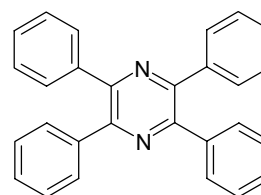
Vedle zpráv o příznivých účincích derivátů pyrazinu se koncem 20. století objevily první varovné informace o nežádoucích či toxických vlastnostech pyrazinů^{27,28}. Velmi toxické diaziny (resp. imidazochinoxaliny) vznikají zahříváním směsi sacharidů, aminokyselin a kreatinu^{29,30}. Ke tvorbě karcinogenních či mutagenních heterocyklických aminů (pyrazinů, pyridinů) dochází zejména při zahřívání masa. Jedná se o typické produkty Maillardovy reakce, neboli neenzymového hnědnutí, které nastává zahříváním nebo skladováním produktů, které obsahují cukry, aminokyseliny nebo jiné dusíkaté látky³¹. Hladinu



cefalostatin

Schéma 4. Vznik pyrazinových mutagenů z glycinu a D-glukosy; (upraveno dle cit.³²⁾)

vznikajících velmi reaktivních pyrazinových kationů či radikálů lze efektivně ovlivnit jednak kontrolou obsahu sacharidů ve zpracovávané potravě, jednak jejich inaktivací přidávkou antioxidantů, např. pomocí vitamínu C (viz schéma 4)³². Některé velmi jednoduché deriváty pyrazinu (např. 2-ethylpyrazin či 2,3-dimethylpyrazin) se mohou projevovat toxicky již v poměrně malých dávkách (nanomoly)³³.



tetrafenylpyrazin

3. Deriváty pyrazinu syntetického původu

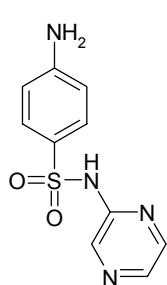
Jako určitou zajímavost lze uvést historicky první zaznamenanou syntézu pyrazinového derivátu tetrafenylpyrazinu (Laurent, 1855), označovaného v dobové chemické literatuře jako Amarone³⁴.

V tepelně upravených potravinách se zcela běžně vyskytuje na 70 alkylovaných, acetylovaných, alkoxylova-

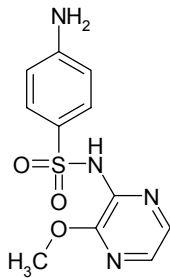
ných pyrazinů, popř. i alkylsulfanylpyrazinů. Jako identická „vonidla“ či „chutidla“ pro výrobu umělých potravinových tuků, instantní kávy nebo při výrobě cukrovinek jsou v potravinářství používány synteticky připravené deriváty pyrazinu. Tyto sloučeniny se stále častěji využívají rovněž ve voňavkářském či v tabákovém průmyslu^{35,36}. Celková roční produkce (a spotřeba) asi 41 identických fragrantů

a flavorantů ze skupiny derivátů pyrazinu činila v roce 1995 v Evropě asi 2700 kg, v USA to bylo v roce 1999 přibližně 2100 kg. Z tohoto množství připadá přibližně 64 % na 3 nejpoužívanější sloučeniny. V Evropě jsou nejoblíbenější 2,3,5-trimethylpyrazin (840 kg v roce 1995), 2-ethyl-3-methoxypyrazin (590 kg) a 2-ethyl-3,5-nebo 6-dimethylpyrazin, zatímco v USA se nejvíce používají 2-acetylpyrazin (920 kg), 2,3,5-trimethylpyrazin (350 kg) a 2,3,5,6-tetramethylpyrazin (140 kg). Předpokládaný příjem těchto aditiv průmyslově upravovaných potravin činí ve vyspělých státech světa okolo 120 µg na osobu a den³⁷.

Synteticky připravené pyraziny vykazují rovněž celou škálu farmakologických účinků. Řada z nich se používá jako důležitá léčiva. Prvními do klinické praxe zavedenými léčivy byla sulfonamidová chemoterapeutika sulfapyrazin (2-sulfanylaminopyrazin v roce 1941)³⁸ a jeho později zavedená strukturální varianta sulfalen³⁹. Pyrazinové jádro zde není farmakoforem; 1,4-diazin v těchto molekulách je součástí postranního substituentu ovlivňujícího pouze farmakokinetické vlastnosti léčivé látky.

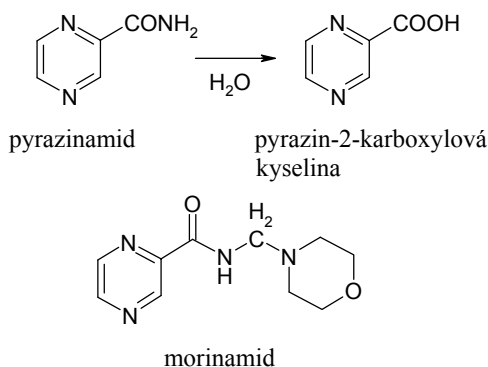


sulfapyrazin



sulfalen

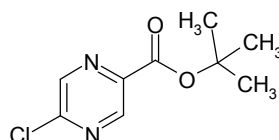
Diametrálně odlišná role připadá pyrazinovému kruhu v případě antituberkulotika pyrazinamidu (amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny)^{40,41}. Jedná se o prekurzor (proléčivo), neboť uvnitř tuberkulotické buňky hydrolýzou vzniká antimykobakteriálně velmi aktivní pyrazin-2-karboxylová kyselina. Ta byla původně syntetizovaná počátkem 30. let dvacátého století jako analeptikum⁴². Mecha-



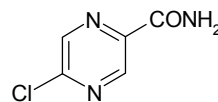
morinamid

nismus účinku pyrazinamidu spočívá v intracelulární inhibici nikotinamidasy, resp. pyrazinamidasy. V 60. letech připravený derivát morinamid (*N*-morfolinomethylamid pyrazin-2-karboxylové kyseliny) v praxi neuspěl, jelikož u se něho nepotvrdily předpoklady jednak o jeho nižší toxicitě, jednak o jeho biokonverzi na pyrazinamid³⁹.

Modifikace struktury antituberkulotika pyrazinamidu se stala od konce 50. let dvacátého století nosným programem řady laboratoří, které se snažily a stále snaží vyvinout antimykobakteriálně účinnější léčivo než je zmíněná, v praxi stále velmi ceněná látka. K perspektivním látkám patří jednoduché chlorované pyrazinové deriváty charakteru proléčiv (estery či amidy pyrazinkarboxylové kyseliny)⁴³.

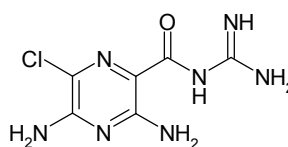


tert-butylester 5-chloropyrazin-2-karboxylové kyseliny

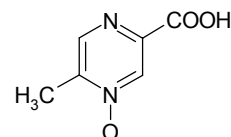


5-chloropyrazin-2-karboxamid

Důležité diuretikum (kalium šetřící) ze skupiny derivátů pyrazinu charakteru amidinu amilorid se často používá při léčbě hypertenze³⁹. Praktickým výstupem systematického studia hypolipidemických vlastností série derivátů pyrazinu, získaných homolytickou alkylací pyrazinového jádra, se stal acipimox, tj. 4-oxid 5-methylpyrazin-2-karboxylová kyselina. Látka byla zavedena do terapie hyperlipidemií praxe koncem 80. let 20. století⁴⁴.

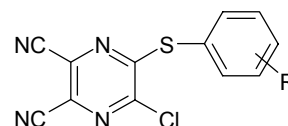


amilorid



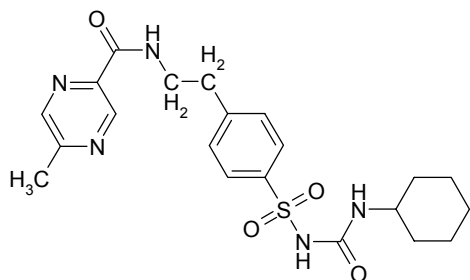
acipimox

U látek odvozených od pyrazinu bylo nejvíce fungicidních látek dosud nalezeno ve skupině pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Portnoy a spol.⁴⁵ připravil a proti plísni bramborové otestoval arylthioderiváty pyrazinu.

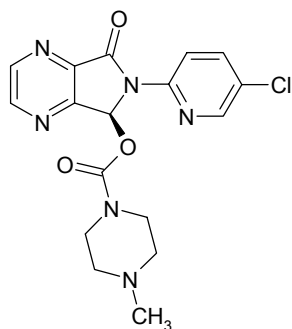


substituovaný 5-chlor-6-fenylsulfanylpyrazin-2,3-dikarbonitril

Pyrazinový kruh najdeme také ve struktuře perorálního antidiabetika glipizidu. Jedná se o derivát sulfonilmocoviny s výraznou hypoglykemickou aktivitou⁴⁶. Na přelomu 80. a 90. let se v praxi objevila strukturně nová hypnotika ze skupiny cyklopyrrolonů. První látkou z této rodiny nebenzodiazepinových derivátů (s farmakologickým profilem velmi podobným např. nitrazepamu) je zopiklon, součástí jehož polycyklického uspořádání je i pyrazinové jádro⁴⁷. Původně se léčivo používalo ve formě racemátu, nyní je zaváděno do praxe v podobě eutomeru jako eszopiklon⁴⁸.



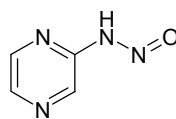
glipizid



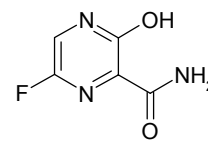
eszopiklon

Z 90. let pocházejí zprávy o úspěšném průběhu preklinického zkoušení nového antineoplastika, strukturně poměrně jednoduchého derivátu pyrazinu pyrazindiazohydroxidu, tj. *N*-nitrosopyrazinaminu. Reakcí s vodou vzniká z této reaktivní látky méně toxický 2-hydroxypyrazin, který tvoří s DNA adukty⁴⁹. Zatímco tímto efektem dochází k inhibici syntézy DNA, nedochází současně k ovlivnění syntézy RNA či bílkovin⁵⁰. Nedávno byly publikovány účinky T705, tj. 6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamidu, jako nového inhibitoru viru chřipky A, B a C (cit.⁵¹). Mechanismus účinku antineoplastika pyrazindiazohydroxidu i antivirotika 6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamidu zřejmě spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin, obě modifikované nukleobáze mohou být aktivní jako antimetabolity či interkalátory⁵². Ze širších derivátů pyrazinu pozornost zasluhují dvě jednoduché molekuly, jednak allylsulfanylpyrazin, látka vyvíjená opět

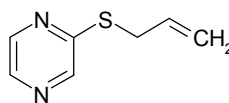
jako potenciální antineoplastikum, jednak ethylsulfanylpyrazin, který je využíván v potravinářství pro své výrazné chuťové vlastnosti³⁶.



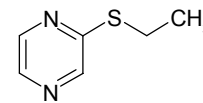
pyrazindiazohydroxid



6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamid

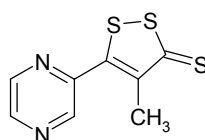


allylsulfanylpyrazin

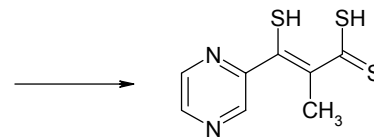


ethylsulfanylpyrazin

Z první poloviny 90. let minulého století pocházejí zprávy o vývoji nového chemoprotektiva. Oltipraz, chemicky 5-[2-pyrazinyl]-4-methyl-1,2-dithiol-3-thion, byl původně vyvíjen jako antischistosomiální látka, tj. anthelmintikum proti tropickému parazitu krevničce (*Schistosoma*, skupina motolic). Později bylo zjištěno, že látka má schopnost zvyšovat hladinu glutathion-S-transferasy a lze ji využít jako antiretrovirovou látku, popř. jako antineoplastikum^{53,54}. Oltipraz lze považovat za prekursor, neboť dochází k jeho biokonverzi na účinnou 3-merkapt-2-methyl-3-pyrazin-2-yl-dithioakrylovou kyselinu.



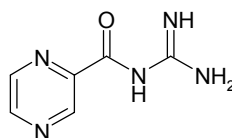
oltipraz



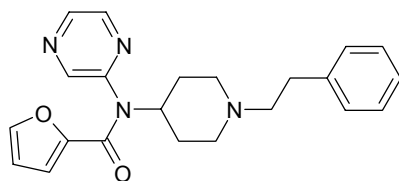
3-merkapt-2-methyl-3-pyrazin-2-yl-dithioakrylová kyselina

Velmi jednoduchou strukturu má pyrazinoylguanidin vyvíjený jako lipolytikum⁵⁵.

Mirfentanil je opiátové analgetikum s nižším výskytem vedlejších účinků, chemicky se jedná o (1-fenethylpiperidin-4-yl)-pyrazin-2-ylamid furan-2-karboxylové kyseliny^{56,57}. V mozku má cílové místo účinku (6-chlor-2(1-piperazinyl)pyrazin MK-212. Látka je agonistou jednak serotoninových 5-HT1A/2A/2C receptorů, podobně jako amfet-

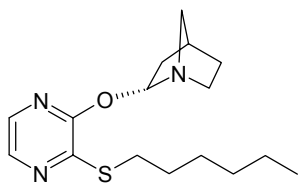


pyrazinoylguanidin



mirfentanil

aminové deriváty DOI či DOB, avšak má vyšší afinitu k 5-HT_{2C} receptorům. Protože oproti zmíněným zneužívaným látkám nemá tento pyrazinový derivát halucinogenní účinky, uvažuje se o jeho využití při odvykací kúře⁵⁸. Z posledního období přicházejí zprávy o vývoji (3*R*,4*R*)-3-(hexylsulfanylpyrazin-2-oxy)-1-azabicyclo[2.2.1]heptanu WAY-132983, tj. potenciálního agonisty muskarinových M₁ receptorů. Na základě dosavadních slibných výsledků preklinického hodnocení se předpokládá, že by tato látka mohla zlepšovat kognitivní funkce u pacientů s Alzheimerovou nemocí⁵⁹.



WAY-132983

4. Závěr

Desítky alkylovaných pyrazinů, dále alkylarylsubstituované pyraziny (5-methylchinoxalin), alicyklicky substituované pyraziny [(cyklohexylmethyl)pyrazin, 5,6,7,8-tetrahydrochinoxalin, 5-methyl-6,7-dihydro-5*H*-cyklopentapyrazin], pyrazinové deriváty s kyslíkatou funkční skupinou v postranním řetězci (acetylpyrazin, methoxyderiváty pyrazinu), příp. obsahující v postranním řetězci thiolovou či sulfidovou funkční skupinu (2-pyrazinylethanthiol, pyrazinylmethyl methyl sulfid (3,5 nebo 6)-(methylthio)-2-methylpyrazin) jsou součástí živé přírody, a tedy i běžnou součástí lidské stravy. Tyto sloučeniny jsou využívány jako aditiva při průmyslovém zpracování potravin. Vedle toho nelze pominout jejich případné toxické vlastnosti.

Deriváty pyrazinu našly již své pevné místo v moderní farmakoterapii a v nejbližší budoucnosti bude paleta léčiv jistě obohacena o další pyrazinové sloučeniny jak syntetického, tak i přírodního původu. Význam pyrazinového kruhu pro biologický účinek lze v výše představených sloučenin primárně hodnotit podle velikosti zkoumané molekuly. U relativně malých sloučenin je přítomnost pyrazinu podmínkou účinku, a to na základě podobnosti s tělu vlastní látkou, např. s nikotinamidem (tj. pyridinkarboxamidem) např. u pyrazinamidu, popř. na základě po-

dobnosti s nukleovou bází odvozenou od pyrimidinu (tj. 1,3-diazinu) v případě nově vyvíjených antineoplastik či antivirotik s pyrazinovým (1,4-diazinovým) uskupením. U rozsáhlejších molekul přináší připojení pyrazinového jádra celé sloučenině specificky bazické, resp. slabě aromatické vlastnosti.

Práce je součástí výzkumného záměru MSM 0021620822 a IGA MZd ČR I A8238-3.

LITERATURA

1. Nováček L., Palát K., Čeladník M.: Chem. Listy 57, 298 (1963).
2. Pratt Y. T.: The Pyrazines and Piperazines. In: Elderfield R. C.: Heterocyclic Compounds. Vol. 6., str. 377. J. Wiley & Sons, New York 1957.
3. McCullough K. J.: Pyrazines and Related Ring Structures. In: Ansell M. F.: *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*. 2. vyd., Vol. IV, s. 93-130. Elsevier, New York 1995.
4. Brown D. J.: *The Pyrazines. Supplement 1*. J. Wiley & Sons, str. 576. New York 2002.
5. Woolfson A., Rothschild M.: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B 242, 113 (1990).
6. Doležal M.: *Pyraziny přírodního a syntetického původu*. Sborník 39. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. až 28. listopadu 2004, v Chem. Listy 98, 1006 (2004).
7. Duffield R. M., Blum M. S., Wheeler J. W.: Comp. Biochem. Physiol. 54B, 439 (1976); In Chem. Abstr. 85, 14043w (1976).
8. Fernandez X., Kerverdo S., Dunach E., Lizzani-Cuvelier L.: Actualite Chim. 4, 4 (2002).
9. Maillard L. C.: Compt. Rend. 154, 66 (1912); Ann. Chim. 9, 258 (1916).
10. Maga J. A.: Food Rev. Inter. 8, 479 (1992).
11. Takechi S., Yamaguchi T., Nomura H., Minematsu T., Nakayama T.: Mutat. Res. 560, 49 (2004).
12. Shimomura O., Johnson F. H.: Nature (London) 256, 236 (1975).
13. Dubuisson M. L. N., Rees J. F., Marchand-Brynaert J.: Mini-Rev. Med. Chem. 4, 421 (2004).
14. Dlabal K.: *Sírné deriváty pyrazinu*. (písemná práce k odborné kandidátské zkoušce), str. 37. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Hradec Králové 1986.
15. Bondarovich H.: J. Agr. Food Chem. 15, 1093 (1967).
16. Allen M. S., Lacey M. J., Boyd S. J.: J. Agricult. Food Chem. 43, 769 (1995).
17. Barlin G. B.: *The Pyrazines*, str. 682. John Wiley & Sons, New York 1982.
18. White E. C., Hill J.H.: J. Bacteriol. 45, 433 (1943).
19. MacWilliam I. C.: J. Gen. Microbiol. 21, 410 (1959); In Chem. Abstr. 54, 6 874b (1960).
20. Terao M.: J. Antibiot. 16, 182 (1963); In Chem. Abstr. 60, 5495h (1964).
21. Taylor H. M., Holden H. E. (Lilly, Eli and Co.): Pyra-

- zine fungicides. Ger., Offen. 1,913,726 (1969); In Chem Abstr. 72, P20872a (1970).
22. Kosuge T., Kaniya H.: Nature 194, 1099 (1962).
 23. Alice Lai Shan Au, Yiu Wa Kwan, Ching Chi Kwok, Rong-Zhen, Zhang, Guo-Wei He: Eur. J. Pharm. 468, 199 (2003).
 24. Liu S. Y., Sylvester D. M.: Life Sci. 55, 1317 (1994).
 25. Singh S. B., Tomassini J. E.: J. Org. Chem. 66, 5504 (2001).
 26. Kasal A.: Chem. Listy 97, 921 (2003).
 27. Stich H. F., Stich W., Rosin M. P., Powrie W. D.: Food Cosmet. Toxicol. 18, 581 (1980).
 28. Yamada K., Shimizu A., Ohta A.: Biol. Pharm. Bull. 16, 203 (1993).
 29. Stratil P., Kubáň V.: Chem. Listy 99, 3 (2005).
 30. Sinha R., Kulldorff M., Chow W. H., Denobile J., Rothman N.: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 10, 559 (2001).
 31. Čopíková J.: Chem. Listy 93, 3 (1999).
 32. Kiyomi Kikugawa: Foods Food Ingredients J. Jpn. 208, 174 (2003).
 33. Melkonian G., Eckelhoefer H., Wu M., Wang Y. H., Tong C., Riveles K., Talbot P.: Toxicol. Sci. 75, 393 (2003).
 34. Pratt J. Y.: *The Pyrazines and Piperazines*. v: Elderfield R. C.: *Heterocyclic Compounds* Vol. 6, str. 367. J. Wiley & Sons, New York 1957.
 35. Zviely M., Shqara E. A., Hodrien D.: Perfumer Flavorist 28, 30 (2003).
 36. *Flavors & Fragrances* 2003-4, str. 140. Aldrich Chemical Company, Milwaukee 2003.
 37. Mattia A., Renwick A. G., Sipes I. G.: *Pyrazine derivatives. V: Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series: 48*, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je12.htm> (20. 10. 2005).
 38. Sansville J. W., Spoerri P. E.: J. Am. Chem. Soc. 63, 3153 (1941).
 39. Melichar B. (ed.): *Chemická léčiva*, str. 705. Avicenum, Praha 1987.
 40. Kushner S., Dalalian H., Sanjurjo J. L., Bach F. L. Jr., Safir S. R., Smith V. K. Jr., Williams J. H.: J. Am. Chem. Soc. 74, 3617 (1952).
 41. Yamamoto T., Moriwaki Y., Takahashi S., Hada T., Higishano K.: Biochem. Pharmacol. 36, 2415 (1987).
 42. Dalmer O., Walter E. (E. Merck): Ger. 632,257 (1936); v Chem. Abstr. 30, 6894 (1936).
 43. Bergmann K. E., Cynamon M. H., Welch J. T.: J. Med. Chem. 39, 3394 (1996).
 44. Ambrogi V. B., Bloch K., Daturi S., Logemann W., Parenti M. A.: J Pharm Sci. 61, 1483 (1972).
 45. Portnoy R. Ch. (du Pont de Nemours E. I., and Co.): U.S. 4,113,724 (1978); V Chem. Abstr. 90, P72233j (1979).
 46. Ambrogi V. B., Logemann W. (Carlo Erba): DE 2012138 (1970); V Chem. Abstr. 73, P120674b (1970).
 47. Cotrel C., Jeanmart C., Messer M. N. (Rhône-Poulenc): DE 2300491 (1973); V Chem. Abstr. 79, P92284c (1973).
 48. Anonym: Drugs News Perspect 18, 282 (2005).
 49. Whitehead R. P., Unger J. M., Flaherty L. E., Kraut E. H., Mills G. M., Klein C. E., Chapman R. A., Doolittle G. C., Hammond N., Sondak V. K.: Invest. New Drug 20, 105 (2002).
 50. Edelman M. J., Meyers F. J., Grennan T., Lauder J., Doroshov J.: Invest New Drugs. 16, 179 (1998).
 51. Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Minami S., Watanabe Y., Narita H., Shiraki K.: Antimicrob. Agents Chemother. 46, 977 (2002).
 52. Wang L., Schultz P. G.: Chem. Commun. 1, 1 (2002).
 53. Prochaska H. J., Chavan S. J., Baron P., Polsky B.: J. Cell. Biochem. Suppl. 22, 117 (1995).
 54. Kessler F. K., Ritter J. K.: Carcinogenesis 18, 107 (1997).
 55. A-Rahim Y. I., Beyer K. H. Jr., Vesell E. S.: Pharmacology 53, 197 (1996).
 56. Prochaska H. J., Yeh Y., Baron P., Polsky B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 3953 (1993).
 57. France C. P., Winter G., Medzihradsky F., Seggel M. R., Rice K. C., Woods J. H.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 258, 502 (1991).
 58. Lee H. S., Bastani B., Friedman L., Ramirez L., Meltzer H. Y.: Biol. Psychiatry 31, 460 (1992).
 59. Bartolomeo A. C., Morris H., Buccafusco J. J., Kille N., Rosenzweig-Lipson S., Husbands M. G., Sabb A. L., Abou-Gharbia M., Moyer J. A., Boast C. A.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 584 (2000).

M. Doležal (*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Biologically Active Pyrazines of Natural and Synthetic Origin**

In plants or insects, pyrazines play the roles of attractants, feromones and signal substances. Similar substances were found in food and therefore their sensoric properties were investigated. Pyrazines are also synthesized by a number of fungi, such as antibiotic aspergillilic acid and fungicidal pigment pulcherrimin. Synthetic pyrazines are used as additives in food manufacture and in tobacco industry. Some of them are important pharmaceuticals such as sulfonamides sulfapyrazine and sulfalene, antituberculous pyrazinamide, potassium-sparing diuretic amiloride, hypolipidemic acipimox, peroral antidiabetic glipizide, benzodiazepine hypnotic eszopiclone, potential antineoplastic pyrazine diazohydroxide and antiviral 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide.

HORMONY A LÁSKA

LUBOSLAV STÁRKA

Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
lstarka@endo.cz

Došlo 13.12.05, přijato 16.2.06.

Klíčová slova: zamilovanost – romantická láska, stresové hormony, návyk, oxytocin, katecholaminy, serotonin, nervový růstový faktor

Obsah

1. Úvod
2. Teorie o citu lásky
3. Fáze lásky
 - 3.1. Romantická láska – stresové hormony
 - 3.2. Stabílní láska – endorfiny ?
 - 3.3. Fáze reprodukce a péče o potomstvo – oxytocin – hormon věrnosti
4. Závěr

1. Úvod

Láska je snad hlavním tématem krásné literatury a důležitým motivem i jiných oblastí umění, ale na její podstatu ani umění, ani věda odpověď dosud neumí dát. Partnerskými vztahy od zamilování až po rozchod, domácí násilí a jiné krajní jevy se zabývá právo, sociologie nebo psychologie, ale pro medicínu nebo biochemii je láska oblastí dosud jen nepatrně zmapovanou. O tom, jak to je u lidí se stavem zamilovanosti a lásky z hlediska hormonálních změn, existuje jen velice skromný počet vědeckých prací^{1–4}. Na internetu ve vyhledávacím programu PubMed pod heslem „falling in love AND hormones“ najdeme jen 3 odkazy, pod heslem „love AND hormones“ kolem třicítky odkazů, z nichž převážná většina má s tématem spojitost jen náhodnou a irelevantní.

2. Teorie o citu lásky

Na otázku, co je láska, nedává tedy odpověď ani věda, ani krásná literatura, ačkoliv láska je nepochybně důležitým psychosociálním fenoménem. Podle W. Jankowiaka⁵ z nevadské university v Las Vegas má ze 166 studovaných kultur romantická láska místo ve 147 kulturních

společenstvích. Je tedy téměř univerzálním jevem a velice obecnou, i když ne nezbytnou, součástí reprodukční biologie člověka. Zamilovanost představuje – v mnoha případech – úvod do dlouhodobých partnerských vztahů. Někteří jiní vědci však mezi základní primitivní lidské city, jako je strach, hněv nebo radost, lásku neřadí.

Že zamilovanost je provázána – nebo vyvolávána – živými ději v centrální nervové soustavě, pomáhá dnes řešit moderní projekce neurologických dějů do různých lokalit v mozku zamilovaných pomocí zobrazovacích metod, jako je magnetická rezonance nebo pozitronová emisní tomografie. Ale ani tyto studie^{6,7} nejsou příliš čtené a docházejí pouze k závěru, že oblasti aktivace a deaktivace nejsou shodné s místy projekce běžných emocí. Víme, že v mozku jsou aktivovány bilaterálně medialní insula a kortex předního cingula a subkortikálně nucleus caudatus a putamen, deaktivovány gyrus cingulatus posterior, amygdala, pravostranně oblasti v prefrontálním, parietálním a středním temporálním kortexu, ale zatím toho mnoho nevíme, které působky, ať už transmittery nebo hormony, se na těchto pochodech účastní.

Více je studií o lásce z aspektu psycho-sociálního a kulturního nebo pokusů na zvířatech v době námluv z pohledu neurobiologického. V experimentálních pracích o tvorbě biologického páru je potvrzena úloha osy hypothalamus-hypofýza-nadledvina a úloha oxytocinu^{8,9}. Snaha poznat endokrinní pozadí stavu zamilovanosti a lásky u lidí samozřejmě nesmí znamenat degradaci tohoto stavu na jednoduchá chemická schémata.

Láska je skutečně velice pevně zakotvena v evoluční historii člověka, v jeho biologii i biochemii¹⁰. Byla zřejmě naprogramována do našich genů, protože pomáhala udržovat pospolu lidský pár po dobu nezbytnou pro výchovu potomků až do prvních známek jejich samostatné životaschopnosti. K naší škodě je toto zřejmě genově zakotvené období omezeno na pouhé asi čtyři roky. Toto „čtyřroční pokušení“ se dosud zcela zřetelně projevuje na statistice rozvodů: je tomu tak ve většině z 62 kultur, které studovala H. Fisherová¹¹. Zjistila zcela jasný vrchol rozvodovosti ve čtvrtém roce po sňatku. Další dítě však posunuje následný známý nový vrchol rozvodovosti na sedm roků po svatbě. Jiné doklady ukazují, že romantická zamilovanost netrvá většinou déle než jeden rok³.

Romantická láska není tedy věčná ani výlučná a je třeba na ni pohlížet jako na dynamický proces. Na rozdíl od pojetí lásky v umění to také není zvláštní stav srdce nebo duše. Z pohledu endokrinologie jde spíš o hru hormonů a transmittérů, podle některých autorů snad přímo o chemickou intoxikaci organismu. Není divu, je-li pro někoho zamilovanost stresem, protože chemické cesty a hormonální faktory jsou u lásky zřejmě podobné jako u stresu.

Existují však i teorie, které s účastí hormonů přilíší

nepočítají^{11–14} nebo hledají spíše paralelu s pochody typickými pro závislost, které ovšem také nejsou příliš jasné a v nichž zřejmě neurohormony budou hrát důležitou roli¹⁵.

3. Fáze lásky

Řada autorů se přidržuje časového rozdělení lásky na fázi romantické lásky, na dobu jejího naplnění a na konečnou fázi, jejíž hlavní úlohou je reprodukce a starost o mláďata.

3.1. Romantická láska – stresové hormony

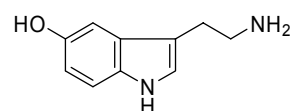
O romantické zamilovanosti panovala představa, že v ní hrají roli katecholaminy – adrenalin, noradrenalin a jejich metabolity – a také stresový steroidní hormon kortizol a jeho regulátory – kortikoliberin CRH a adrenokortikotropní hormon ACTH. Ve fázi naplněné lásky by snad měly hrát roli endorfíny, endogenní polypeptidy s výrazným účinkem na mozková centra pocitu libosti, a ve fázi péče o potomstvo podle posledních názorů dominuje vliv peptidu oxytocinu a vasopresinu, secernovaných zadním lalokem hypofýzy.

Jedna z prvních hypotéz o biologické a endokrinní podstatě zamilovanosti byla představa o podobné struktuře katecholaminových transmiterů a amfetaminů, které mohou vyvolávat řadu účinků, podobných počátečními stadii romantické lásky. Ve své prvé fázi romantické zamilovanosti je láska snad excitací stresového charakteru. Je řada dokladů^{16,17}, že stresové situace usnadňují tvorbu nových sociálních vazeb i intimních svazků u lidí i u zvířat. Euforie při zamilovanosti by pak byla pochopitelná proto, že v ní rozhodují metabolity hormonů dřeně nadledvin: noradrenalin (*I*), dopamin (*II*) a zejména s metabolismem katecholaminu spojený fenylethylamin (*III*). Katecholaminy, jak se zdá, však mohou být spíše známkou psychické nepohody, jak o tom svědčí jejich vyšší hladina u mužů a žen v rozvodových situacích, v manželských hádkách apod. V těchto stresových situacích je kromě adrenalinu také zvýšena hladina ACTH⁴. V souvislosti s katecholaminy byla – spíše v úvahách – věnována pozornost bio-

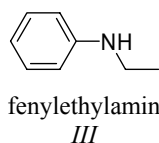
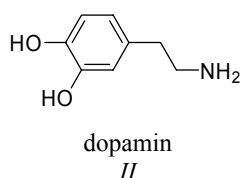
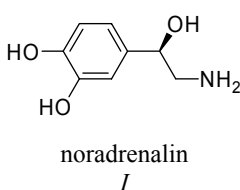
genním aminům, které jsou svými účinky v něčem blízké amfetaminům. Amfetaminy mají typický charakter návykových drog a zamilovanost skutečně může být jistou formou narkomanie^{18,19}.

β-Fenylethylamin spolu s tyraminem, tryptaminem a octopaminem patří mezi biogenní aminy, které jsou přítomny ve stopovém množství v nervovém systému a jsou vázány na specifickou rodinu receptorů svázaných s G-proteinem (GPCR). Jejich funkce a dokonce i původ v nervovém systému nejsou dostatečně známy. β-Fenylethylamin a jeho metabolity (fenylethanolamin, tyramin, acetyl-fenylethylamin a fenylacetaldehyd) působí na dopaminergní systém v některých oblastech mozku, zejména v nigrostriatu. U zvířat v experimentu bylo sledováno chování po i.v. injekci aminů do mozku a bylo zjištěno, že β-fenylethylamin a acetyl-fenylethylamin indukovaly rotace zvířat ipsilaterálně, tedy na stejnou stranu, do jaké byla látka do mozku injikována²⁰. Jistě to nemá nic společného s tím, že se někomu láskou hlava točí, ale svědčí to o výrazném účinku na centrální mozkový systém. Jde o psychomotoriku stimulující bioamin, který působí na acetylcholinový systém ve striatu a inhibuje dopaminovou neuronální aktivitu cestou dopaminových D(2) receptorů.

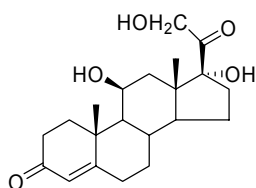
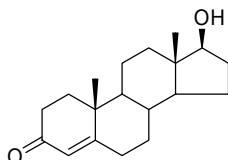
Důkazy však pro teorii přisuzující stav zamilovanosti působení fenylethylaminu nebyly přineseny žádné²¹. Bylo však prokázáno¹, že romantická láska je provázena snížením transportéru destičkového serotoninu a tedy s poruchou dostupnosti serotoninu (*IV*), podobně jako je tomu u některých psychóz anebo u patologické žárlivosti²², a že zamilovanost je také spojena se signifikantním zvýšením nervového růstového faktoru NGF³. Tento neurotropin měl dokonce pozitivní korelaci s intenzitou romantické lásky a po 12–24 měsících postupně, jak se romantická láska měnila na stabilní stav nebo vyprchala, se hladina NGF normalizovala a nebyla odlišná od kontrolní skupiny. V této spojitosti je jistě zajímavé, že hladina některých neurotopinů, včetně NGF, se zvyšuje při libání a že se touto cestou zlepšují i alergické kožní reakce²³.



serotonin
IV



Podobný přístup k studiu zamilovaných párů jako autoři zabývající se neurotropiny měla i skupina kolem prof. Marazzitiové^{1,2,22}. Srovnávala zamilované páry nejen s běžnými kontrolními osobami, ale sledovala je po dobu delší než rok, kdy už pak nešlo o lásku romantickou. Zjistila² u všech zamilovaných vyšší kortizol (*V*) a snížení folikuly stimulujícího hormonu FSH a u zamilovaných mužů snížení testosteronu (*VI*), což svědčí pro chápání zamilovanosti jako stresové situace. Pozoruhodné v této práci je však zvýšení testosteronu u zamilovaných žen v kontrastu s jeho poklesem u mužů. Také ve srovnání s většinou obratlovců, u nichž dvoření a námluvy u samců

kortizol
Vtestosteron
VI

jsou téměř vždy spojeny se vzestupem androgenů (u sloňích samců v říji dokonce padesátinásobné zvýšení testosteronu), se endokrinní sekrece zamilovaných mužů chová značně nestandardně. Zamilovanost však nelze ztotožňovat se sexuálními vzrušením, které má zcela jiné fyziologické charakteristiky, i když se někdy oba tyto stavy setkávají.

Nejen zamilovanost, ale i odloučení partnerů v úzkém svazku vede k stresové reakci systému hypothalamus-hypofýza-nadledviny²⁴.

3.2. Stabilizace lásky – endorfiny?

Navázání sociálních vazeb ulehčuje nástup fyziologického stavu se sníženou anxiitou a redukovanými negativními pocity^{25–27}. Skutečně také u většiny zamilovaných počáteční stadium excitace a euforie přechází do stadia, které se vyznačuje pocitem bezpečí, klidu a vyrovnanosti a které je ovládáno jiným typem hormonů. Převládá zřejmě vliv endorfinů, látek, které své působení uplatňují přes stejné receptory jako exogenní opiáty. Opět tedy jakási forma narkomanie, ale odlišná od fáze první¹⁸. Na rozdíl od amfetaminových derivátů nejsou endorfiny produkovány nadledvinou, ale převážně mozkem, a mají nikoli excitací, ale zklidňující a bolest tišící účinek.

3.3 Fáze reprodukce a péče o potomstvo – oxytocin, hormon věrnosti

Dalším hormonem, který však již skutečně patří k nástrojům biologických regulací vlastních reprodukčních pochodů, je oxytocin. Doménou jeho působení je vlastně již další fáze lásky – fáze reprodukce a péče o potomstvo. Je produkován hypothalamem a uvolňován z hypofýzy – mimo jiné při milostném aktu – a způsobuje svalové kontrakce. Oxytocin v povědomí lékařů je spojován spíše se ženami než muži. Pod jeho vlivem totiž dochází u žen k porodním stahům i k ejekci mléka, ale je i významným hormonálním regulátorem sexuálního a mateřského chování nebo pozitivních sociálních kontaktů snižujících anxiitu^{8,9,28–32}. Snad působí i na matky, aby se mazlily se svými

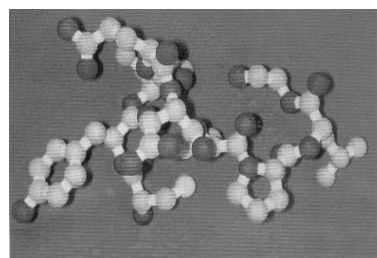
mi dětmi a asi podobnou účinnost má i na aktivitu mezi ženou a mužem. Zvýšené vyplavení oxytocinu je součástí biochemických dějů při orgasmu: u mužů při sexuálním vyvrcholení stoupá jeho hladina několikanásobně a u žen dokonce ještě více než u mužů³³. Jeho hladina se zvyšuje tělesným kontaktem³⁴.

Vzájemné dotyky partnerů přispívají tak i k oxytocinem zprostředkované inhibici adrenergní aktivity, zejména snížení krevního tlaku, a to zejména u žen. Oxytocin (VII), sekret neurohypofýzy, vyvolává také pocit uvolněného uspokojení a náklonnost a je evidentně antistresovým působkem^{31,32} a podle posledních poznatků zvyšuje oxytocin vzájemnou důvěru mezi lidmi³⁵.

Hladiny oxytocinu u žen i mužů jsou podobné a receptory pro oxytocin se nalézají v řadě tkání, zejména v míše, u obou pohlaví. Oxytocin byl také označen jako „hormon věrnosti“, protože řada poznatků na zvířatech ukázala, že je značný rozdíl v oxytocinových receptorech mezi blízkými druhy hrabošů, z nichž jeden (*Microtus ochrogaster*) je monogamní a žije v sociální struktuře více zvířat, zatímco druhý (*Microtus pennsylvanicus* a *M. monastnus*) je polygamní a žije soliterně^{36,37}. Monogamní chování a péči o mláďata u samců *M. ochrogaster* lze zrušit injekcí antagonistů oxytocinu atosibanu (Tractocile®; 1-deamino[D-Tyr(Et)2,Thr4]ornitinvasotocin) anebo ještě účinnějšího nově vyvíjeného syntetického peptidu barusibanu (FE 200440, Ferring Pharm.), používaných jako tokolytika. Na druhé straně monogamní chování je upevňováno prostřednictvím dopaminových D2, ale nikoli D1 receptorů.

V neurobiologii sociální vazby – partnerském vztahu, dvoření, věrnosti, péči o mláďata, vztahu k ostatním jedincům svého druhu – hrají neuropeptidy oxytocin a vasopresin významnou úlohu^{38,39}. Tyto „hormony lásky a strachu“ modulují integrace informací v amygdale⁴⁰.

I když, jak se zdá, si věda ví rady, jak vysvětlit pocity v různých stádiích lásky a jak jim přiřadit různou důležitost pro plození i výchovu lidských mláďat, zůstává



Obr. 1. Model molekuly oxytocinu; v oblasti Cys1 je kumulován negativní náboj, v oblasti Gly9 pozitivní náboj. (model podle Ing. R. Bílka, CSc., Endokrinologický ústav, Praha)

stále záhadou, proč tyto děje v nás iniciuje právě ten jeden nebo ta jedna pravá mezi tisíci, jaká to jiskřička přeskóčí, aby vyvolala ony sekvence sekrecí hormonálních drog a afrodisiak a proč ani co nejsprávněji v lékárně namíchané hormonální koktejly nemohou působit jako nápoj lásky tam, kde pro to nejsou zatím ještě nepostižitelné předpoklady. U některých živočichů pro tyto facilitace nacházíme biologické důvody, např. ve feromonech⁴¹ a jiných vůních či zápaších, v zasnubních rituálech a schématech dvoření, ale u člověka jsou zřejmě tyto signální soustavy mimo (hlavní) provoz.

Tolik zatím dodávají k otázce lásky naše znalosti o hormonech a endokrinologii. Snad v nedaleké budoucnosti budeme o chemii lásky znát více a budeme moci ordinovat antihormony proti nešťastné lásce nebo působky, posilující partnerskou věrnost. Doufám ale, že láska zůstane ještě dlouho elixírem složeným z ingrediencí tělesných i duševních, z reality i imaginace, poezie i bušení srdce, i když snad i trochu z kortizolu, endorfinů a oxytocinu.

4. Závěr

Přestože v krásné literatuře je jedním z hlavních námětů zamilování a láska a přestože různé socio-psychologické koncepce a modely na tvorbě párů u různých živočichů s úlohou hormonů počítají, humánní endokrinologie si tohoto tématu všimá dosud jen velice spoře. Počáteční zamilovanost má některé rysy stresové odpovědi s odezvou ve stresových hormonech, zejména kortizolu a katecholaminech a v období romantické lásky se zjišťují změny v dostupnosti serotoninu a neurotropinů (transformačního růstového faktoru β), v pozdějších fázích lásky snad hrají roli endorfiny a oxytocin, ale průkaz ve studiích na lidech zatím chybí.

Práce vznikla s podporou Interní grantové agentury MZ ČR v projektu č. I A8235-3/2004.

Seznam zkratk

ACTH	adrenokortikotropní hormon
CRH	kortikoliberin
FSH	folikuly stimulující hormon
GPCR	receptory napojené na G-proteiny
NGF	nervový růstový faktor

LITERATURA

- Marazziti D., Akiskal H. S., Rossi A., Cassano G. B.: *Psychol. Med.* 29, 741 (1999).
- Marazziti D., Canale D.: *Psychoneuroendocrinol.* 29, 931 (2004).
- Emanuele E., Politi P., Bianchi M., Minoretto P., Bertona M., Geroldi D.: *Psychoneuroendocrinology* 2005, Nov 9.
- Kiecolt-Glaser J. K., Bane C., Glaser R., Malarkey W. B.: *J. Consult. Clin. Psychol.* 71, 176 (2003).
- Jankowiak W. R., Fischer E. F.: *Ethol.* 31, 149 (1992).
- Bartels A., Zeki S.: *Neuroreport* 11, 3829 (2000).
- Bartels A., Zeki S.: *Neuroimage* 21, 1155 (2004).
- Carter C. S., DeVries A. C., Taymans S. E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 807, 260 (1997).
- Carter C. S.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 779 (1998).
- Jankowiak W. R.: *Psychol. Rev.* 93, 119 (1986).
- Fisher H.: *Anatomy of Love*. Fawcett Columbine, New York 1992.
- Panksepp J.: *Behav. Brain Res.* 5, 407 (1982).
- Hazan C., Shaver P.: *J. Person. Soc. Psychol.* 52, 511 (1987).
- Porges S. W.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 837 (1998).
- Insel T. R.: *Physiol. Behav.* 79, 351 (2003).
- Kraemer G. W.: *Behav. Brain. Sci.* 15, 493 (1992).
- Panksepp J., Nelson E., Silvy S.: *Acta Pediatr. Suppl.* 397, 40 (1994).
- Kimball C. D.: *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 1463 (1987).
- Eisenstein M.: *Lab. Anim. (NY)* 33, 10 (2004).
- Barroso N., Rodriguez M.: *Eur. J. Pharmacol.* 297, 195 (1996).
- Liebowitz M. R.: *The Chemistry of Love*. Little Brown and Company, Boston 1983.
- Marazziti D., Rucci P., Di Nasso E., Masala I., Baroni S., Rossi A., Giannaccini G., Mengali F., Lucacchini A.: *Neuropsychobiology* 47, 12 (2003).
- Kimata H.: *Physiol. Behav.* 80, 395 (2003).
- Hennessy M. B.: *Neur. Biobehav. Rev.* 21, 11 (1997).
- Milgram N. A.: *Stress and Coping in Time of War: Generalizations from the Israeli Experiences*. Brunner Mazel, New York 1986.
- Simpson J. A., Rhole W. A.: *Adv. Pers. Relat.* 5, 181 (1994).
- Legros J. J.: *Psychoneuroendocrinol.* 26, 649 (2001).
- McCarthy M. M., Kow L. M., Pfaff D. W.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 652, 70 (1992).
- Herbert J.: *Brit. Med. J.* 309, 891 (1994).
- McGregor G. P., Lang R. E.: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109, 83 (2001).
- Uvnäs-Moberg K.: *News Physiol. Sci.* 13, 22 (1998).
- Uvnäs-Moberg K.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 819 (1998).
- Filippi S., Vignozzi L., Vannelli G.B., Ledda F., Forti G., Maggi M.: *J. Endocrinol. Invest.* 26 (3 Suppl), 82 (2003).
- Grewen K. M., Girdler S. S., Amico J., Light K. C.: *Psychosom. Med.* 67, 531 (2005).
- Kosfeld M., Heinrichs M., Zak P. J., Fischbacher U., Fehr E.: *Nature* 435, 673 (2005).
- Lim M. M., Wang Z., Olazabal D. E., Ren X., Terwilliger E. F., Young L. J.: *Nature* 429, 754 (2004).
- Young L. J., Wang Z.: *Nature Neurosci.* 7, 1048 (2004).
- Kendrick K. M.: *J. Neuroendocrinol.* 16, 1007 (2004).
- Bielsky I. F., Young L. J.: *Peptides* 25, 1565 (2004).

40. Debiec J.: *Bioassays* 27, 869 (2005).
41. Stárka L., Doskočil M.: *Vesmír* 76, 202 (1997).

L. Stárka (*Institute of Endocrinology, Prague*): **Hormones and Love**

Though in literature – fiction and poetry – falling in love and romantic love play a crucial role and several psy-

chosocial conceptions of couple attachment involve the participation of hormones, human endocrinology noticed this theme only marginally. Falling in love shows some signs of hormonal response to stressors with changes in serotonin availability and neurotrophin (transforming growth factor β) concentration, in later phases of love endorphins and oxytocin, may play a role; however, the proof of hormonal events associated with love in humans has been lacking up to now.

NECUKERNÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY SLADKÉ CHUTI

OLDŘICH LAPČÍK^{a,*}, JANA ČOPIKOVÁ^b,
MICHAL UHER^c, JITKA MORAVCOVÁ^a
a PAVEL DRAŠAR^{a,d}

^a Ústav chemie přírodních látek, ^b Ústav chemie a technologie sacharidů, FBPT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^d Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Došlo 25.9.06, přijato 14.11.06.

Klíčová slova: sladidlo, přírodní sladidlo, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Proteiny
3. Deriváty aminokyselin
4. Terpeny
5. Flavonoidy, chalkony a deriváty kumarinu
6. Steroidy
7. Závěr

1. Úvod

Článek navazuje na přehledy, které popisují diversitu přírodních látek, a může být chápán i jako vhodná učební pomůcka^{1–7} při výuce oboru.

Je dostatečně známo, že cukr (sacharosa) je v potravinách nahrazován, neboť je důležité zásobovat trh potravinami vhodnými pro diabetiky, je moderní snižovat energetickou hodnotu potravin a nepřispívat jejich složením ke kazivosti zubů⁸. Bohatost přírodních látek může přitom posloužit nejen jako zdroj pro farmaceutický průmysl, ale i jako inspirace pro průmysl potravinářský a chemický.

2. Proteiny

Thaumatin

Thaumatococcus I a thaumatococcus II jsou proteiny o téměř identické sekvenci; oba se skládají ze 207 aminokyselin

a liší se v pouhých pěti polohách. Jejich směs se získává z hmoty semenných míšků africké rostliny *Thaumatococcus daniellii* Benth (čeleď Marantaceae, marantovité) nazývané též katamfe a dále se nepurifikuje. V katamfe z některých oblastí Ghany⁹ výrazně převládá thaumatococcus I a jako minoritní složka separovatelná ionexovou chromatografií nebo isoelektrickou fokusací se udává ještě thaumatococcus O, který je méně bazický. Směs thaumatococcusů je podle okolností 3000–15 000krát sladivější než sacharosa. Obvykle se získává ze zmražených plodů, v nichž může tvořit až více než polovinu obsahu všech proteinů. Gen pro thaumatococcus II byl úspěšně exprimován ve více druhích rekombinantních organismů, např. *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, *Penicillium roquefortii* a *Aspergillus niger*, z nichž nejvyšší výtěžky poskytl *A. niger*^{10,11}. Thaumatococcusy jsou dobře rozpustné ve vodě i ve směsích vody s alkoholem, snesou pasterizaci i krátkodobý var. Směs je schváleným potravinářským sladidlem v Evropě (E957). V USA je řazen mezi substance, jejichž využití v potravinách je považováno za bezpečné, a vedle přírodního thaumatococcusu je na seznamu FDA (Food and Drug Administration) v kategorii GRAS (Generally Recognized As Safe) uveden i rekombinantní thaumatococcus II (cit.^{11,12}).

Monellin

Monellin z plodů západoafrické liány *Dioscoreophylum cumminsii* Diels. (čeleď Menispermaceae, chebulovité) je tvořen dvěma podjednotkami složenými ze 44 a 50 aminokyselin. Monellin, 3000krát sladší než sacharosa, je tepelně nestálý a je také citlivý vůči kyselým roztokům (při hodnotách pH pod 5,0 postupně degraduje), proto je jeho praktické využití omezené¹¹.

Brazzein a pentadin

Brazzein z plodů *Pentadiplandra brazzeana* Baillon (čeleď Capparaceae, kaparovité) je 1200krát sladší než sacharosa. Skutečnost, že jde o nejjednodušší (54 aminokyselin) z intenzivně sladkých přírodních proteinů a dále že je termostabilní, z něj činí vděčný předmět výzkumu zaměřeného jak teoreticky, tak na možné komerční využití. Gen pro brazzein byl izolován a úspěšně exprimován v bakterii *Escherichia coli* a kvasince *Saccharomyces cerevisiae*^{13,14}. Komerční využití se očekává od nedávno vytvořené transgenní kukuřice, v jejíž zrnech tvoří brazzein až 4 % všech rozpustných proteinů¹⁵.

Z dužniny *Pentadiplandra brazzeana* Baillon byl podle literatury izolován protein (12 kDa), který je 500krát sladší než sacharosa. Vzhledem ke svému zdroji byl nazván pentadin¹⁶. Může však jít o artefakt nebo i omyl autorů, protože jinak se v literatuře vyskytuje pentadin (sodná sůl kyseliny 2,3,4,5,5-pentachlor-2,4-pentadienové CAS

Tabulka I
Sladké proteiny

Protein	Podjednotky	Počet aminokyselin	m.h. [kDa]	Počet disulfidových můstků	Relativní sladivost	Pozn.
Thaumatococin I	1	207	22,2	8	3–15 tisíc (směs obou thaumatococinů)	E957
Thaumatococin II	1	207	22,2	8	3–15 tisíc (směs obou thaumatococinů)	E957
Monellin	2	44 + 50	10,7	0	3000	
Brazzein	1	54	6,5	4	1200	
Mabinlin I	2	32 + 72	12,3	4		
Mabinlin II	2	33 + 72	12,4	4	1000	
Mabinlin III	2	32 + 72	12,3	4		
Mabinlin IV	2	28 + 72	12,1	4		
Kurculin	2	114 + 114	23	4	500	
Neokulin	2	114 + 113	23–24	4		
Mirakulin	4	191	24,6		sám je bez chuti	
Lysozym (slepičí)	1	211	14,4	4		

RN 61391-05-7), používaný jako agrochemikálie a defoliant. Bohužel, aby bylo toto zmatení kompletní, rešerše o sladkých proteinech citují tento defoliant mezi sladkými přírodními látkami¹⁷.

Mabinliny

Čtyři homologní sladké proteiny byly identifikovány v semenech jihočínské kapary *Capparis masaiikai*, která patří v místě svého výskytu mezi tradiční sladidla. Nejvíce zastoupený mabinlin II je tvořen dvěma podjednotkami o 33 a 72 aminokyselinách propojenými dvojicí disulfidových můstků, další dva disulfidové můstky stabilizují delší řetězec B. Je výjimečně termostabilní, beze změny vydrží i 48 hodinový var. Relativně termostabilní jsou i mabinlin III a IV, naproti tomu mabinlin I ztrácí chuť již po hodinovém zahřátí na 80 °C (cit.^{18,19}).

Kurculin

Kurculin z plodů malajské rostliny *Curculigo latifolia* (Liliaceae, liliovitě) je složen ze dvou identických polypeptidů o 114 aminokyselinách, propojených dvěma disulfidovými můstky²⁰. Je 500krát sladší než sacharosa a obdobně jako mirakulin (viz níže) převrací kyselou chuť na sladkou. Strukturní variantou je nedávno popsán neokulin^{21,22}. Jeho jeden peptidový řetězec je podjednotkou kurculinu, druhý s ní vykazuje vysoký stupeň homologie (77 % aminokyselin identických), je o jednu aminokyselinu kratší a je glykosylovaný. Kurculin je homologem lektinu vázajícího D-mannosu, který se nachází v řadě rostlinných taxonů, sám ale lektinovou aktivitu nemá²³.

Lysozym

Sladkou chuť vykazují v nativním stavu některé lysozymy. Tyto hydrolytické enzymy (EC 3.2.1.17) hrají důležitou roli při nespecifické obraně proti bakteriím. Přes významný stupeň homologie určitých domén jsou mezi lysozomy z jednotlivých živočišných druhů značné rozdíly v aminokyselinovém složení a velikosti molekuly. Lysozym ze slepičích vaječných bílků je sladký při koncentracích nad 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$, obdobně jsou vnímány i lysozomy husí, krocaní a želví, zatímco lidský lysozym je bez chuti. Redukce disulfidových můstků nebo tepelná denaturace ruší jak enzymovou aktivitu, tak i chuť slepičího lysozymu. Naproti tomu modifikace karboxylových skupin aminomethansulfonovou kyselinou způsobí ztrátu enzymové aktivity, ale chuť zůstane zachována²⁴.

Mirakulin

Mirakulin z bobulí západoafrického keře *Synsepalum dulcificum* (synonymum *Richardella dulcifica*, čeled' Sapotaceae, zapotovité) je glykoprotein o 119 aminokyselinách. Ačkoli je bez chuti, mění vnímání kyselého chuti ve sladkou. Jeho účinky jsou poměrně trvanlivé, změna vnímání chuti vyvolaná mirakulinem může trvat desítky minut¹¹.

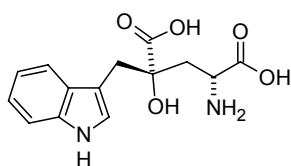
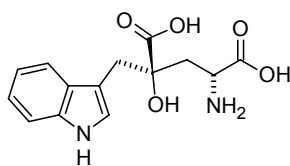
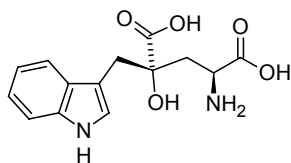
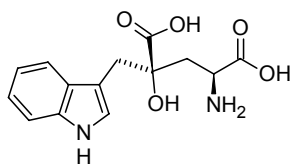
Struktura proteinů sladké chuti

Až na téměř identickou sekvenci obou thaumatococinů a vysoký stupeň homologie uvnitř skupiny mabinlinů nebyla nalezena žádná jasná strukturní souvislost mezi jednotlivými sladkými proteiny. V jejich primárních strukturách neexistují žádné společné sekvence, sladké proteiny

se liší jak velikostí, tak počty disulfidových můstků a dalšími strukturními prvky. Imunochemická data i počítačové modely svědčí o vzájemné podobnosti na úrovni terciárních struktur. Byly popsány monoklonální protilátky proti monellinu, které zkříženě reagovaly s thaumatinem²⁵, a jiná protilátka, která vedle kurkulínu reagovala i s mirakulinem²⁶. Je zřejmé, že o chuti proteinů rozhoduje rozložení kladně nabitých aminokyselin – L-lysinu, L-glutaminu a L-asparaginu. Pokud byly tyto aminokyseliny chemicky modifikovány (methylovací lysinů), ztratily thau-
matin i monellin chuť²⁷. U brazzeinu se podařilo vytvořit výrazně sladší analogy záměnou záporně nabitě kyseliny L-asparagové za neutrální nebo kladně nabitě aminokyseliny v určitých místech molekuly (mutace Asp29Ala, Asp29Asn, Asp29Lys, Glu41Lys), obdobná modifikace na jiném místě (mutace Glu36Ala, Glu36Gln, Glu36Lys) naopak vedla k mutantům zcela bez chuti²⁸. Ze šesti molekul L-lysinu a šesti L-argininu přítomných ve slepičím lysozymu se pro chuť jeví důležité Lys13, Lys96, Arg14, Arg21 a Arg73, jejichž záměna za L-alanin nebo chemická modifikace vedly ke ztrátě sladkosti²⁹.

3. Deriváty aminokyselin

Monatin, derivát kyseliny glutamové 1200–1400krát sladší než sacharosa, byl izolován z kořenů keře *Sclerochiton ilicifolius* (čeleď Acanthaceae, paznechtíkovité) vyskytujícího se v hornatých oblastech jihoafrické provincie Transvaal³⁰. Jeho struktura byla stanovena jako (2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-(indol-3-yl)methylglutamová kyselina. Všechny čtyři možné stereoisomery monatinu byly nedávno připraveny synteticky³¹. Intenzivně sladké byly tři z nich (2*R*,4*S*; 2*R*,4*R*; 2*S*,4*S*), zatímco (2*S*,4*R*)-monatin byl

(2*R*,4*S*)-monatin(2*R*,4*R*)-monatin(2*S*,4*S*)-monatin(2*S*,4*R*)-monatin

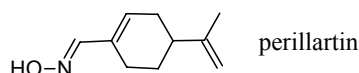
bez chuti. Souběžně byl analyzován preparát monatinu extrahovaný z přírodního zdroje a proti původnímu popisu byl ve směsi identifikován jako majoritní stereoisomer (2*R*,4*R*). Od roku 2002 byla v souvislosti se syntézou monatinu a jeho možným využitím jako průmyslového sladidla podána řada patentových přihlášek.

4. Terpeny

Monoterpeny

Perillartin

Látka podobná limonenu, perillartin, používaná ve voňavkářství má sladkou chuť a někdy je považován za stimulant mozkové činnosti. Nachází se v *Perilla frutescens* (L.) Britton (čeleď Lamiaceae, hluchavkovité)³².

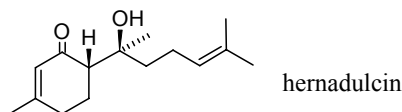


perillartin

Udává se, že je 350krát sladší než sacharosa, používá se v Japonsku ke slazení tabáku a chuťovým úpravám kávy. Jeho použití v potravinářství limituje hořká pachut' (aftertaste) a nízká rozpustnost ve vodě.

Seskviterpeny

V roce 1985 byl izolován z listů a květů mexické rostliny *Lippia dulcis* Trevir (Verbenaceae, sporýšovité) intenzivně sladký seskviterpen hernandulcin (1000krát sladší než sacharosa). V odrůdě stejného druhu získané v Panamě identifikovali v roce 1992 ještě jeho další sladký derivát, (+)-4β-hydroxyhernandulcin^{33–35}. Hernandulcin je potentní sladidlo, je ale málo rozpustný v polárních rozpouštědlech a je termolabilní. Kromě toho vykazuje podchuť a hořký chuťový dozvuk³⁶. Jako chuťový princip oplodí jihoasijského stromu *Sapindus rarak* (mýdelník, čeleď Sapindaceae, mýdelníkovité) byl identifikován seskviterpenový glykosid mukuroziosid IIb, jenž sladkostí odpovídá sacharose a v plodech raraku je obsažen³⁷ v koncentraci více než 6 %.

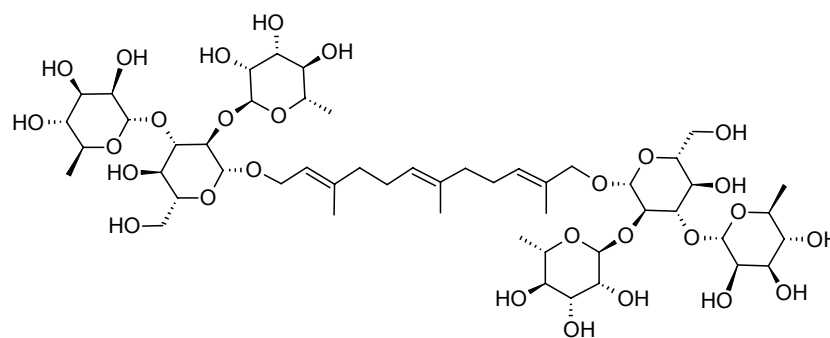


hernadulcin

Diterpeny

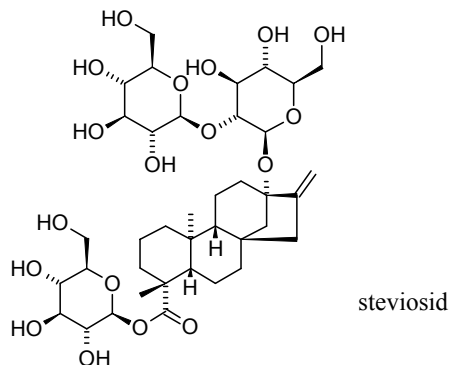
Steviosid

Stevia rebaudiana (čele Astraceae, hvězdnicovité) je z rostlin poskytujících sladidla terpenovou strukturou komerčně nejvýznamnější. Tato trvalka s nevýraznými drobnými květy a množstvím podlouhlých vroubkovaných lístků pochází z Brazílie a Paraguaye. Nyní se pěstuje také v Izraeli, Japonsku, Koreji, Číně a některých dalších zemích³⁸. Chuťovými principy stevie jsou glykosidy diterpenů



mukuroziosid IIb

ent-kaurenového typu: steviosid, rebaudiosidy A až D a dulkosidy A a C, jejichž obsah v sušině listů může dosahovat 4–20 %. Nejvýznamnější z nich, steviosid, je 200 až 300krát sladší než sacharosa, bez vedlejších chuťových dozvků. Drcené listky, jednoduše připravené extrakty nebo i rafinovaný steviosid se používají jako sladidlo, které je nekalorické, nepřispívá k zubnímu kazu a je vhodné např. pro diabetiky, osoby s vysokým krevním tlakem nebo pacienty s fenylketonurií. V roce 2001 se na světových trzích (převážně Japonsko, Korea, Čína, Brazílie) uplatnilo 1250 tun stevie (odpovídá sladivému ekvivalentu 250 000 tun cukru) v celkové ceně 63 mil EUR. K její oblibě přispívá jak široké spektrum možných aplikací umožněné stabilitou steviosidu, tak i renomé přírodní látky a skutečnost, že po sacharinu je stevie nejlevnějším sladidlem (šestkrát levnější než sacharosa, vyjádřeno v ekvivalentech sladivosti)³⁸.



steviosid

V Evropě i v USA brání využívání stevie legislativní překážky. Evropská komise jednala o stevii a steviosidu v roce 2000 a odmítla je uznat za nové potraviny kvůli nedostatku dat prokazujících jejich bezpečnost. V USA se od roku 1995 se steví v omezeném množství obchoduje. Díky určité mezeře v legislativě může být nabízena a prodávána jako „přírodní potravní doplněk“³⁹. Nebyla však schválena FDA, a proto nesmí být propagována a prodávána jako sladidlo. FDA na dodržování tohoto omezení přísně dbá a ty, kdo je přestoupí, důrazně napomíná, případně trestá pokutami, došlo už prý i na zabavení nákladu kuchařské knihy.

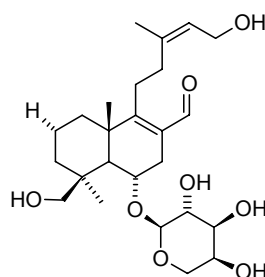
V současnosti bylo publikováno několik studií, které

naznačují, že stevie by se mohla stát podpůrným léčivem při diabetu II. typu. U laboratorních potkanů steviosid zlepšoval parametry glykemické křivky a snižoval rozsah vrozené nebo streptozotocinem vyvolané rezistenci vůči insulinu. Rebaudiosid A stimuloval sekreci insulinu β -bunškami Langerhansových ostrůvků *in vitro* (cit.^{40–45}).

Glykosidy odvozené od steviolu byly identifikovány jako sladké principy rovněž v několika druzích ostružiníků (*Rubus* sp., Rosaceae, růžovité) využívaných v čínském lidovém léčitelství a k přípravě bylinných čajových směsí⁴⁶. Samotný steviosid byl nalezen též v taxonu *Stevia phlebophylla* A. Gray⁴⁷, jako v jediném dalším zástupci ze 108 druhů rodu *Stevia*.

Gaudichaudiosid A

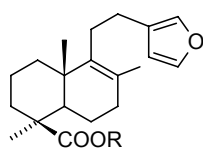
Z paraguayské léčivé rostliny *Baccharis gaudichaudiana* (čeleď Astraceae, hvězdnicovité) byl⁴⁸ v roce 1991 izolován sladký terpenový glykosid labdanového typu, gaudichaudiosid A. Je 55krát sladší než sacharosa, dostatečně rozpustný ve vodě, má příjemnou chuť. Je ale doprovázen strukturně obdobnými gaudichaudiosidy B–E, které jsou hořkosladké. Jiné druhy rodu *Baccharis* jsou hořké. *B. gaudichaudiana* bývá v lidovém léčitelství používána při léčení diabetu.



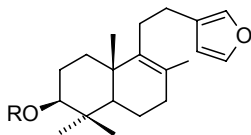
gaudichaudiosid A

Baiyunosid a flomisosidy

Kořeny léčivých rostlin *Phlomis younghusbandii* a *P. medicinalis* (čeleď Lamiaceae, hluchavkovité) jsou v tradičním léčitelství Tibetu a západního Sečuanu používány jako antipyretika a antitusika, příbuzný druh *P. betonicoides* je v podobných indikacích využíván v Číně. Vedle jiných látek z nich byly izolovány sladké diterpeny furanolabdanového typu⁴⁹ baiyunosid a flomisosid I.



baiyunosid I R = Glc - Xyl
baiyunosid II R = Glc - Rha



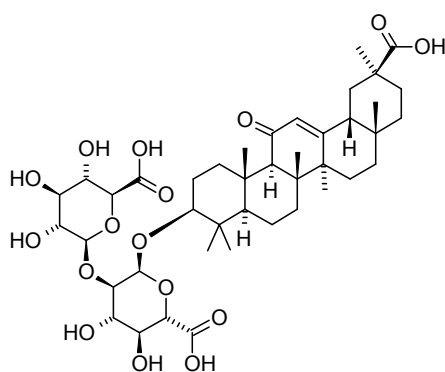
flomisosid I R = Glc - Xyl
flomisosid II R = Glc - Rha
flomisosid III R = Glc - Glc

Triterpeny

Glycyrrhizová kyselina

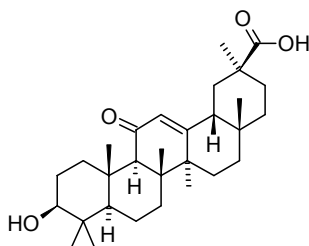
Lékořici lysou (*Glycyrrhiza glabra*, čeled' Fabaceae, bobovité) a několik příbuzných druhů (např. *G. echinata*, *G. uralensis*) lidstvo využívá více než dva tisíce let jednak jako léčivé rostliny, jednak k přípravě cukrovinek a k ochucování pokrmů a nápojů. Lékořici je např. věnována stat' v Mathioliho herbáři (česky 1562). Sladkost lékořice je způsobena antivirálně a antifungálně působící kyselinou glycyrrhizovou, diglukuronosidem, jehož triterpenový aglykon oleananového typu se nazývá kyselina glycyrrhetinová (popř. 18-β glycyrrhetinová kyselina, enoxolon, glycyrrhetin), která se m.j. užívá jako protizánětlivé léčivo. Její obsah v kořenech lékořice může dosahovat až 14 % sušiny.

Kyselina glycyrrhizová je 100–200krát sladší než sacharosa ale má znatelnou lékořicovou příchut'. Jako sladidlo se využívá amonná sůl kyseliny glycyrrhizové; obchod s touto komoditou dosáhl v asijských zemích v roce 2003 objemu 1000 tun v ceně 50 mil EUR. Kyselina gly-



glycyrrhizová kyselina

glycyrrhetinová
kyselina

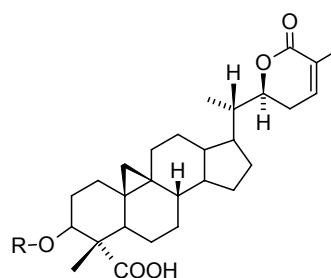


cyrrhizová je účinným inhibitorem několika isoenzymů cytochromu P450. Fyziologicky nejvýznamnější je inhibice dehydrogenasy 11-β hydroxysteroidů. Glycyrrhetová kyselina bývá v laboratorních studiích často využívána jako modelový inhibitor tohoto enzymu. U vnímavých osob může glycyrrhizová kyselina způsobit závažnou poruchu v hospodaření s minerály – tzv. syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů (Apparent Mineralocorticoid Excess, AME)⁵⁰. V Evropě ani v USA její používání není schváleno.

Abrusosidy

Sotorek obecný (*Abrus precatorius*, čeled' Fabaceae, bobovité) je popínavá rostlina původem z tropů a subtropů Asie, roste ale i v Americe a Africe. Na sladkost jeho listů a kořenů upozorňuje jeden z anglických názvů – Indian licorice. Z listů sotorku a z příbuzného druhu *A. fruticulosus* byla izolována pětice sladkých glykosidů odvozených od téhož aglykonu oleananového typu, abrusogeninu. Abrusosidy A-D vykazují 30–100krát vyšší sladivost než sacharosa. Jejich sladkost je mírně opožděná, bez nepříjemných vedlejších tónů a bez hořkosti. Abrusosid E je jenom slabě nasládlý, ale jeho semisyntetický 6-O-monomethylester je 150krát sladší než sacharosa^{51,52}.

Kromě abrusosidů je sotorek zdrojem řady dalších významných biologicky aktivních látek. Některé jeho terpenové saponiny působí protizánětlivě. Extrakty ze stonků a kořenů používají léčitelé v Zimbabwe jako relativně účinný prostředek proti schistosomiáze. Semena obsahují čtveřici toxických proteinů, abrinů A až D, které se stavbou i funkcí podobají ricinu a spolu s ním patří mezi nejpřidruší bílkovinné jedy vůbec. Skládají se ze dvou podjednotek. Lektinová podjednotka zodpovídá za navázání abrinu na povrch buňky a za vyvolání jeho internalizace, druhou podjednotkou je specifická ribonukleasa, která štěpí ribosomální RNA. Smrtící dávka abrinu při parenterálním podání je 10–30 μg kg⁻¹ (cit.⁵⁴). Přestože je takto jedovatý, pestrá semena sotorku se často používají k výrobě dekorativních předmětů – náramků, náhrdelníků a amuletů. Použití sotorku jako zdroje sladkých látek je tedy problematické.



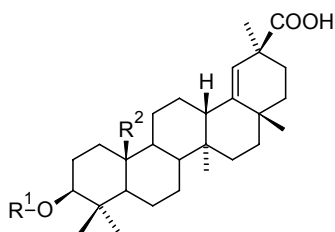
abrusosid A R = Glcβ-
abrusosid B R = GlcA6Meβ-2Glcβ-
abrusosid C R = Glcβ-2Glcβ-
abrusosid D R = Glcβ-2GlcAβ-
abrusosid E R = GlcAβ-2Glcβ-

Tabulka II
Sladké terpeny

Terpeny	Typ	Výskyt	m.h.	Relativní sladivost	Pozn.
Hernandulcin	seskviterpen	<i>Lippia dulcis</i> (Verbenaceae)	236	1000	
Mukuroziosid	seskviterpen	<i>Sapindus rarak</i> (Sapindaceae)	1147	1	
Gaudichaudiosid A	seskviterpen	<i>Baccharis gaudichaudiana</i> (Astraceae)	468	55	
Steviosid	diterpen	<i>Stevia rebaudiana</i> (Astraceae)	805	200	
Baiyunosid	diterpen	<i>Phlomis betonicoides</i> , <i>P. younghusbandii</i> , <i>P. medicinalis</i> (Lamiaceae)	587	250	
Phlomisosid I	diterpen	<i>Phlomis betonicoides</i> , <i>P. younghusbandii</i> , <i>P. medicinalis</i> (Lamiaceae)	611		
Abrusosid A	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	646	30	
Abrusosid B	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	836	100	
Abrusosid C	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	808	50	
Abrusosid D	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	806	75	
Periandrin I - V	triterpenový glykosid	<i>Periandra dulcis</i> (Fabaceae)	806	100–200	
Pterokaryosid A	triterpenový glykosid	<i>Pterocarya paliurus</i> (Juglandaceae)	636	50	
Pterokaryosid B	triterpenový glykosid	<i>Pterocarya paliurus</i> (Juglandaceae)	622	100	
Mogrosid V	triterpenový glykosid	<i>Siraitia grosvenori</i> (Cucurbitaceae)	1286	400	
Carnosiflosid V, IV	triterpenový glykosid	<i>Hemsleya carnosiflora</i> (Cucurbitaceae)	944		
Glycyrrhizin	triterpenový glykosid	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	822	100	E958

Periandriny

Série sladkých glykosidů s aglykonem oleananového typu byla izolována z kořenů brazilské rostliny *Periandra dulcis* (čeleď Fabaceae, bobovité). Periandriny I až IV jsou 90–100krát sladší než sacharosa, periandrin V je 200krát sladší^{55,56}.

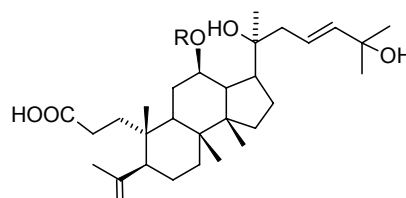


periandrin I $R^1 = \text{Glc}\beta\text{-2GlcA}\beta\text{-}$ $R^2 = \text{CHO}$

periandrin II $R^1 = \text{Xyl}\beta\text{-2GlcA}\beta\text{-}$ $R^2 = \text{CHO}$

Pterokaryosidy

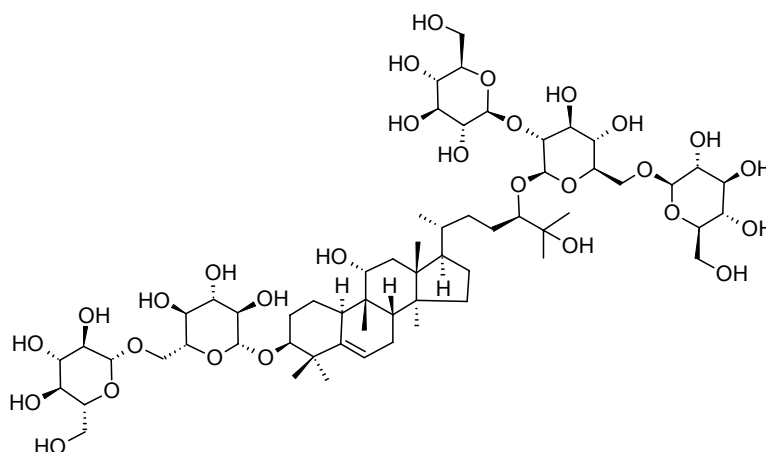
Listy jihočínského stromu *Pterocarya paliurus* (čeleď Juglandaceae, ořešákovité) patří v oblasti jeho přirozeného výskytu mezi tradiční sladidla. V roce 1995 z nich byly izolovány dva glykosidy (arabinosid a isorhamnosid) odvozené od téhož 3,4-*seco*-dammaranového aglykonu, pterokaryosidy A a B. Alternativní název je cyklokaryosid A a B, podle druhé varianty latinského názvu rostliny *Cyclocarya paliurus*. Jsou 50–100krát sladší než sacharosa, oba se však vyznačují mírně hořkým chuťovým dozvukem^{52,57}.



Pterokaryosid A $R = \text{Qui}\beta\text{-}$

Pterokaryosid B $R = \text{L-Ara}\alpha\text{-}$

mogrosid V



Kukurbitanoglykosidy

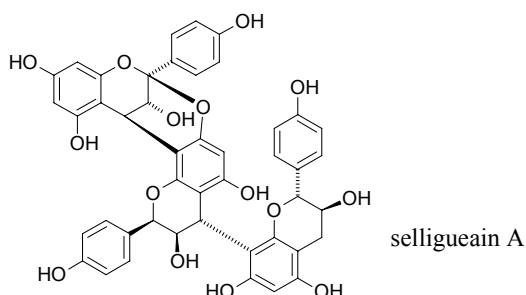
Momordica grosvenori Swingle (čeleď Cucurbitaceae, tykvovité), synonyma *Thladiantha grosvenori*, *Siraitia grosvenori* je tykvovitá rostlina⁵⁸, která se pěstuje v jihočínské provincii Guangxi pro plody nazývané *Lo Han Kuo*. Tyto plody se používají sušené, případně se z nich připravují vodně-ethanolové extrakty. Sladkými sloučeninami z *Lo Han Kuo* jsou kukurbitanové glykosidy nazývané mogrosidy. V oplodí je jejich obsah vyšší než v dužnině. Nejvýznamnější, mogrosid V je 400krát sladší než sacharosa, minoritní siamenosid I dokonce 560krát (viz.⁵⁹). V poslední době je mogrosid V studován pro své potenciální protizánětlivé a antioxidační účinky^{60,61}. Sladké triterpeny kukurbitanového typu byly nalezeny také v dalších zástupcích čeledi tykvovitých, rostlinách druhu *Hemsleya carnosiflora* a *H. panacis-scandens*^{62,63}.

5. Flavonoidy, chalkony a deriváty kumarinu

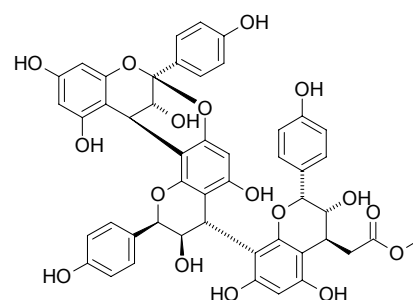
Selligueainy

Pokud mají flavonoidy nějakou chuť, patří většinou mezi látky hořké nebo mírně adstringentní (svíravé), nicméně i v této skupině se vyskytují sloučeniny sladké chuti.

Selligueain, který byl ve vysokém výtěžku (0,7 %) izolován z oddenků *Selligaea feii* syn. *Polypodium feii* (čeleď Polypodiaceae, osladičovitě), patří mezi trimerické proanthocyanidiny. Je 35krát sladší než sacharosa, bez výrazné hořké nebo trpké podchuti. Tato látka byla identifikována v dalších pěti druzích rodu *Polypodium* rostoucích v Hondurasu⁶⁴.



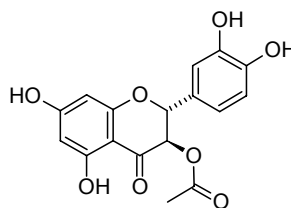
selligueain A



selligueain B

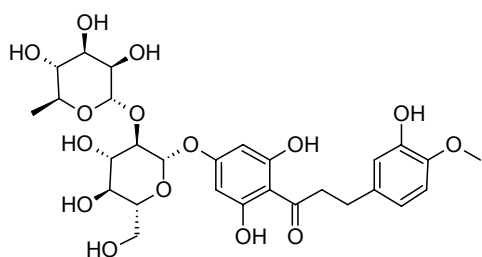
(+)-3-*O*-Acetyldihydrokvercetin

Čtyři sladké dihydroflavonoly byly identifikovány v bylině *Hymenoxys turneri* (Compositae)⁶⁵. Nejintenzivnější sladkou chuť, odpovídající osmdesátinásobku sladkosti sacharosy, vykazoval (2*R*,3*R*)-dihydroquercetin-3-acetát [(+)-3-*O*-acetyldihydrokvercetin]. Jeho výskyt byl zaznamenán i v dalších zástupcích čeledi Astraceae – paraguayské léčivé rostlině *Tessaria dodoneifolia*⁶⁶ a v druzích *Baccharis varlans*⁶⁷ a *Inula viscosa*⁶⁸.

(2*R*,3*R*)-dihydrokvercetin-3-acetát

Dihydrochalkon neohesperidinu

Glykosidy flavanonů se podílejí na hořkých chutích řady citrusových plodů. V kůře bigarádie neboli sevilských pomerančů (*Citrus aurantium*) se nachází neohesperidin, podstatu hořkosti grapefruitů (*Citrus paradisi*) dodává podobný naringin. V roce 1963 byly připraveny⁶⁹ jejich alkalickou hydrolýzou a následnou katalytickou hydrogenací na paladiu sladké dihydrochalkony. Dihydrochalkon

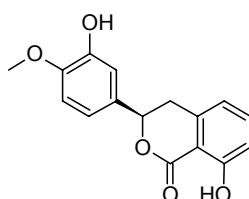


dihydrochalkon neohesperidinu

neohesperidinu (neohesperidin DHC) je 1000krát sladší než sacharosa, ale má znatelnou lékořicovou příchut'. Je termostabilní a relativně odolný i vůči kyselé hydrolyze až do pH 2. Je schváleným sladidlem v EU (E959), v USA je řazen do kategorie GRAS. Používá se často v kombinaci s jinými sladidly⁷⁰, zejména v nápojích, džemech, potravinách s podílem ovoce (jogurty apod.), žvýkacích gumách, léčivých přípravcích aj.

Fylodulcin

Jako derivát kumarinu je prezentován fylodulcin (phylodulcin) z listů *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* (Siebold) Makino (Saxifragaceae, lomikámenovitě), ze kterých se v Japonsku vaří čaj. Fylodulcin je 400krát sladší než sacharosa, jako sladidlo se nepoužívá pro hořkou pachut' a malou rozpustnost ve vodě.



fylodulcin

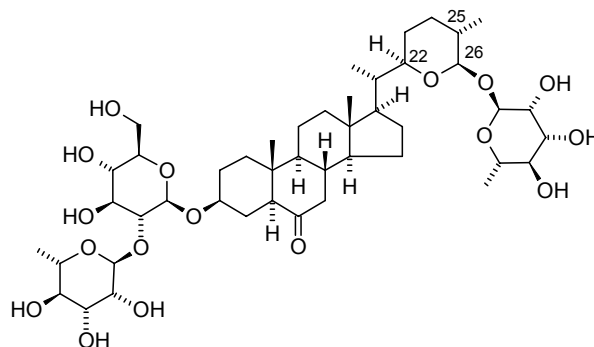
6. Steroidy

Steroidní saponiny

Osladič obecný (*Polypodium vulgare*, čeleď Polypodiaceae, osladičovitě) je tradiční středoevropská léčivá rostlina zmiňovaná již v Mathioliho herbáři. Lze připomenout, že rod *Polypodium* je chráněným taxonem.

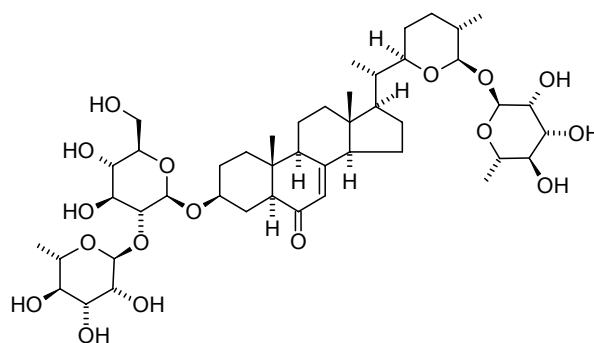
Z oddenku osladiče s kořeny byl r. 1970 v Ústavu

organické chemie a biochemie ČSAV v Praze izolován steroidní glykosid osladin⁷¹. Jeho struktura byla stanovena o čtyři roky později⁷², ovšem později se ukázalo, že s několika nepřesnostmi. Původně popsána látka byla v roce 1992 připravena synteticky, tento preparát však při senzorických testech nevykazoval žádnou chuť. Nová izolace osladinu z přírodního materiálu umožnila revizi struktury⁷³ na konfiguraci 22*R*,25*S*,26*R* z původně předpokládané 22*S*,25*R*,26*S*.



osladin, revidovaná struktura

Z oddenků severoamerického osladiče *Polypodium glycyrrhiza* byly izolovány steroidní saponiny obdobné struktury jako osladin, které byly pojmenovány polypodosidy. Polypodosidy jsou 600krát sladší než sacharosa, netoxické a nejsou mutagenní, jejich obsah v oddencích⁷⁵ je však relativně nízký (do 0,3 %).



polypodosid A

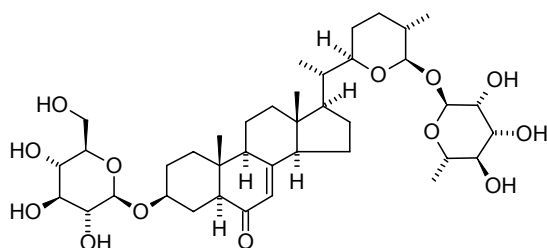
Tabulka III
Sladké steroidy

Steroidy	Typ	Výskyt	m.h.	Relativní sladivost
Osladin	Steroidní saponiny	<i>Polypodium vulgare</i> (Polypodiaceae)	887	500
Polypodosid	Steroidní saponiny	<i>Polypodium glycyrrhiza</i>	885	600
Telosmosid A ₁₅	Polyoxypregnanové glykosidy	<i>Telosma procumbens</i> (Asclepiadaceae)	1378	1000

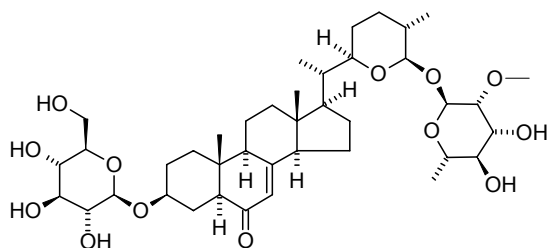
Tabulka IV

Sladké flavonoidy a dihydrochalkony

Flavonoidy a dihydrochalkony	Typ	Výskyt	m.w.	Relativní sladivost	Pozn.
(+) dihydrokvercetin -3- acetát	flavonoid	<i>Tessaria dodoneliifolia</i> , <i>Hymenoxys turneri</i> , <i>Inula viscosa</i> (Astraceae)	346	80	
Selliguaein A	flavonoid	<i>Polypodium feii</i> (Polypodiaceae)	816	35	
Neohesperidin DHC	dihydrochalkon	polosyntetický, z <i>Citrus aurantium</i> (Rutaceae)	582	1000	E959



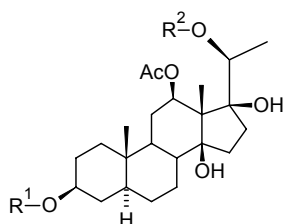
polypodosid B



polypodosid C

Polyoxypregnany

Ve vietnamské léčivé rostlině *Telosma procumbens* (čeleď Asclepiadaceae, tolitovitě), která je v tradičním léčitelství používána jako expektorans, antitusikum a náhražka lékořice, bylo identifikováno 18 glykosidů odvozených od stejného polyoxypregnanového aglykonu (telosmosidy A₁-A₁₈). Jedenáct z nich je sladkých, jeden hořký (telosmosid A₂) a šest je bez chuti. Nejvíce zastoupený telosmosid A₁₅ je 1000krát sladší než sacharosa. Jeho sumární vzorec je C₆₈H₁₁₃O₂₈, kromě aglykonu obsahu-

telosmosidy A₁-A₁₈

je ve své molekule cymarosu, oleandrosu, digitoxosu, 6-deoxy-3-*O*-methylallosu a D-glukosu. Z lodyh telosmy byl izolován ve výtěžku přes 1 %. Sladivost minoritních telosmosidů A₈-A₁₄ a A₁₆-A₁₈ nebyla přesně stanovena⁷⁶.

7. Závěr

Přehled přírodních necukerných látek sladké chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiversity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, např. potravinářských a farmaceutických chemiků při hledání nových možností využití takových látek v praxi.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305. Dále si dovoluují poděkovat doc. RNDr. Lubomiru Opletalovi, CSc. za pomoc při správném použití botanických názvů a termínů.

LITERATURA

- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 233 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 314 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Benešová E., Marková M., Lipovová P., Králová B.: Chem. Listy 99, 324 (2006).
- Harmatha J.: Chem. Listy 99, 622 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2006).
- Hamilton-Miller J. M. T.: J. Med. Microbiol. 50, 299 (2001).
- Mackenzie A., Pidham J. B., Saunders N. A.: Phytochemistry 24, 2503 (1985).
- Faus I., del Moral C., Adroer N., del Rio J. L., Patino C., Sisniega H., Casas C., Blade J., Rubio V.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 393 (1998).
- Faus I.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 145 (2000).
- <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/efaus.html> (staženo 15.2.2006).
- Guan ZY, Hellekant G, Yan W: Chem. Senses 20, 99

- (1995).
14. Assadi-Porter F. M., Aceti D. J., Cheng H., Markley J. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 252 (2000).
 15. Lamphear B. J., Barker D. K., Brooks C. A., Delaney D. E., Lane J. R., Beifuss K., Love R., Thompson K., Mayor J., Clough R., Harkey R., Poage M., Drees C., Horn M. E., Streatfield S. J., Nikolov Z., Woodard S. L., Hood E. E., Jilka J. M., Howard J. A.: *Plant. Biotechnol. J.* 3, 103 (2005).
 16. Van der Wel H., Larson G., Hladik A., Hladik C. M., Hellekant G., Glaser D.: *Rhoon, Neth. Chemical Senses* 14, 75 (1989); *Chem. Abstr.* 110, 171932 (1989).
 17. Kant R.: *Nutrition J.* 4, 5 (2005).
 18. Nirasawa S., Liu X., Nishino T., Katahira M., Uesugi S., Hu Z., Kurihara Y.: *Eur. J. Biochem.* 223, 989 (1994).
 19. Nirasawa S., Liu X., Nishino T., Kurihara Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 1202, 277 (1993).
 20. Yamashita H., Theeraslip P., Aiuchi T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y.: *J. Biol. Chem.* 265, 15770 (1990).
 21. Shirasuka Y., Nakajima K., Asakura T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1403 (2004).
 22. Suzuki M., Kurimoto E., Nirasawa S., Masuda Y., Hori K., Kurihara Y., Shimba N., Kawai M., Suzuki E. I., Kato K.: *FEBS Lett.* 573, 135 (2004).
 23. Barre A., VanDamme E. J. M., Peumans W. J., Rouge P.: *Plant Molec. Biol.* 33, 691 (1997).
 24. Masuda T., Ueno Y., Kitabatake N.: *J. Agric. Food. Chem.* 49, 4937 (2001).
 25. Antonenko S., Zanetti M.: *Life Sci.* 55, 1187 (1994).
 26. Nakajo S., Akabane T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 1118, 293 (1992).
 27. Suami T., Hough L., Machinami T., Watanabe N.: *Food Chem.* 56, 275 (1996).
 28. Jin Z., Danilova V., Assadi-Porter F. M., Aceti D. J., Markley J. L., Hellekant G.: *FEBS Lett.* 544, 33 (2003).
 29. Masuda T., Ide N., Kitabatake N.: *Chem. Senses* 30, 667 (2005).
 30. Vleggaar R., Ackerman L. G. J., Steyn P. S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, 3095.
 31. Bassoli A., Borgonovo G., Busnelli G., Morini G., Drew M. G. B.: *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 1652.
 32. Uher M., Wojtowicz H.: *Wiadom. Chem.* 57, 505 (2003).
 33. Compadre C. M., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., Kamath S. K.: *Science* 227, 417 (1985).
 34. Kaneda N., Lee I. S., Gupta M. P., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 55, 1136 (1992).
 35. Compadre C. M., Robbins E. F., Kinghorn A. D.: *J. Ethnopharmacol.* 1986, 1589.
 36. Kinghorn A. D., Soejarto D. D.: *Pure Appl. Chem.* 74, 1169 (2002).
 37. Chung M. S., Kim N. C., Long L., Shamon L., Ahmad W. Y., Sagrero-Nieves L., Kardono L. B. S., Kennelly E. J., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn D. D.: *Phytochem. Anal.* 8, 49 (1997).
 38. <http://www.uni-hohenheim.de/~www440/VTP/stevia/B0/B5> (staženo 15.2.2006).
 39. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdsugar.html> (staženo 15.2.2006).
 40. Geuns J. M. C.: *Phytochemistry* 64, 913 (2003).
 41. Dyrskog S. E., Jeppesen P. B., Colombo M., Abudula R., Hermansen K.: *Metabolism* 54, 1181 (2005).
 42. Chang J. C., Wu M. C., Liu I. M., Cheng J. T.: *Horm. Metab. Res.* 37, 610 (2005).
 43. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdsugar.html> (staženo 15.2.2006).
 44. <http://www.fda.gov/> (staženo 15.2.2006).
 45. Abudula R., Jeppesen P. B., Rolfsen S. E. D., Xiao J. Z., Hermansen K.: *Metabolism Clin. Exp.* 53, 1378 (2004).
 46. Ohtani K., Aikawa Y., Kasai R., Chou W. H., Yamasaki K., Tanaka O.: *Phytochemistry* 31, 1553 (1992).
 47. Kinghorn A. D., Soejarto D. D., Nanayakkara N. P., Compadre C. M., Makapugay H. C., Hovanec-Brown J. M., Medon P. J., Kamath S. K.: *J. Nat. Prod.* 47, 439 (1984).
 48. Fullas F., Hussain R. A., Bordas E., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *Tetrahedron* 47, 8515 (1991).
 49. Katagiri M., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Yang C.-R., Tanaka O.: *Phytochemistry* 35, 439 (1994).
 50. Stormer F. C., Reistad R., Alexander J.: *Food Chem. Toxic.* 31, 303 (1993).
 51. Kinghorn A. D., Kaneda N., Baek N. I., Soejarto D. D.: *Med. Res. Rev.* 18, 347 (1980).
 52. Kenelly E. J., Cai L., Long L., Shamon L., Zaw K., Zhou B. N., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 2602 (1995).
 53. Lin J. Y., Lee T. C., Hu S. T., Tung T. C.: *Toxicon* 19, 41 (1981).
 54. Lin J. Y., Lee T. C., Hu S. T., Tung T. C.: *Toxicon* 19, 41 (1981).
 55. Suttisiri R., Chung M. S., Kinghorn A. D., Sticher O., Hashimoto Y.: *Phytochemistry* 34, 405 (1993).
 56. Kinghorn A. D., Kaneda N., Baek N. I., Kennelly E. J., Soejarto D. D.: *Med. Res. Rev.* 18, 347 (1998).
 57. Kinghorn A. D., Soejarto D. D.: *Pure Appl. Chem.* 74, 1169 (2002).
 58. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/articles/momordica%20swingle.html> (staženo 8.2.2006).
 59. Chen J. C., Chiu M. H., Nie R. L., Cordell G. A., Qiu S. X.: *Nat. Prod. Rep.* 22, 386 (2005).
 60. Hossen M. A., Shinmel Y., Jiang S., Takubo M., Tsunmuro T., Murata Y., Sugiura M., Kamei C.: *Biol. Pharm. Bull.* 28, 238 (2005).
 61. Takasaki M., Konoshima T., Murata Y., Sugiura M., Nishino H., Tokuda H., Matsumoto K., Kasai R., Yamasaki K.: *Cancer Lett.* 198, 37 (2003).
 62. Kasai R., Matsumoto K., Nie R. L., Morita T., Awazu A., Zhou J., Tanaka O.: *Phytochemistry* 26, 1371 (1987).
 63. Kubo H., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Nie R.

- L., Tanaka O.: *Phytochemistry* 41, 1169 (1996).
64. Baek N. I., Chung M. S., Shamon L., Kardono L. B. S., Tsauri S., Padmawinata K., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 56, 1532 (1993).
 65. Gao F., Wang H., Mabry T. J., Kinghorn A. D.: *Phytochemistry* 29, 2865 (1990).
 66. Nanayakkara N. P. D., Hussain R. A., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Med. Chem.* 31, 1250 (1988).
 67. Bohlmann F., Zdero C., Grenz M., Dhar A. K., Robinson H., King R. M.: *Phytochemistry* 20, 281 (1981).
 68. Grande M., Piera F., Cuenca A., Torres P., Bellido I. S.: *Planta Med.* 51, 414 (1985).
 69. Horowitz R. M., Gentili B.: U.S. Patent 3,087,821 (1963).
 70. Tomás-Barberán F. A., Borrego F., Ferreres F., Lindley M. G.: *Food Chem.* 52, 263 (1995).
 71. Jizba J., Dolejš L., Herout V., Šorm F., Felhaber H. W., Snatzke F., Tschesche R., Wulff G.: *Chem. Ber.* 104, 837 (1971).
 72. Havel M., Černý V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 40, 1579 (1975).
 73. Yamada H., Nishizawa M., Ktayaama C.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4009 (1992).
 74. Yamada H., Nishizawa M., Ktayaama C.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4009 (1992).
 75. Kim J. W., Kinghorn A. D.: *Phytochemistry* 28, 1225 (1989).
 76. Huan V. D., Ohtani K., Ksai R., Yamasaki K., Tuu N. V.: *Chem. Pharm. Bull.* 49, 453 (2001).

O. Lapčík^a, J. Čopíková^b, M. Uher^c, J. Moravcová^a, and P. Drašar^{a,d} (^a Department of Chemistry of Natural Compounds, ^b Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^c Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, ^d Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Sweet Non-saccharide Natural Compounds**

A brief survey of sweet non-saccharide natural compounds aims to show their importance and to contribute to the knowledge of the biodiversity of secondary metabolites, which can be utilized in food and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of the compounds are illustrated.

CENA MERCK

ANALÝZA MARKERŮ PRO CHARAKTERIZACI DESTILÁTŮ

MARCELA KORHOŇOVÁ*, RADKA
HEJDOVÁ, PETR BARTÁK, PETR BEDNÁŘ
a LUBOMÍR ČÁP

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8,
771 46 Olomouc
korhonovam@seznam.cz*

Došlo 16.6.06, přijato 19.10.06.

Klíčová slova: destiláty, plynová chromatografie, faktoro-
vá analýza, markery, estery

Úvod

Destiláty patří mezi alkoholické nápoje obsahující nejméně 20 obj.% alkoholu, při jejichž výrobě se smí používat výhradně kvasný ethanol¹, který je tvořen během fermentace ze zkvasitelných surovin činností vhodných mikroorganismů (kvasinek) a izolován následnou destilací.

Mimo ethanolu a vody, které tvoří podstatnou část destilátů, jsou přítomny i další látky², které mají vliv na senzorycké vlastnosti^{3,4} destilátu a na jeho kvalitu. Tyto látky mohou pocházet z původní suroviny^{2,5} (samotná surovina, ale i kvas), mohou vznikat při fermentačním procesu⁶ nebo při skladování a zrání⁷. Zastoupeny jsou především další nižší alifatické alkoholy² (methanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol i další alkoholy). Z aromatických a heterocyklických alkoholů vznikají při kvašení benzylalkohol, 2-fenylethanol a furfurylalkohol. Všechny se vyznačují výraznými senzoryckými vlastnostmi. Z více-
mocných alkoholů se v ovocných destilátech vyskytuje 2,3-butanediol a glycerol. Další skupinu, která podstatným způsobem ovlivňuje senzorycké vlastnosti ovocných destilátů, tvoří aldehydy. Ty pocházejí¹ jednak ze zpracované suroviny a jednak vznikají² během kvasného procesu i během destilace a staření. Mezi hlavní zástupce této skupiny chemických látek patří acetaldehyd, benzaldehyd a furankarbaldehyd. V ovocných destilátech jsou také zastoupeny těkavé alifatické kyseliny^{2,3}, především kyselina

octová, dále kyselina mravenčí a máselná, a z vyšších pak kyseliny kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová a další. Tyto vznikají jako vedlejší produkty kvašení⁸ a v malém množství bývají v ovocných destilátech přítomny (těkají s vodní parou) buď ve volné formě nebo jako estery.

Různorodé chemické složení jednotlivých destilátů způsobené mnoha faktory^{9,10} (druh a kvalita použité suroviny, aktivita kvasinek, fermentační podmínky, technologický postup destilace, konečná úprava destilátu) naznačuje možnost rozlišení základních typů těchto alkoholických nápojů na základě identifikace markerů specifických pro daný druh destilátu, a tak i zabránění možného falšování lihovin.

Experimentální část

K analýze byly vybrány pálenky z meruněk, švestek, jablek a hrušek. U vzorků ovocných destilátů, které zahrnovaly výrobky z domácí, palírenské i průmyslové výroby, byly vybrány dvě skupiny potenciálních markerů. Skupina nízkomolekulárních látek zahrnovala 1-propanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl-acetát a 1,1-diethoxyethan. Druhou skupinu tvořily ethylestery vyšších mastných kyselin, a to ethyl ester kyseliny kaprylové, kaprinové, laurové, myristové, palmitové a stearové. Tyto látky byly vybrány jako univerzální (i když málo specifické) markery přítomné ve všech typech ovocných destilátů.

Pro měření obsahu látek v destilátech byl použit plynový chromatograf HP 6890 s hmotnostním detektorem 5973 N (Agilent, USA), knihovnou spekter NIST 98 (USA) a kolonou HP-5MS (5%-difenyl-95%-polydimethylsiloxan) s parametry 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Podmínky GC separace: i) nízkomolekulární látky: 40 °C (2 min) – 10 °C min⁻¹ – 200 °C (5 min); nástřik: 0,2 μl, split 50:1; ii) ethylestery vyšších mastných kyselin: 50 °C (2 min) – 10 °C min⁻¹ – 300 °C (5 min); nástřik: 1 μl, dávkovací pulz 280 kPa, 24 s. Nosným plynem bylo helium (99,998 %; rychlost průtoku: i) 0,6 ml min⁻¹, ii) 0,9 ml min⁻¹; SIAD, Bergamo, Itálie).

Hmotnostní obsah jednotlivých markerů ve vzorcích byl určen metodou kalibrační přímky. Byly připraveny dva základní zásobní roztoky standardních látek: i) roztok nízkomolekulárních látek a ii) roztok ethylesterů vyšších mastných kyselin. Ethanolické zásobní roztoky byly následně ředěny 10×, 50× a 250× 50% ethanollem (v případě ethylesterů vyšších mastných kyselin 96% ethanollem).

* Marcela Korhoňová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie

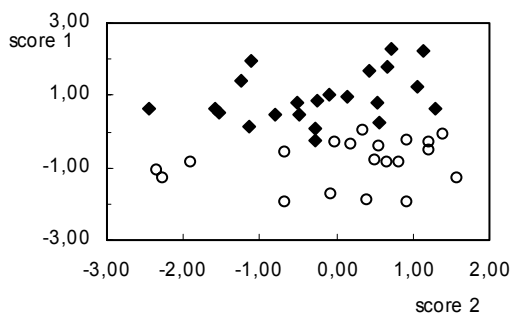
Výsledky a diskuse

Ve sledovaných destilátech byla metodou kalibrační přímky stanovena koncentrace 1-propanolu, 2-propanolu, 2-methyl-1-propanolu, 2-methyl-1-butanolu, 3-methyl-1-butanolu, ethyl-acetátu, 1,1-diethoxyethanu a ethylesteru kyseliny kaprylové, kaprinové, laurové, myristové, palmiové a stearové. Přímá interpretace takto obsáhlých výsledků analýzy ovocných destilátů je poměrně komplikovaná právě pro velký počet naměřených dat, jejich vzájemnou provázanost a vysokou variabilitu u jednotlivých pálenek. Pro rychlé statistické zpracování takových rozsáhlých souborů dat a pro vyhledání a přehledné znázornění jejich vnitřní struktury se často využívá faktorová analýza („Factor Analysis“ – FA). Tato vícerozměrná statistická metoda¹¹ umožňuje určit rozbor struktury vzájemných závislostí proměnných, popis struktury dat a vyhledat významné faktory (jevy) a souvislosti, které je těžké určit analýzou jednotlivých ukazatelů či jejich dvojic.

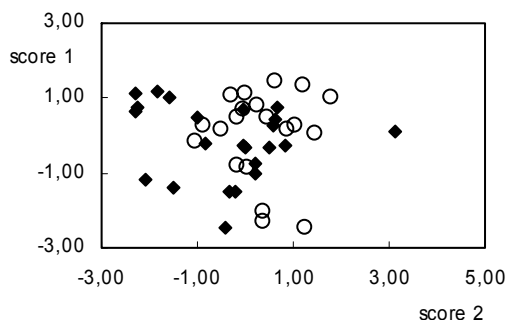
Pro analýzu byly dále vybrány dva soubory dat, vzorky meruňkovice a slivovice. Výsledek FA (obr. 1) ukázal, že došlo k rozdělení vzorků meruňkovice a vzorků slivovice na dvě skupiny. Tento výsledek naznačuje možnost rozlišení daného druhu destilátu na základě analýzy obsa-

hu uvedených analytů. Po vyloučení skupiny ethylesterů vyšších mastných kyselin a zúžení souboru vstupních dat na skupinu nízkomolekulárních látek, došlo k mírnému překrytí obou souborů, avšak bylo dosaženo rovněž uspokojivého rozlišení (obr. 2). Samotná analýza ethylesterů vyšších mastných kyselin již neposkytla dobré rozlišení (obr. 3). U sledovaných destilátů tedy koncentrace běžných nízkomolekulárních látek obsahují překvapivě více specifickou informaci a uvedené látky jsou tedy lepšími kvalitativními markery než ethylestery vyšších mastných kyselin. Následující analýza vzorků jablek a hrušek, což jsou pálenky z jádrového ovoce, přinesla obdobné výsledky jako analýza meruňkovice a slivovice. I v tomto případě bylo možné odlišit pálenky z jednotlivých surovin na základě analýzy sledovaných markerů (obr. 4).

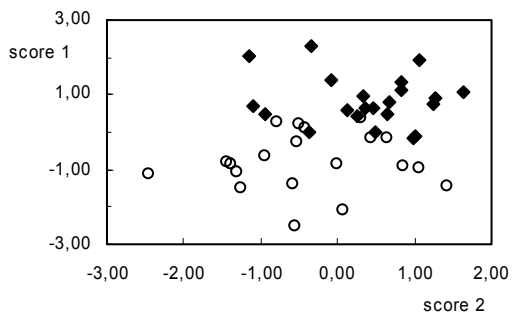
Při analýze pálenek ze stejného typu ovoce (peckovice resp. jádrové ovoce) dochází k dobrému rozlišení jak při FA analýze, jejíž matice zahrnuje všechny studované analyty, tak při analýze, kde vstupní matici tvoří pouze nízkomolekulární látky. U sledovaných vzorků tedy ethylestery vyšších mastných kyselin nemají podstatný vliv na výsledek FA analýzy. Lze předpokládat, že pro jiný druh ovoce resp. pro jinou výchozí surovinu, která nebyla zahrnuta do této studie, může být právě obsah ethylesterů



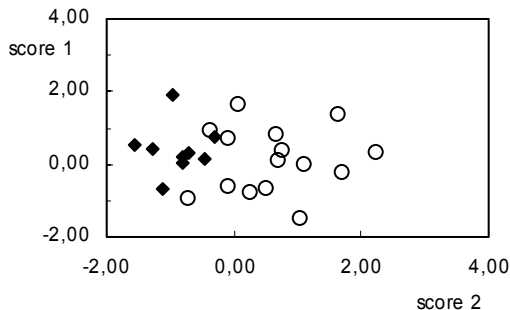
Obr. 1. FA vzorků meruňkovice a slivovice; ◆ vzorky slivovice, ○ vzorky meruňkovice



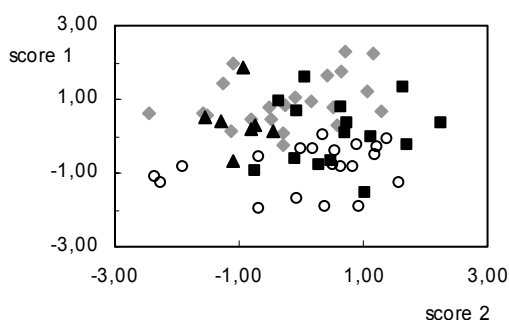
Obr. 3. FA ethylesterů vyšších mastných kyselin vzorků meruňkovice a slivovice; ◆ vzorky slivovice, ○ vzorky meruňkovice



Obr. 2. FA nízkomolekulárních látek vzorků meruňkovice a slivovice; ◆ vzorky slivovice, ○ vzorky meruňkovice



Obr. 4. FA vzorků jablek a hrušek; ○ vzorky jablek, ◆ vzorky hrušek



Obr. 5. FA vzorků meruňkovice, slivovice, jablek a hruškovice; ♦ vzorky slivovice, ○ vzorky meruňkovice, ■ vzorky jablek, ▲ vzorky hruškovice

vyšších mastných kyselin charakteristickým ukazatelem.

Z porovnání koncentrací navržených markerů v jednotlivých typech destilátů je zřejmé, že tyto markery jsou obsaženy prakticky ve všech destilátech ve srovnatelných koncentracích. Přes nízkou specifičnost je možné pomocí těchto markerů poměrně dobře odlišit určité typy destilátů. Z obr. 5 je ovšem vidět, že spojením všech uvedených ovocných pálenek do vstupní matice již nedochází k dobrému rozlišení. Z uvedených výsledků je zřejmé, že pro komplexnější charakterizaci bude nutné vyhledat další, specifičtější markery destilátů. Nadějnou skupinu představují např. terpeny, mezi nimiž lze najít látky, které jsou do značné míry specifické pro jednotlivé druhy ovoce.

Závěr

Různé druhy ovocných destilátů byly matematicky analyzovány vícerozměrnou statistickou metodou, faktorovou analýzou, která dokázala rozlišit podobné druhy ovoce, pálenky pocházející z peckovin a pálenky pocházející z jádrového ovoce. Společnou analýzou všech ovocných destilátů však nebylo možné dosáhnout dostatečného rozlišení jednotlivých druhů ovoce. Výrazné zlepšení lze předpokládat při použití specifičtějších markerů (např. terpenů). Jejich vyhledání je důležitým úkolem budoucího výzkumu. Vybrané nízkomolekulární látky představují překvapivou a perspektivní skupinu univerzálních markerů destilátů.

Autoři děkují Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy za finanční podporu (Grant č. MSM 6198959216).

LITERATURA

1. Merzoch K.: *Lihoviny jako "zdravotně nezávadné" potraviny?* V: Sborník Otevřená věda, Praha 2005, <http://www.otevrena-veda.cz>, staženo 19.10.2006.
2. Dyr J., Dyr J. E.: *Výroba slivovice a jiných pálenek*. Maxdorf, Praha 1997.
3. Demyttenaere J. C. R., Sánchez Martínez J. I., Verhé R., Sandra P., De Kimpe N.: *J. Chromatogr., A* 985, 221 (2003).
4. Lehtonen P. J., Keller L. A., Ali-Mattila E. T.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch., A* 208, 413 (1999).
5. Grégr V., Uher J.: *Výroba lihovin*. SNTL, Praha 1974.
6. Uhrová H.: *Děláme si sami slivovici, meruňkovici, hruškovici, jablek a jiné ovocné destiláty, vína, šťávy a sirupy*. Vikend, Vimperk 2001.
7. Reid K. J. G., Swan J. S.: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 25, 49 (1993).
8. Lukić I., Banović M., Petrusović D., Radeka S., Sladonja B.: *J. Chromatogr., A* 1101, 238 (2006).
9. Mangas J., Rodríguez R., Moreno J., Blanco D.: *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 29, 357 (1996).
10. Fitzgerald G., James K. J., MacNamara K., Stack M. A.: *J. Chromatogr., A* 896, 351 (2000).
11. Meloun M., Militký J., Hill M.: *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech*. Academia, Praha 2005.

M. Korhoňová, R. Hejdová, P. Barták, P. Bednář, and L. Čáp (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc): **Analysis of Markers for Characterization of Distillates**

Fruit distillates, such as apricot-brandy, plum vodka "Slivovitz", cider-brandy and pear-brandy, originating from domestic production, small distilleries and manufacturing production, were analysed by gas chromatography with mass spectrometry. Less specific, but universal markers present in all types of distillates were selected for first experiments: propan-1-ol, propan-2-ol, ethyl acetate, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 1,1-diethoxyethane, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, ethyl tetradecanoate, ethyl palmitate and ethyl stearate. Quantitative data were statistically evaluated by factor analysis. Regarding the minute specificity of selected markers, unexpectedly good resolution was observed in this case. The results of factor analysis indicate a possibility of differentiation of products from different fruits. Samples of apricot-brandy and plum vodka (drupes) can be differentiated. In the same way, distillates from apples and pears (pomes) can be easily differentiated. Although, the full resolution of all samples requires discovery of other specific markers, the proposed set of low-molecular-weight compounds is a promising group of universal markers for characterisation of distillates.

β-GLUKANY, HISTORIE A SOUČASNOST

MIROSLAV NOVÁK

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická
5, 166 28 Praha 6
novaks@vscht.cz

Došlo 16.1.07, přijato 15.5.07.

Klíčová slova: polysacharidy, β-glukan, imunomodulátory, houby, buněčná stěna, makrofágy, receptory, aktivace makrofágů

Obsah

1. Úvod
2. Historie
3. Zdroje a struktura β-glukanů
4. Mechanismus účinku
5. Nežádoucí účinky
6. Možné alternativy dalšího výzkumu
7. Závěr

1. Úvod

β-Glukan je chemické označení polymeru β-glukosy; takových polymerů, lišících se polohou glykosidové vazby je známo více (příkladem je celulóza – (1→4)-β-D-glukan). Následující údaje se budou týkat homopolymerů glukosy s lineární molekulou obsahující (1→3)-β-D-glykosidové vazby, případně s větvenou molekulou, obsahující navíc ještě postranní řetězce, vázané (1→6)-β-D-glykosidovými vazbami. Ačkoliv jde o chemicky dosti heterogenní skupinu, obvykle se tyto polysacharidy označují společným názvem β-glukany. Je třeba zdůraznit, že jde o označení celé řady podobných látek, které sice vyvolávají v makroorganismu – byť s rozdílnou intenzitou – podobné nebo téměř identické imunitní reakce, ale jsou různého původu, mohou se lišit primární, sekundární i terciární strukturou a některými dalšími vlastnostmi, především rozpustností ve vodě, v alkáliích za chladu a za tepla atd. Z toho vyplývají četné diskrepance, které lze nalézt v pracích různých autorů; tento fakt je třeba mít stále na mysli. Několik zdrojů β-glukanů je uvedeno v tabulce I.

Významnou vlastností β-glukanů a důvodem, proč jim je věnováno tolik pozornosti, jsou jejich fyziologické účinky. β-Glukany patří do skupiny fyziologicky účinných látek, které se souborně označují jako modifikátory biolo-

gické odpovědi (biological response modifiers, BRMs). Modifikátory biologické odpovědi lze podle mechanismu účinku dělit v zásadě na dvě skupiny – cytokiny, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami imunitního systému a regulaci, a imunomodulátory, ovlivňující funkci imunitního systému, buď pozitivně (imunopotenciace) nebo negativně (imunosuprese). Imunomodulátorů je známa celá řada a je možné je zhruba rozdělit do několika skupin^{1,2}:

1. intaktní mikroby, např. tzv. bacil Calmettův a Guérinův (BCG), a složky mikrobiálních buněk, např. endotoxin gramnegativních mikroorganismů (lipopolysacharid, LPS), muramyl-dipeptid (MDP), fungální polysacharidy, polynukleotidy, bestatin;
2. přirozené složky normálního imunitního systému, např. thymové hormony, lymfokiny, monokiny;
3. syntetické látky, např. levamisol, isoprinosin, diethyl-dithiokarbamat.

Mezi mnoha dosud známými a vyzkoušenými imunomodulátory první skupiny zaujímají významné místo polysacharidy izolované z různých rostlinných druhů. Takovýchto polysacharidů, vesměs fungujících imunopotenciačně, existuje velké množství³; do této skupiny náleží i β-glukany.

2. Historie

Již někdy od počátku osmnáctého století bylo známo, že některá infekční onemocnění vykazovala určitý terapeutický efekt na maligní bujení. Cílené použití takovéto terapie se datuje zhruba od poloviny devatenáctého století, kdy Busch⁴ prováděl pokusy o léčbu sarkomu infekcí erysipelu, tedy β-hemolytickými streptokoky skupiny A. Tyto léčebné postupy opakoval koncem devatenáctého století Coley⁵, který nakonec přešel od infikování pacientů kulturami bakterií k bezpečnějším extraktům z jejich kultur, konkrétně z kultury *Bacillus prodigiosus* (nyní *Serratia marcescens*); je to své doby známý Coleyův toxin (který byl později určen jako interleukin IL-12, cit.⁶). V bakteriologii bylo totiž známo již dávno, že některé složky mikroorganismů způsobují v těle vyšších organismů, především savců, prudké reakce, analogické patofyziologickým stavům při infekci intaktními mikroby. V tomto směru Coley ale nemá prvenství. Pravděpodobně první takto zkoumanou látkou byly endotoxiny (lipopolysacharidy, LPS) gramnegativních bakterií (jako jsou *Escherichia coli*, rody *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* a další); o LPS byla publikována zmínka před více než 140 lety⁷. Lipopolysacharidy jsou komplexní sloučeniny, skládající se z lipidické složky (lipid A), obsahující C12 a C14 mastné kyseliny, navázané glykosidovými vazbami na jádrový polysacharid, který je spojen s výrazně imunogenním O-antigenem proměnlivého složení, tvořeným

Tabulka I

Některé β -glukany s imunomodulačním účinkem

Název	Zdroj	Charakter polymeru
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i>	lineární
Laminaran	<i>Laminaria sp.</i>	lineární
Pachyman	<i>Poria cocos</i>	větvený
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	větvený
Pleuran (HA-glucan)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	větvený
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	větvený
Sclerotinan (SSG)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	větvený
Scleroglucan	<i>Sclerotium glaucum</i> , <i>S. rolfsii</i>	větvený
Grifolan	<i>Grifola frondosa</i>	větvený
T-4-N, T-5-N	<i>Dictyophora indusiata</i>	větvený
Yeast glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	větvený

opakujícími se oligosacharidovými jednotkami. U člověka a experimentálních zvířat LPS vyvolávají zvýšenou fagocytosu, která může mít pro hostitele protektivní efekt, ale toxické účinky (horečka, průjem, hypotenzní šok, intravaskulární koagulace, mnohočetná orgánová selhání) zcela převažují. Principem toxicity LPS je jeho lipidická část, zatímco polysacharidová složka, s převažujícím obsahem glukosy, galaktosy a mannosy⁸, je netoxická a má výrazné imunomodulační vlastnosti. Je patrné, že i samotné polysacharidy mohou fungovat jako imunomodulátory, přičemž jejich toxicita je nepatrná.

Tabulka II

Začlenění mikrobiálních polysacharidů v historii imunomodulátorů

Rok	
1865	endotoxin (LPS)
1894	erysipelové toxiny, <i>B. prodigiosus</i>
1936	mykobakteriální adjuvancia (BCG)
1941	zymosan
1943	polysaccharid ze <i>S. marcescens</i>
1963	<i>Corynebacterium parvum</i>
1964	thymové hormony
1967	picibanil (OK-432)
1968	kvasničný glukán
1969	lentinan
1967	dvojitelné polynukleotidy
1970	tuftsin
1971	levamisol
1975	MDP

Vlastní historie použití polysacharidů jako imunomodulátorů sahá do čtyřicátých let minulého století, kdy Shear se spolupracovníky⁹ popsal látku – opět z kultury *Serratia marcescens* – která způsobovala nekrozu tumorů. Později tato látka (tzv. Shearův polysacharid) byla identifikována jako směs tří polysacharidů, obsahujících hlavní řetězec z D-glukosových a D-mannosových zbytků vázaných (1→3) glykosidovými vazbami¹⁰.

Postupně byly hledány další polysacharidové imunomodulátory pocházející z různých zdrojů a tak se objevily na scéně β -glukany. Počátky výzkumu β -glukanů spadají do šedesátých a sedmdesátých let minulého století. V historii β -glukanů lze vystopovat dvě linie, vycházející z odlišných východisek, ale postupně konvergující: první probíhala především v USA a také v Evropě, druhá v Asii, především v Japonsku. Výzkum β -glukanů v euroamerickém prostředí vycházel z poznatků o imunomodulačním účinku zymosanu, což je směs polysacharidů, izolovaná ze stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan byl připraven a zkoumán nejprve Pillemerem ve čtyřicátých letech minulého století¹¹; od té doby byl použit v řadě fyziologických a imunologických studií. Jde o potentní stimulátor především alveolárních makrofágů, který mj. indukuje uvolňování řady cytokinů, především IL-8, z lidských neutrofilů. Ačkoliv zymosan byl schopen stimulovat nespecifickou imunitní odpověď, nebylo zpočátku jasné, která složka této poněkud hrubé kompozice je za tuto stimulaci odpovědná. Při hlubším zkoumání zymosanu byl jako primární účinná složka identifikován právě β -glukan, který byl izolován a zkoumán jeho imunomodulační účinek. Pionýrské práce v tomto směru provedl Nicholas R. DiLuzio^{12,13} z Tulane University v New Orleans.

V Japonsku k β -glukanu dospěli poněkud odlišným způsobem. V asijské medicíně má velmi dlouhou tradici konzumace různých léčivých hub (shiitake, maitake, reishi ad.). Podrobným zkoumáním biologických efektů, zejména antikancerogenních účinků těchto hub byl opět jako hlavní příčina nespecifické imunomodulace zjištěn β -glukan. Po-

čátky tohoto výzkumu jsou spojeny se jménem Goro Chiha-ry z Teikyo University v Kawasaki, který izoloval β -glukan, nazvaný jím lentinan, z houby shiitake (*Lentinus* (nyní *Lentinula*) *edodes*)¹⁴.

Všechny dostatečně purifikované polysacharidové imunomodulátory se vyznačují velmi nízkou toxicitou (např. u lentinanu je pro myš $LD_{50} > 1600 \text{ mg kg}^{-1}$, cit.¹⁵). Časové začlenění β -glukanů v historii rozličných imunomodulátorů je uvedeno v tabulce II.

Výzkum chemického složení β -glukanů má rovněž dlouhou, i když nikoliv přímočarou historii. Složení stěn různých mikrobiálních producentů β -glukanu, především kvasinek, bylo zkoumáno již v devatenáctém století. Van Wisselingh¹⁶ již v roce 1898 publikoval názor, že v buněčné stěně hub může převažovat buď chitin nebo celulósa.

Na příkladu β -glukanu ze stěn *Saccharomyces cerevisiae* je možné ilustrovat, jak obtížné bylo v první polovině minulého století exaktní stanovení chemické struktury. V padesátých a šedesátých letech minulého století byl β -glukan, izolovaný ze stěn *Saccharomyces cerevisiae* podroben zkoumání s využitím tehdy běžného aparátu analýzy sacharidů, tj. parciální kyselá hydrolyzy, enzymové hydrolyzy, methylační analýzy, jodistanové oxidace, Smithovy degradace (tj. jodistanové oxidace, redukce NaBH_4 a parciální hydrolyzy) ad., zpočátku ovšem se značně diskrepantními výsledky^{17,18}. Teprve zjištění, že ve stěně kvasinek se může vyskytovat několik různých typů β -glukanu¹⁹, vedlo k detailní frakcionaci komponent stěn sacharomycet a k chemické charakterizaci nalezených složek²⁰ a ustálil se názor, že hlavní složkou β -glukanu ze stěn sacharo-

mycet je mírně větvený (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glukan s vysokou molekulární hmotností (DP kolem 1500, molekulová hmotnost ca 240 kDa), s obsahem kolem 3 % větvení β -(1 $\rightarrow$ 6); je to běžný partikulární „kvasničný β -glukan“.

Značná heterogenita všech přírodních β -glukanů, nejenom ze sacharomycet, ale i z různých dalších zdrojů, pochopitelně byla a dosud stále je příčinou řady vzájemně si odporujících závěrů. V nedávné době se tento problém začal řešit přípravou semisyntetických a syntetických sond, vhodných pro exaktní imunologický výzkum²¹.

3. Zdroje a struktura β -glukanů

V přírodě se β -glukany vyskytují v různých zdrojích, ovšem nejčastěji byly a jsou připravovány z buněčných stěn hub. β -Glukan se nalézá také v mořských řasách (lineární (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glukan, laminaran z rodu *Laminaria* sp.)²², produkují jej i bakterie (curdlan z *Alcaligenes faecalis*)²³ a je obsažen rovněž v obilovinách; tam má poněkud odlišné složení než fungální (obsahuje ještě β -(1 $\rightarrow$ 4) vázanou glukosu).

Taxonomicky se pojem „houby“ vyvíjel a řada organismů, dříve řazených mezi *Fungi*, je dnes zařazována do jiných říší; hovoříme-li dále o houbách, bude tento taxonomický delikt zmírněn uváděním tohoto slova v uvozovkách. Příklady složení stěnových polysacharidů u různých „hub“ jsou uvedeny v tabulce III, z níž je patrné, že významnými producenty β -glukanů jsou především askomycety, kam náležejí kvasinky a některé vláknité plísňe,

Tabulka III
Složení stěnových polysacharidů některých „hub“

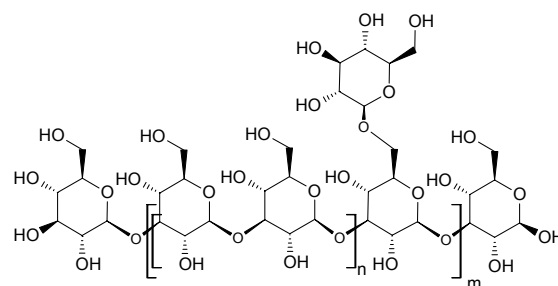
Říše	Třída	Příklad		Převažující stěnové polysacharidy vegetativních buněk
		řád	rod a druh	
Protista	<i>Acrasiomycetes</i>	<i>Dictyosteliales</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>	celulósa – glykogen
	<i>Oomycetes</i>	<i>Perenosporales</i>	<i>Plasmopara viticola</i> <i>Phytophthora infestans</i>	celulósa – β -glukan
Chromista	<i>Hyphochytridiomycetes</i>	<i>Hyphochytriales</i>	<i>Rhizidiomyces parasiticus</i>	celulósa – chitin
	<i>Zygomycetes</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucor mucedo</i>	chitosan – chitin
	<i>Chytridiomycetes</i>	<i>Chytridiales</i>	<i>Blastocladiella emersonii</i>	chitin – β -glukan
	<i>Ascomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Homobasidiomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	
Fungi		<i>Stereales</i>	<i>Grifola frondosa</i> <i>Schizophyllum commune</i>	
	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosacch. octosporus</i>	mannan – β -glukan
	<i>Hypomycetes</i>	<i>Sporobolomycetaceae</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>	mannan – chitin

a basidiomycety, kam mj. náleží většina makromycet, tedy hub – jedlých či nejedlých – v původním slova smyslu, ať již nalézaných v přírodě, nebo uměle pěstovaných.

Buněčná stěna tvoří podstatnou část hmotnosti fungálních buněk; u kvasinek je to mezi 15 až 25 %. Nejde o inertní strukturu, ale živou organelu, která plní řadu funkcí – mechanickou ochranu, zajištění osmotické stability, vazbu sloučenin, vzájemnou adhezi buněk apod. Buněčná stěna rovněž funguje jako nosič enzymů a selektivně permeabilní bariéra.

Výzkum buněčné stěny různých druhů „hub“ nevedl přímočaře k jasnému modelu její struktury a představy o jejím uspořádání prošly určitým vývojem. Buněčná stěna kvasinek podle Stratforda²⁴ připomíná armovaný beton – armaturu představují fibrily v alkáliích nerozpustného (1→3)-β-D-glukanu, tvořící kolem 35 % hmotnosti stěny, a výztuž je obklopena výplní mannoproteinů (kolem 25–35 % stěny), vázanou k ní amorfním β-glukanem a chitinem; podobně je konstruována buněčná stěna i dalších „hub“. V zásadě stejný model fungální stěny publikoval Selitrennikoff²⁵. V nedávné době publikoval Grün²⁶ model buněčné stěny askomycet a basidiomycet, podle něž se buněčná stěna většiny „hub“ skládá z pěti hlavních složek: (1→3)-β-D-glukanu, (1→6)-β-D-glukanu, (1→3)-α-D-glukanu, chitinu a glykoproteinů. (1→3)-α-D-Glukan chybí v kvasinkách (např. u *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*), ale je nalézán u celé řady dalších příslušníků třídy *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*, kde tvoří 9–46 % hmotnosti buněčné stěny. Chitin u sacharomycet je přítomen pouze v zárodečných jizvách.

I když se různé modely buněčné fungální stěny poněkud liší, shodují se v tom, že (1→3)-β-D-glukan neleží přímo na povrchu stěny, ale je do ní více méně vnořen. Z toho vyplývá významná skutečnost, týkající se jak imunologického výzkumu, tak farmaceutického využití β-glukanů. V makroorganismu β-glukany fungují především jako markery fungální invaze, tedy aktivita preparátů se vzhledem k lokalizaci β-glukanů bude zvyšovat se stupněm obnažení glukanových fibril; zde se projeví efektivnost různých způsobů izolace a purifikace.



Obr. 1. Obecná struktura větveného β-glukanu; hodnoty *m* a *n* závisí na původu β-glukanu; u lineárních β-glukanů postranní řetězec chybí

β-Glukany jakéhokoliv původu lze obecně dělit do dvou velkých skupin:

A. β-Glukany tvořící ve vodě gel („rozpustné“), které lze ještě dělit dále:

- a) vysokomolekulární větvené β-glukany (např. grifolan, schizophyllan, scleroglucan – viz tab. I);
- b) lineární β-glukany (např. laminaran z hnědých mořských řas);
- c) chemicky modifikované β-glukany (např. karboxymetylované, sulfonované či fosforylované β-glukany).

B. Partikulární („nerozpustné“) β-glukany (např. kvasničný glukan).

β-Glukany první skupiny jsou kromě toho obvykle kompletně rozpustné v alkáliích. V novější době byl vysloven předpoklad, že (alespoň u některých β-glukanů) rozpustnost nebo nerozpustnost v alkáliích je dána pouze rozsahem, v jakém jsou provázány s chitinem²⁷.

Názory na vztah struktury a biologické účinnosti prošly vývojem. Donedávna se předpokládalo, že biologicky účinné β-glukany mají podobnou strukturu – skládají se z hlavního řetězce z β-D-glukopyranosových jednotek spojených vazbou (1→3), na který je v náhodných místech navázáno vazbou (1→6) po jedné β-D-glukopyranose (obr. 1). Ovšem detailní struktura těchto polysacharidů z různých zdrojů se liší, podobně jako jejich biologická

Tabulka IV
Stupeň větvení (DB) u různých β-glukanů

β-Glukan	Zdroj	DB
Pachyman	<i>Poria cocos</i>	0,015–0,02
Kvasničný glukan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,03–0,2
Lentinan	<i>Lentinula edodes</i>	0,23–0,33
Pleuran	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,25
Grifolan	<i>Grifola frondosa</i>	0,31–0,36
Skleroglukan	<i>Sclerotium glaucum</i>	0,3
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	0,33
SSG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0,5

aktivita^{28–32}. Molární stupeň větvení (degree of branching, DB) některých β -glukanů je uveden v tabulce IV. V nativním β -glukanu se skládají fibrily z organizovaných částí, kdy hlavní řetězce jsou stočeny do trojitě šroubovice; tyto oblasti jsou kombinovány s jednoduchými nebo dvojitými vlákny z (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glukopyranos^{33,34}. Trojnásobný helix, stabilizovaný postranními řetězci, se ovšem pravděpodobně vyskytuje pouze u β -glukanů s velkou molekulovou hmotností (>90 kDa)³⁵; tento konformer je tvořen vždy třemi vodíkovými vazbami v poloze C-2 (cit.³⁶). Vodíkové vazby lze přerušit zvýšenou teplotou, vysokým pH nebo určitými rozpouštědly.

V otázkách vztahu struktury, velikosti molekuly a biologické účinnosti se literární údaje dosti liší. Například antitumorová aktivita schizophyllanu se údajně projevuje pouze tehdy, vyskytuje-li se ve formě trojitěho helixu a při molekulové hmotnosti větší než 100 kDa (cit.³⁷). Obecně si lze ovšem představit, že trojnásobná helikální struktura pravděpodobně nebude jedinou účinnou formou β -glukanu, neboť působením alkalického prostředí, které se používá ve většině izolačních postupů, dochází k jejímu rozvolňování^{38–40}. Nejnovější náhledy rovněž nepotvrzují vžité představy o nutnosti velké molekulové hmotnosti a větvení biologicky účinných β -glukanů – zdá se, že zřejmě nejsou nutnou podmínkou pro účinek β -glukanů. U antigenních polysacharidových determinantů již před třiceti lety zjistil Kabat⁴¹, že velikost vazebního místa na protilátce odpovídá šesti nebo sedmi monosacharidovým jednotkám. Zdá se, že i u β -glukanu velikost vazebního místa – tentokrát na receptoru imunokompetentní buňky, např. makrofágu – může zhruba odpovídat tomuto počtu glukosových zbytků^{21,42}.

4. Mechanismus účinku

Hlavní imunofarmakologické aktivity β -glukanů zahrnují zvýšení rezistence hostitele vůči virovým⁴³, bakteriálním^{35,44}, fungálním a parazitárním infekcím⁴⁵, protinádorový efekt a prevenci karcinogeneze^{46,47,78} a radioprotektivní účinky^{49–51}; v Japonsku se již využívá fungálních β -glukanů (lentinan, schizophyllan) při léčbě rakoviny klinicky⁵². Je známa protektivní role β -glukanů vůči genotoxickým účinkům některých protirakovinných léčiv (cyklofosfamid, adriamycin, cisplatina)^{53,54}. Kvasničný β -glukan je schopný absorbovat mykotoxiny (zearalenon, aflatoxin B1, deoxynivalenol, ochratoxin A, patulin), pravděpodobně prostřednictvím vodíkových můstků a van der Waalových sil; tento efekt β -glukanů je významný zejména u hospodářských zvířat⁵⁵. V poslední době se rovněž prokázalo, že β -glukan může mít významný efekt při profylaxi následků použití biologických zbraní, především nákazy anthraxem⁵⁶. Významný je účinek obilovin (ječmen, oves) a jedlých hub (*Grifola frondosa*, *Lentinula edodes* a *Flammulina velutipes*⁵⁷; *Pleurotus ostreatus*⁵⁸; *Agaricus bisporus*⁵⁹), daný obsahem β -glukanů, na snižování hladiny

serového cholesterolu a jaterního lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL), vedoucí ke snižování rizika aterosklerózy a onemocnění srdce. Je známo, že obilniny, houby a kvasinky podporují střevní motilitu a mohou být využity k zlepšení intestinálních potíží, zejména obstrukce^{60,61}; nestavitelné β -glukany představující významnou složku těchto látek, mohou rovněž modulovat mukosální imunitu střevního traktu⁶². V centrálním nervovém systému β -glukany aktivují mikrogliové buňky⁶⁵; mikroglia hraje významnou úlohu při ochraně před onemocněním typu Alzheimerovy nemoci nebo AIDS⁶⁶.

Možné účinky β -glukanů v makroorganismu jsou tedy velmi rozmanité a zasahují nejen imunitní systém, pravděpodobně je však většina popsáných účinků určitým způsobem s funkcí imunitního systému více či méně spojena. Nejvýrazněji se účinek β -glukanů projevuje zvýšením fagocytární a proliferativní aktivity profesionálních fagocytů. Mezi tyto buňky náleží neutrofilní granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. V projevech biologické aktivity β -glukanů se nejvíce uplatňují makrofágy^{14,63,64}, které jsou považovány za základní výkonné buňky v obraně hostitele proti bakteriím, virům, vícebuněčným parazitům, nádorovým buňkám a chybným vlastním buněčným klonům.

Makrofágy jsou součástí nespecifického (vrozeného, neadaptivního), evolučně staršího imunitního systému, který kromě fagocytů, tj. buněk pohlcujících mikroorganismy, zahrnuje složitou soustavu sérových proteinů zvaných souhrnně komplement a celou řadu dalších rozpustných rozpoznávacích a efektorových molekul⁶⁷. Vrozená imunita je založena na neklonových receptorech (pattern recognition receptors, PRRs, znaky rozpoznávající receptory), které rozeznávají určité molekuly na povrchu invadujícího mikroorganismu, souhrnně označované jako molekulární znaky asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs); navzdory názvu nejsou unikátní pouze pro patogeny, pro přežití a patogenitu daného organismu jsou ovšem zásadní. PAMPs se odlišují od molekul hostitele, nepodléhají antigenní proměnlivosti, jsou evolučně vysoce konzervované a invariantní u všech mikroorganismů určité třídy. Náleží k nim mj. různé biopolymery, tedy i β -glukany, které – jak bylo zmíněno výše – jsou obligátní složkou povrchu většiny „hub“.

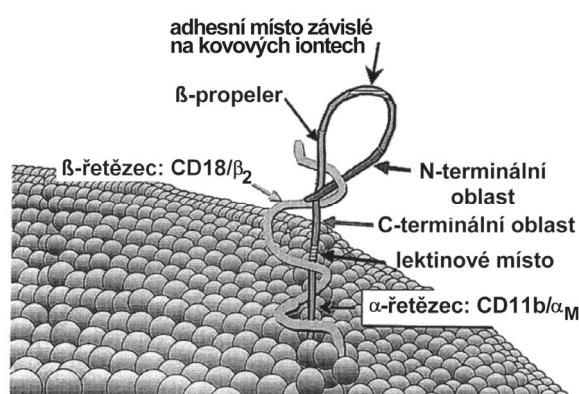
Makrofágy detegují PAMPs prostřednictvím celé řady receptorů. K rozpoznávání β -glukanu mají makrofágy k dispozici několik receptorů: TLR-2 (toll-like receptor 2), dectin-1, CR3 (complement receptor 3), laktosylceramid a pravděpodobně i další. Receptory nejsou ovšem příliš specifické a detegují obvykle několik různých PAMPs.

Toll-like receptory (TLRs) byly objeveny relativně nedávno, ačkoliv jde o možná nejdůležitější receptorové molekuly neadaptivní složky imunitního systému. Jsou to typické znaky rozpoznávající receptory (PRRs), které se váží s molekulárními znaky asociovanými s patogeny (PAMPs); u obratlovců napomáhají aktivaci adaptivního

Tabulka V

Příklady makrofágových receptorů a odpovídajících molekulární znaků asociovaných s patogeny (PAMPs)

Charakter receptoru	Receptor	Primární PAMP
Transmembránové proteiny	CR3	iC3b opsonizované částice, LPS, β -glukan, <i>Candida albicans</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>
	dectin-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , β -glukan, <i>C. albicans</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>
	TLR-2	bakteriální lipoproteiny, LPS, zymosan, β -glukan
Glykosfingolipid	laktosylceramid	β -glukan, <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Helicobacter pylori</i>
Glykoproteiny	scavengerové receptory	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>H. pylori</i> , LPS, bakteriální DNA



Obr. 2. Schematické znázornění receptoru CR3 (podle⁴⁷); β -glukan se váže na lektinové místo

imunitního systému⁶⁹. TLRs odvozují své jméno od sekvenční homologie s proteinem, kódovaným genem Toll nalezeným u mušek rodu *Drosophilla*, kde hraje roli při embryogenezi a, jak bylo později nalezeno, u dospělců napomáhá ochraně před fungální infekcí^{70,71}. TLRs jsou transmembránové proteiny s extracelulárními repetitivními sekvencemi bohatými na leucin; dosud je jich známo asi 10, přičemž β -glukan (ale i zymosan, intaktní kvasinky, LPS a další) se váže především na TLR-2 (cit.^{72,73}).

Dectin-1 je lektin nalézající se na povrchu makrofágů, který se speciálně účastní detekce a fagocytózy fungálních patogenů; v určitých případech spolupracuje s TLR-2. Je to rovněž transmembránový protein a plní řadu funkcí, zahrnujících vazbu fungálního PAMP, pohlcení a usmrcení invadujících buněk a indukci tvorby cytokinů a chemokinů.

Komplementový receptor 3 (CR3, také označovaný jako integrin CD11b/CD18, α M β 2 a MAC1) je jedním

z nejvíce promiskuitních PR receptorů. Rozpoznává totiž kromě komplementových komponent celou řadu dalších ligandů, mezi nimi i β -glukan. Receptor CR3 se skládá z několika domén, rozpoznávání sacharidů zprostředkovává lektinová doména⁴⁷ (obr. 2). Pokud dojde k současné vazbě fragmentu komplementu iC3b, spouští navázání β -glukanu fagocytosu a degranulaci.

Laktosylceramid (také označovaný CDw17 nebo Gal β 4Glc β 1Cer) je glykosfingolipidový PRR, který se nalézá v plasmatické membráně. Rozpoznávání β -glukanu zprostředkované laktosylceramidem vyvolává různé buněčné odpovědi, včetně produkce cytokinů a respiračního vzplanutí⁷⁴. Příklady makrofágových receptorů a odpovídajících PAMPs jsou uvedeny v tabulce V.

Navázání β -glukanu na receptor makrofágy aktivuje. Aktivace zahrnuje několik souvisejících pochodů:

- zvýšený pohyb (chemokinesi) makrofágů,
- směrově orientovaný pohyb (chemotaxi), migraci makrofágů k částicím, které mají být fagocytovány,
- degranulaci vedoucí ke zvýšené expresi adhesivních molekul na povrchu makrofágů, k podpoře adheze k endoteliu, a k migraci makrofágů do tkání,
- intracelulární procesy, charakterizované oxidativním (respiračním) vzplanutím po fagocytose invadující buňky (tvorba cytotoxických reaktivních kyslíkatých intermediátů a volných radikálů (peroxid vodíku, hydroxylový radikál, superoxidový radikál, NO, HClO, HIO ad.)), zvýšením obsahu a aktivity hydrolytických a metabolických enzymů,
- signalizační procesy, které vedou k aktivaci dalších fagocytů a sekreci cytokinů a jiných látek vyvolávajících zánětlivé reakce (např. interleukiny IL-1, IL-6, tumor nekrotizující faktor TNF- α).

Pro farmakologický efekt β -glukanu je důležité, že účinek aktivovaných makrofágů nesměřuje pouze proti aktivátoru, ale také proti jakémukoliv přítomnému antigenu, mikroorganismu nebo nádorové buňce. Vzhledem k tomu,

že savci postrádají ve své enzymové výbavě β -glukanasy, představují současně makrofágy pravděpodobně jediný nástroj likvidace β -glukanu v těle; fagocytovaný β -glukan je v nich degradován oxidativní cestou⁶⁸.

5. Nežádoucí účinky

Převažující imunofarmakologický účinek β -glukanů je pozitivní, nelze však přehlédnout ani určité nepříznivé vedlejší účinky, které tyto látky mají. V současné době je popsáno poměrně málo nežádoucích efektů β -glukanů, nicméně lze předpokládat, že s postupujícím prohlubováním znalostí o širokospektrých účincích těchto látek se tato oblast bude rozšiřovat.

Intramuskulárně podávaný partikulární β -glukan působí v místě vpichu zánětlivou reakci a tvorbu granulomů, a především je tento způsob aplikace značně bolestivý⁸⁷.

Samotný fakt, že β -glukan je příčinou vzniku zánětlivé reakce, sebou přináší určité nebezpečí. Fyziologický zánět probíhá v rozsahu i tempu odpovídajícím vyvolávající noxe, tedy přítomnosti β -glukanu. Pokud však působení noxy přetrvává – a to vzhledem k obtížné odbouratelnosti β -glukanu je možné – může dojít k patologickému zánětu s nadměrným tkáňovým poškozením, s přechodem do chronicity, poruchami imunoregulace a rozvojem imunopatologického (např. autoimunitního) procesu. Nejzávažnější hrozbu představuje generalizace zánětlivých dějů s rozvojem šoku a fatálním multiorgánovým selháním (multiple organ dysfunction syndrome, MODS); takový případ byl popsán u zymosanu⁷⁵.

Dvoješedná je funkce oxidu dusnatého. Oxid dusnatý, „molekula roku 1992“, za objev jehož fyziologických účinků byla v roce 1998 udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství, je v makrofázích produkován inducibilní syntasou oxidu dusnatého (iNOS); její syntéza je spouštěna navázáním β -glukanu na PRR. Produkovaný oxid dusnatý působí cytotoxicky na nádorové buňky^{76,77} a má výrazný antimikrobní účinek na řadu patogenů^{78,79}, na druhé straně ale působí poškození tkání a DNA⁸⁰ a ve vysokých koncentracích může působit septický šok: přetrvávající působení aktivátoru indukuje expresi iNOS a zvýšená tvorba NO, která má likvidovat infekci, působí vasodilatačně na cévy, čímž dochází k silnému poklesu cévního odporu a tlaku krve⁸¹; u β -glukanu zatím takovýto efekt nebyl popsán, ale je představitelný.

Inhalace intaktních buněk nebo buněčného detritu plísni nebo kvasinek, což jsou součástí domácího prachu⁸² nebo různých zemědělských a průmyslových prachů⁸³, způsobuje tzv. syndrom toxického organického prachu (TODS), který je charakterizovaný plicními reakcemi, včetně zánětu plic, kašle a chronické bronchitidy⁸⁴, dále rhinitidou, bolestmi hlavy a drážděním očí a krku⁸⁵. Podstatou těchto potíží je β -glukan, který prostřednictvím aktivace makrofágů, monocytů a leukocytů působí zvýšenou sekreci prozánětlivých složek (mj. TNF- α a IL-8).

Vzhledem k tomu, že aplikace β -glukanů v lidském

těle vyvolává prozánětlivé pochody, lze předpokládat, že může dojít ke kompetitivní interakci s protizánětlivými léčivy. Skutečně byl popsán letální efekt, způsobený deregulací cytokinového systému, u myši, kterým byl podáván β -glukan (Sonifilan) a indometacin⁸⁶, nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID).

6. Možné alternativy dalšího výzkumu

Přírodní původ z různých zdrojů, polymerní charakter, způsoby izolace, nerozpustnost nebo omezená rozpustnost preparátů, jejichž frakcionace je pak nereálná, to vše vede k tomu, že každý preparát β -glukanu, zejména partikulárního, je nutně heterogenní. I když v řadě případů heterogenita β -glukanu z hlediska velikosti molekuly, větvení a krystalické nebo amorfní struktury zásadním způsobem nemění účinky β -glukanu *in vivo*, pro seriózní farmakologický výzkum i pro schvalovací řízení je to značnou komplikací. Není divu, že většina preparátů obsahujících β -glukan – aby se tyto komplikace obešly – je zařazena jako potravinová pro zvláštní výživu nebo potravní doplněk. Tímto způsobem se ovšem na trh dostává nepřehledné množství různých výrobků, obsahujících větší či menší množství β -glukanu, mnohdy značně pochybného původu, s nejistým účinkem a klamavou reklamou.

Problém heterogenity a nestandardnosti různých přírodních β -glukanů na solidní výzkumné úrovni lze řešit různě. Především se naskytá možnost zdokonalování izolačních postupů k získání produktů s co možná úzce vymezeným chemickým složením, a využití moderních metod fyzikálně-chemické analýzy k jejich spolehlivé identifikaci. Další možností je příprava chemicky modifikovaných glukanů, které díky své značné rozpustnosti je možné poměrně úspěšně frakcionovat; u některých takovýchto produktů ale klesá biologická účinnost. V nedávné době se tento problém začal řešit přípravou semisyntetických a syntetických sond, vhodných pro exaktní imunologický výzkum²¹. Obecným řešením je navázání krátkých oligomerů glukosy obsahujících β -(1→3) a β -(1→6) vazby na polymerní nosič s definovanou velikostí a strukturou. Lze důvodně předpokládat, že takovýto „syntetický“ β -glukan bude interagovat s receptory imunokompetentních buněk a vyvolávat analogické reakce, jako β -glukan přirozený; z imunofarmakologického hlediska by jej mohl konečně zcela nahradit.

Všechny tyto kroky jsou vedeny snahou zajistit β -glukanům adekvátní pozici, která primárně vyplývá z jejich mohutných imunofarmakologických účinků, ale díky problémům zmíněným na počátku odstavce je někdy obtížně hájitelná.

7. Závěr

Mezi mnoha dosud známými a vyzkoušenými imunomodulátory zaujímají významné místo polysacharidy izo-

lované z různých přírodních zdrojů. Významnou skupinu těchto polysacharidů představují homopolymery glukosy, označované stručně jako β -glukany, s lineární molekulou obsahující (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glykosidové vazby, případně s větvenou molekulou, obsahující ještě (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glykosidové vazby. β -Glukany se staly na určitou dobu téměř módní záležitostí, k čemuž jistě přispěla jejich významná vlastnost – nízká až zanedbatelná toxicita, což se o řadě dalších imunomodulátorů nedá tvrdit. Byl testován jejich účinek na nejrůznější onemocnění – infekce, choroby z ozáření a především na neoplastické bujení. Pozůstatkem těchto pionýrských let je záplava různých potravních doplňků a „alternativních“ léčiv, nabízených obvykle chabě poučenými neodborníky. Samozřejmě, že po určité době vlna nadšení opadla a β -glukany byly naopak řadou odborníků vystaveny – mnohdy neoprávněné – kritice. Důvodem byly především málo definované preparáty, a nespecifický a příliš komplexní účinek. V prvotním nadšení byly přezírány i možné nežádoucí účinky β -glukanů. Zhruba v posledním desetiletí dospěl výzkum β -glukanů na renomovaných pracovištích do stadia, kdy jsou známy základní mechanismy jejich účinku, a souvislosti mezi strukturou a účinkem dostávají jasné obrysy. β -Glukanům se tak reálně rýsují ty možnosti, které jim byly dávány do vínku při jejich debutu před téměř půlstoletím. Značnou pozornost věnuje příbuzné problematice i tento časopis^{87,88}.

Práce na této publikaci byla financována z grantu GA ČR 521/07/J039 a 525/05/0273.

LITERATURA

- Werner G. H., v knize: *Immunostimulants: Now and Tomorrows*, s. 3. Japan Sci. Soc. Press 1987.
- Franěk J., Nouza K.: *Vesmír* 67, 89 (1988).
- Whistler R. L., Bushway A. A., Singh P. P., Nakahara W., Tokuzen R.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 235 (1976).
- Busch W.: *Berl. Klin. Wochenschr.* 5, 137 (1868).
- Coley W. B.: *Am. J. Med. Sci.* 108, 50 (1894).
- Tsunga K., Norton J. A.: *Surgic. Oncol.* 15, 25 (2006).
- Billroth T.: *Arch. Klin. Chir.* 6, 372 (1865).
- Nowotny A.: *Bact. Rev.* 33, 72 (1969).
- Shear M. J., Turner F. C., Perrault A., Shovelton T.: *J. Natl. Cancer Inst.* 4, 81 (1943).
- Srivastava H. C., Adams G. A.: *Can. J. Chem.* 40, 1415 (1962).
- Pillemer L., Ecker E. E.: *J. Biol. Chem.* 137, 139 (1941).
- DiLuzio N. R., Hoffmann E. O., Cook J. A., Browder W., Mansell P. W. A., v knize: *Progress in Cancer Research and Therapy*, s. 475. Raven Press 1977.
- Williams D. L., Al-Tuwaijri A., DiLuzio N. R.: *Internat. J. Immunopharmacol.* 2, 189 (1980).
- Chihara G., Maeda Y. Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuo F.: *Nature* 222, 687 (1969).
- Chihara G., Maeda Y. Y., Hamuro J.: *Int. J. Tis. React. IV*, 207 (1982).
- van Wisselingh C.: *Jahrb. Wiss. Botan.* 31, 619 (1898).
- Manners D. J., Patterson J. C.: *Biochem. J.* 105, 19c (1966).
- Bell D. J., Northcote D. H.: *J. Chem. Soc.* 1950, 1944.
- Bacon J. S. D., Farmer V. S.: *Biochem. J.* 110, 34P (1968).
- Manners D. J., Masson A. J., Patterson J. C., Bjorndal H., Lindberg B.: *Biochem. J.* 135, 19 (1973).
- Jamois F., Ferrières V., Guégan J.-P., Yvin J.-C., Plusquellec D., Větvicka V.: *Glycobiol.* 15, 393 (2005).
- Black W. A. P., Cornhill W. J., Dewar E. T., Woodward F. N.: *J. Appl. Chem.* 1951, 505.
- Harada T., Misaki A., Saitô H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 292 (1968).
- Stratford M.: *Yeast* 10, 1741 (1994).
- Selitrennikoff C. P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883 (2001).
- Grün Ch. H.: *Structure and Biosynthesis of Fungal α -Glucans*. Proefschrift Universiteit, Utrecht 2001.
- Brown J. L., Kossaczka Z., Jiang B., Bussey H.: *Genetics* 133, 837 (1993).
- Rees D. A., Scott W. E.: *J. Chem. Soc. (B)* 1971, 469.
- Wagner H., Stuppner H., Schafer W., Zenk M.: *Phytochem.* 27, 119 (1988).
- Jamas S., Easson D. D. Jr., Ostroff G. R., Onderdonk A. B.: *ACS Symp. Ser.* 1469, 44 (1991).
- Kraus J., Franz G.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 319, 299 (1992).
- Bohn J. A., BeMiller J. N.: *Carbohydr. Polym.* 28, 3 (1995).
- Saitô H., Tabeta R., Yoshioka Y., Hara Ch., Kiho T., Ukai S.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 60, 4267 (1987).
- Ohno N., Adachi Y., Yadomae T.: *Chem. Pharmacol. Bull.* 36, 1198 (1988).
- Saitô H., Ohki T., Takasuka N., Sasaki T.: *Carbohydr. Res.* 58, 293 (1977).
- Chuah C. T., Sarko Y., Deslandes Y., Marchessault R. H.: *Macromol.* 16, 375 (1983).
- Kojima T., Tabata K., Itoh W., Yanaki T.: *Agr. Biol. Chem.* 50, 231 (1986).
- Young S.-H., Jacobs R. R.: *Carbohydr. Res.* 310, 91 (1998).
- Saitô H., Yoshioka Y., Uehara N., Aketagawa J., Tanaka S., Shibata Y.: *Carbohydr. Res.* 217, 181 (1991).
- Miura N. N., Ohno N., Adachi Y., Aketagawa J., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T.: *Biol. Pharmacol. Bull.* 18, 185 (1995).
- Kabat E. A.: *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, kap. 2. Holt, Rinehart a Winston, New York 1976.
- Větvicka V., osobní sdělení.
- Song M., DiLuzio N. R., v knize: *Lysosomes in Biology and Pathology*, (Dingle J. T., Jacques P. J., Shaw I. B., ed.), s. 533. Elsevier, Amsterdam 1979.

44. Hetland G., Lovik M., Wiker H. G.: *Scand. J. Immunol.* **47**, 548 (1998).
45. Goldman R., Jaffe C. L.: *Parasite Immunol.* **13**, 137 (1991).
46. Sherwood E. R., Williams D. L., DiLuzio N. R.: *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **8**, 157 (1986).
47. Ross G. D., Větvíčka V., Yan J., Xia Y., Větvíčková J.: *Immunopharmacol.* **42**, 61 (1999).
48. Williams D. L., Sherwood E. R., McNamee R. B., Jones E. L., DiLuzio N. R.: *Hepatology* **5**, 198 (1985).
49. Patchen M. L., MacVittie T. J.: *Int. J. Immunopharmacol.* **7**, 923 (1985).
50. Patchen M. L., MacVittie T. J.: *J. Biol. Respon. Mod.* **5**, 45 (1986).
51. Baker W. H., Nold J. B., Patchen M. L., Jackson W. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **201**, 180 (1992).
52. Kaneko Y., Chihara G., Taguchi T.: *Int. J. Immunother.* **4**, 203 (1989).
53. Tohamya A. A., El-Ghor A. A., El-Nahas S. M., Noshay M. M.: *Mutat. Res.* **541**, 45 (2003).
54. Chorvatovičová D., Navarová D.: *Mutat. Res.* **282**, 147 (1992).
55. Yiannikouris A., André G., Poughon L., François J., Dussap C.-G., Jeminet G., Bertin G., Jouany J.-P.: *Biomacromol.* **7**, 1147 (2006).
56. Větvíčka V., Terayama K., Mandeville R., Brousseau P., Kournikakis B., Ostroff G.: *J. Am. Nutraceut. Assoc.* **5**, 1 (2002).
57. Fukushima M., Ohashi T., Fujiwara Y., Sonoyama K., Nakano M.: *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **226**, 758 (2001).
58. Bobek P., Ozdin L., Kuniak L.: *Nahrung* **40**, 222 (1996).
59. Fukushima M., Nakano M., Morii Y. T., Fujiwara Y., Sonoyama K.: *J. Nutr.* **130**, 2151 (2000).
60. Dongowski G., Huth M., Gebhardt E., Flamme W.: *J. Nutr.* **132**, 3704 (2002).
61. Battilana P., Ornstein K.: *Eur. J. Clin. Nutr.* **55**, 327 (2001).
62. Tsukada C., Yokoyama H., Miyaji C., Ishimoto Y., Kawamura H., Abo T.: *Cell. Immunol.* **221**, 1 (2003).
63. DiLuzio N. R.: *Trends Pharmacol. Sci.* **4**, 344 (1983).
64. Quinn P. J.: *Adv. Veter. Sci. Comp. Med.* **35**, 43 (1990).
65. Muller C. D., Bocchini V., Giaimis J., Guerrieri P., Lombard Y., Poindron P.: *Res. Immunol.* **145**, 267 (1994).
66. Haga S., Akai K., Ishii T.: *Acta Neuropathol.* **77**, 569 (1989).
67. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, 2. vydání, s. 158. Triton 2002.
68. Nono I., Ohno N., Masuda A., Oikawa S., Yadomae T.: *J. Pharmacobiol. Dyn.* **14**, 9 (1991).
69. Imler J.-L., Zheng L.: *J. Leukoc. Biol.* **74**, 1 (2003).
70. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M., Hoffmann J. A.: *Cell* **86**, 973 (1996).
71. Bilak H., Tauszig-Delamasure S., Imler J.-L.: *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 648 (2003).
72. Underhill D. M., Ozinsky A., Hajjar A. M., Stevens A., Wilson C. B., Bassetti M., Aderem A.: *Nature* **401**, 811 (1999).
73. Hořejší J.: *Vesmír* **83**, 134 (2004).
74. Brown G. D.: *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 33 (2006).
75. Tanriverdi P., Yuksel B. C., Rasa K., Guler G., Iskit A. B., Guc M. O., Korkmaz A.: *J. Surgic. Res.* **124**, 67 (2005).
76. Hibbs J. B. Jr., Taintor R. R., Vavrin Z.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87 (1988).
77. Stuehr D. J., Nathan C. F.: *J. Exp. Med.* **169**, 1543 (1989).
78. Granger D. L., Hibbs J. B. Jr., Perfect J. A.: *J. Clin. Invest.* **81**, 1129 (1988).
79. James S., Claven J.: *J. Immunol.* **143**, 4208 (1989).
80. Billar T. R.: *Ann. Surg.* **221**, 339 (1995).
81. Vincent J. L., Zhang H., Szabo C., Preiser J.-C.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1781 (2000).
82. Beijer L., Thorn J., Rylander R.: *Mediators Inflamm.* **11**, 149 (2002).
83. Rylander R., Thorn J., Atteförs R.: *Eur. Respir. J.* **13**, 1151 (1999).
84. Sato M., Sano H.: *J. Immunol.* **171**, 417 (2003).
85. Alwis K. U., Mandryk J., Hocking A. D.: *Appl. Occupat. Environment. Hyg.* **14**, 598 (1999).
86. Yoshioka S., Ohno N., Miura T., Adachi Y., Yadomae T.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**, 171 (1998).
87. Zajoncová L., Šebela M.: *Chem. Listy* **101**, 36 (2007).
88. Mazán M., Mazánová K., Farkaš V.: *Chem. Listy* **100**, 433 (2006).

M. Novák (*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **β -Glucan, Its History and Present**

β -Glucan, a naturally occurring polysaccharide, is found mostly in the cell wall of fungi. In macroorganisms it acts as a potent biological response modulator. Its history began in the sixties of the last century, when it was found as a main component of zymosan as well as of extracts from medicinal Asian mushrooms. The review itemizes sources, structure, mechanisms of biological effects and adverse reactions of β -glucan and proposes alternatives of the future research.

PŘÍRODNÍ LÁTKY HOŘKÉ CHUTI

LUBOMÍR OPLETAL^a, JANA ČOPÍKOVÁ^b,
MICHAL UHER^c, OLDŘICH LAPČÍK^d, JITKA
MORAVCOVÁ^d a PAVEL DRAŠAR^d

^a Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,

^b Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^d Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavel.drasar@vscht.cz

Došlo 24.5.07, přijato 12.9.07.

Klíčová slova: přírodní látka, hořčiny, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Tradiční potravinářské přísady silně hořké chuti
3. Tradiční potravinářské přísady hořké chuti
4. Ostatní známé hořké sloučeniny
5. Trocha teorie o chuti hořké
6. Závěr

1. Úvod

Článek je dalším z řady přehledů, ve kterých popisujeme rozmanitost přírodních látek^{1–8} a který může sloužit i jako vhodná učební pomůcka*.

Hořká chuť je jedním z pěti chuťových principů (sladký, slaný, kyselý, hořký a umami)⁹. Organoleptický vjem na různé chuti může být přidáním hořké komponenty značně modifikován, což od nepaměti vědí např. lihovárníci¹⁰. Ve farmakognozii se uvádí termín hořčina (hořký princip). Mezi hořčiny se řadí takové sloučeniny obsažené v rostlinách, které jsou hořké chuti a mají současně farmakologický účinek: stimulaci nejspíše přes nervus vagus navozují m. j. vylučování trávicích enzymů a dalších, fyzi-

ologicky významných látek. Drogy využívající se pro svůj obsah hořčin se nazývají „amara“ a v přiměřených dávkách zlepšují chuť k jídlu, podporují sekreci žaludečních šťáv a jejich kyselost. Dále jsou hořčiny obsaženy m. j. i ve skupině drog zvané cholagoga, která podporují vyprazdňování žlučníku (cholekinetika) a nebo podporují tvorbu žluči (choleretika). Velké množství hořčin se spotřebuje v potravinářském průmyslu na výrobu likérů, aperitivů a jiných hořkých nápojů. Dnes jsou zejména vyhledávány hořké látky netoxické a nemající svravou (adstringentní) chuť. Pokud hodnotíme hořké drogy z hlediska potravinářského, jeví se jako cennější takové, které mají hořký princip podložený několika různými hořčinami, jejichž účinek je synergicky vyvážen do čisté hořké chuti. Rozsáhlou diskusí vlivu směsi hořčin a hořké chuti

Karlovarský hořký likér.
Důvodní Johann Becher z r. 1866.

280	gram	zeměžluč	
175	„	kořen hořce	
190	„	pelyněk	
140	„	mateřídouška	
140	„	dymián	
210	„	devětsil (podběl)	
105	„	jitrocel	
105	„	mařinka vonná	
350	„	květ lipový	
350	„	květ petrklíče (Primulae)	
158	„	kořen osladiče	
140	„	kořen kozlíkový	
70	„	květ heřmánku čes.	
35	„	hřebíček	
175	„	kůra citronová	
44	„	muškátový květ	
ad II.	{	80 „ květ divizny	{ vař v 28 ltr vody se 4½ kg cukru
		140 „ sv. jánský chléb	
		210 „ sladké dřevo	

maceruj ve 42 ltr čistého líhu 80°
14–21 dní, slej, kořen vylisuj a spoj s odvarem vody
a cukru ad II.

59

Obr. 1. Reprodukce části strany 59 z citace¹⁰, foto archiv autora (PD)

* Autoři upozorňují na nedorozumění aspekt českého názvosloví, který je zvláště vidět na příkladu přírodních látek, pojmenovaných podle cizích botanických názvů. České chemické názvosloví zatím systematicky nevyřešilo, kdy např. „c“ se mění na „k“ a kdy nikoli. V článku jsou použity známé termíny v počeštěné verzi, méně užívané ve verzi mezinárodní.

v kombinaci s chutí sladkou dokumentuje Štaffl¹⁰ mnoha recepturami, m. j. i recepturou tuze zajímavou (obr. 1). Přehledných článků je zatím poskrovnu¹¹, neb téma je velmi obtížné pro svoji rozmanitost jak chemickou, tak taxonomickou, proto byl užitečným zdrojem informací pro tento článek i Merck Index¹² a moderní kompendium o ochucovadlech¹³. Skromná je i legislativa, z hlediska potravinářské legislativy mohou být určité sloučeniny s hořkou chutí součástí přídatných látek zvýrazňujících chuť a vůni^{14,15}.

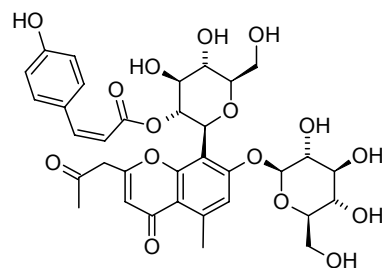
Vzhledem ke složitosti vnímání hořké chuti jsou i úvahy o vztahu mezi strukturou a aktivitou zatím skromné a podle současných znalostí autorů patrně takové ještě delší dobu budou. Některé teorie hodnotí hořký vjem jako vlastnost lidí, vyvinutou původně k rozeznání jedovatých látek^{16,17}, neboť některé toxické alkaloidy či glykosidy (např. kardenolidy, bufadienolidy) jsou látkami hořkými. Hořčiny jsou tvořeny heterogenní skupinou sloučenin vyskytujících se často ve formě glykosidů; u některých dokonce není ani chemická struktura známa, proto se jejich koncentrace stanovuje pomocí čísla hořkosti, tj. takovou nejnižší koncentrací výluhu drogy, která ještě vyvolává hořkou chuť. Tak např. 1 gram látky rozpuštěný ve 20 000 ml vody poskytne hořký roztok s hořkostí vyčíslenou hodnotou 20 000. Extrakt kořenu hořce¹⁸ má tuto hodnotu 58 000 000. Číslo hořkosti je základní lékopisnou charakteristikou pro hořčinné drogy¹⁹.

2. Tradiční potravinářské přísady silně hořké chuti

Jakkoliv při třídění látek na hořké a silně hořké podle tohoto principu hodnotíme spíše samu drogu, která je použita v potravinářství či k výrobě léčivých přípravků a léčiv, podržíme se ho, neboť je pro tyto oblasti lidské činnosti důležité.

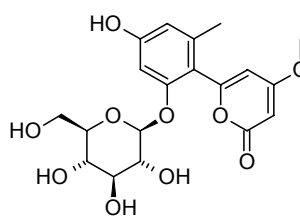
Štaffl¹⁰ uvádí jako základní „nejsilnější hořké“ přísady, používané v lékařnictví: aloe (*Aloe lucida*), chiretta (*Herba chirettae*), pelyněk, který dělí na *Herba absinthii* (pelyněk pravý), *Herba absinthii pontici* (nevhodně označená nať pelyňku pontského) a *Herba genepi*. Zjistit dnes, co je to *herba genepi* (*Genepikraut*, *Genepi des Alpes*), je obtížné. Je možné, že *herba genepi* je nať *Artemisia glacialis* L., *Asteraceae*, často bývá tato droga používána jako falšování nebo spíše náhražka jiné rostliny označené jako *Herba Ivae moschatae* (synonymem *Herba achilleae moschatae*, *Achillea moschata* Wulfen, která se taky označuje jako *Herba genippe veri*), a kvasiové, též quassiové dřevo (*Lignum quassiae*).

Aloe, rod mnoha druhů (*Aloe barbadensis* Mill., *A. sucotrina* Lam. (syn. *A. socotrina* DC.), *A. chinensis* Bak. (resp. správně *A. vera* (L.) Burm. F.), *Asphodelaceae*), je známá pronikavou hořkostí některých z nich. Hořkost způsobují anthrony a chromony v nich obsažené, většinou ve formě *O*- a *C*-glukosidů (pro jednoduchost a paralelu používáme přežitý termín „*C*-glykosid“, když obecně jde o glykosylderivát, či v tomto případě „*S*-chromenyl-*D*-glucitol“).

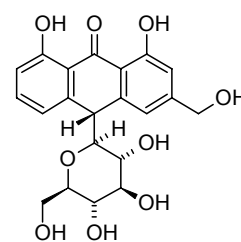


aloeresin C

Tak např. hořký aloeresin C byl izolován z aloe kapské (*Aloe ferox* Mill.).



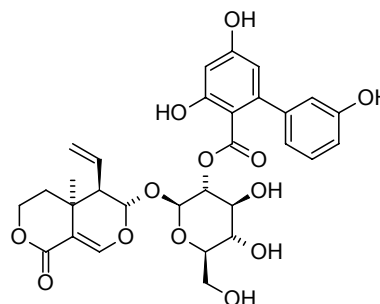
aloenin



barbaloin

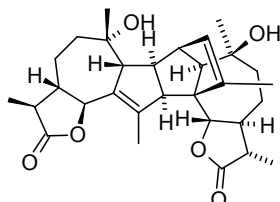
Aloenin (aloenin A, aloekarbonasid), je hořkým principem drogy z aloe stromovité (*Aloe arborescens* Mill.) a barbaloin (diastereoisomerní směs aloinu A a B) z jiných druhů aloe (např. Barbados aloe). Tyto hořčiny jsou i účinnými projímadly, kteroužto vlastností se může chlubit většina zástupců rodu aloe. Je zajímavé, že se projímavý účinek hořkých likérů jevil jako žádoucí¹⁰.

Chiretta, chirayta (*Herba chirettae*), je droga získávaná z byliny rostoucí v Indii a Japonsku (*Swertia chirata* (Wall.) C. B. Clarke, *Ophelia chirata* Griesb., *Gentianaceae*), která obsahuje amarogencin, jednu z nejvíce hořkých sloučenin, 10krát více hořkou než brucin. Dále pak hořké principy²⁰ chiratin ($C_{26}H_{48}O_{15}$), což jsou údajně dvě sloučeniny a ofelovou kyselinu ($C_{13}H_{20}O_{10}$).



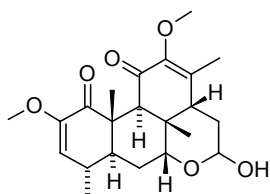
amarogencin

Pelyněk pravý, *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), je znám svojí hořkostí, která je způsobena hořkým dime-
rickým sekviterpenovým laktonem absinthinem (absinthiin, absynthin) a podobnými látkami a jejich
glykosidy. Obsahuje také známý α -thujon, který je pova-
žován za určitý typ halucinogenu. Je též známo, že navo-
zuje křeče a při delším používání vyvolává psychické
poškození.

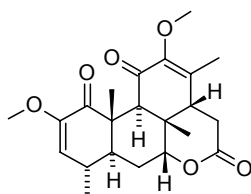


absinthin

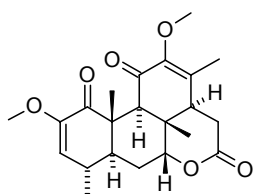
Kvasiové dřevo, pocházející z kmene a větví ja-
majského stromu *PicraSna excelsa* Lindl. (*Simaroubaeae*),
též známém jako *Picrasma excelsa* Swartz (Planchon)
a stromu hořkoň *Quassia amara* L., *Simaroubaceae*, zná-
mém pod obchodním jménem Surinam quassia jsou zdro-
jem amaroudů, jako kvasin, pikrasmin (isokvasin) a neo-
kvasin, používané jako hořčiny²¹, jde o triterpenové negly-
kosidické sloučeniny, farmakologicky disponující také
insekticidní a zčásti amoebocidní aktivitou. Číslo hořkosti
dřeva je již samo vysoké, 40 000–50 000.



neokvasin

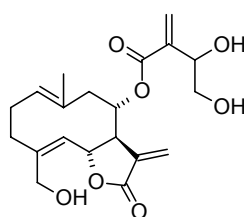


kvasin

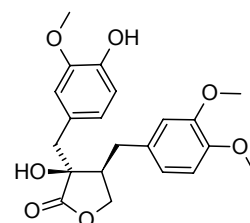


pikrasmin (isokvasin)

Druhou kategorií hořkosti podle Štaffla jsou přísady
„silně hořké“. Patří sem např. čubet, nať benediktu lékař-
ského (*Cnicus benedictus* L., *Herba cardui benedicti*, *As-
teraceae*) obsahuje hořké látky charakteru seskviterpeno-
vých laktonů. Hlavní hořčinou je seskviterpenový lakton,
germakranolid knicin (cynisin, centaurin). V semenech se
vyskytují lignanové glykosidy, jako trachelogenin, které
přispívají k hořké chuti^{22,23}.

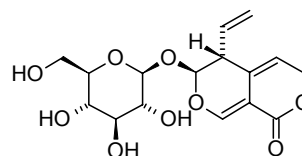


knicin



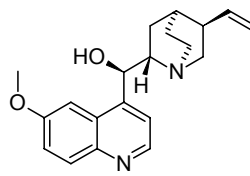
trachelogenin

Další silně hořkou drogou je kořen hořce
(především *Gentiana lutea* L., *Gentianaceae*, *Radix genti-
anae*), který obsahuje iridoidní hořčiny, které zvyšují pro-
dukcí trávicích šťáv a pozitivně působí na zažívání. Název
získal podle ilyrského krále Gentia, který jím léčil mor.
Někdy používaný výraz *Radix gentianae rubrae* je starý
výraz pro kořen žlutého hořce, pro který se dnes používá
jen výraz *Radix gentianae* (někdy *R. g. luteae*). Je to vý-
raz historický a lze ho chápat tak, že *R. g. rubrae* je určen
pro kořeny, které byly fermentovány a určeny především
pro likérnictví, kdežto konvenčním způsobem usušené
kořeny nebyly načervenalé a byly určeny jako farmaceu-
tická surovina – lišily se však vůní a také chutí, zejména
doznívající (aftertaste). Hlavními hořkými substancemi
hořce jsou amarogencin (viz chiretta) a genciopikrosid,
který má číslo hořkosti 12 000.

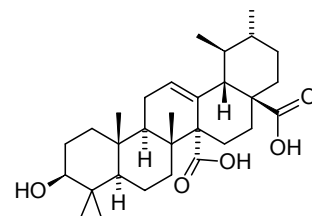


genciopikrosid

Cortex chinae je sušená kůra z chinovníku (či chini-
novníku), např. chinovníku červeného (*Cinchona succi-
rubra* Pav.) obsahující chinolinový alkaloid chinin použi-
vaný k léčení malárie a při výrobě limonády. Přímým pů-
sobením na centrální nervovou soustavu má chinin antipy-
retické, analgetické, lokálně anestetické a sympatolytické
účinky, bývala to hlavní součást tzv. Harburnových práš-
ků. Z kůry chinovníku červeného byla izolována i velmi
hořká kyselina chinová, hořčina triterpenového typu, která
se vyskytuje ve formě glykosidu chinovinu.

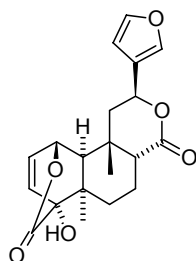


chinin

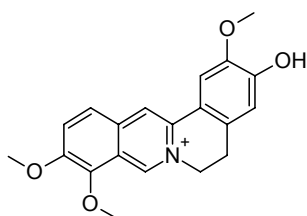


kyselina chinová

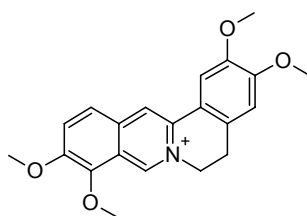
Kolombový kořen (*Radix colombo*), *Calumba*, kořen liany *Jateorhiza palmata* Miers, (*Menispermaceae*), obsahuje jako hlavní hořký princip kolumbin, jehož hořkost je udávána číslem 60 000. Dále obsahuje benzylochinolinové (protoberberinové) alkaloidy jateorhizin (jatrorrhizin) a palmatin, které jistě hořké chuti neuberou.



kolumbin

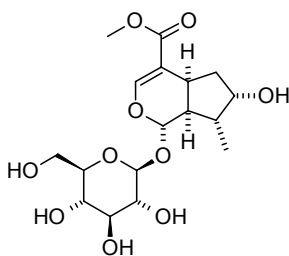


jateorhizin

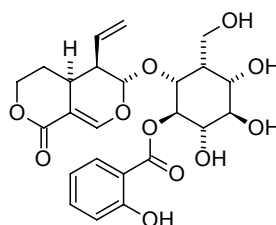


palmatin

Významnou silně hořkou surovinou je tzv. hořký jetel, vachta trojlistá *Menyanthes trifoliata* L. (*Menyanthaceae*), kde je hlavním hořkým principem loganin (menyanthin).



loganin



centapikrin

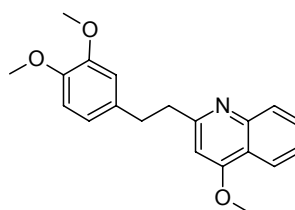
Důležitou přísadou při výrobě likérů je i zeměžluč lékařská, *Centaurium erythraea* Rafn. (*Gentianaceae*), která obsahuje hořký sekoiridoidní glukosid centapikrin. Zeměžluč patří mezi nejstarší léčivé rostliny světa; její starý název byl Fel terrae – žluč země, jak ji označoval Plinius. Dioskorides ji podle bájného kentaura označoval jako kentaurion mikron. Číslo hořkosti květů je 12 000 a nati 2000.

Je nutné konstatovat, že v současné době jsou tyto tzv. „čisté“ hořčiny iridoidního typu (hořec, vachta, zeměžluč) pokládány za nejvhodnější z hlediska jak farma-

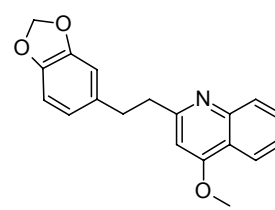
ceutického, tak potravinářského použití.

3. Tradiční potravinářské přísady hořké chuti

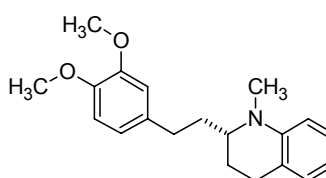
Třetí Štafflovou kategorií jsou přísady „hořké“. Uvádí pravou angosturou z kůry stromu *Cusparia febrifuga* (DC), *Rutaceae*²⁴, která obsahuje jako hlavní hořký princip alkaloidy galipin, kusparin, kusparein, galipinin a příbuzné sloučeniny. Jiné prameny uvádí, že angostura pochází z *Galipea officinalis* Hancock (*Rutaceae*); tato substance má dokonce registrační číslo CAS 977000-22-8. Situace je zde z botanického hlediska složitější: *Cusparia febrifuga* Baill. je synonymum pro všeobecně užívaný název *Galipea officinalis* Hancock; pod tímto označením tuto rostlinu běžně najdeme stejně jako drogu z ní. Synonyma pro tuto problémovou rostlinu jsou: *Angostura cusparia* ROEM et SCHULT., *Angostura trifoliata* (WILLD.) ELIAS, *A. vera*, *Bonplandia angostura* RICH., *B. trifoliata* WILLD., *Cusparia angostura* RICH., *C. febrifuga* HUMB., *C. officinalis* (WILLD.) ENGL., *C. trifoliata* ENGLER, *Galipea cusparia* ST. HIL., *Galipea febrifuga* BAILL.



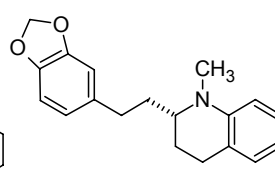
galipin



kusparin

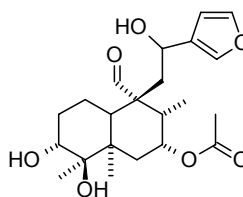


kusparein

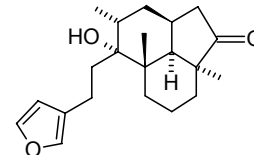


galipinin

Kaskarilová kůra (*Cortex cascarillae*) získávaná ze stromu *Croton eluteria* Benn. (*Euphorbiaceae*), obsahuje hořkou krystalickou látku kaskarillin.

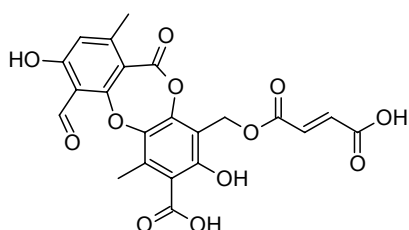


kaskarillin

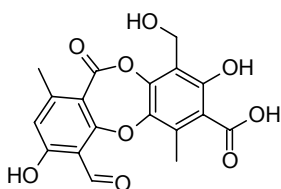


marrubiin

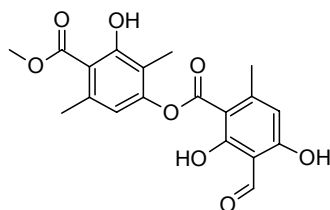
Ožanka čpavá, *Teucrium scordium* L., stejně jako jablečník obecný, *Marrubium vulgare* L. (oba taxony z čeledi *Lamiaceae*), jsou hořké díky obsahu diterpenu marrubiinu. Marubiin je uváděn v prostředcích proti chrápání. Puklérka islandská (mech islandský), *Cetraria islandica* (L.) Acharius ssp. *antarctica* Kärnef (*Parmeliaceae*), obsahuje hořké lišejníkové kyseliny, např. depsidy kyseliny fumarprotocetrarovou a protocetrarovou.



fumarprotocetrarová kyselina



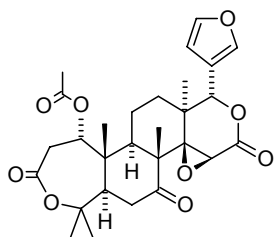
protocetrarová kyselina



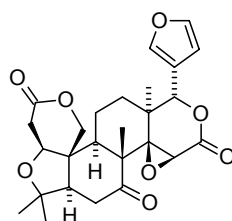
atranorin

Z řady lišejníků byla izolována další z lišejníkových kyselin, hořký atranorin.

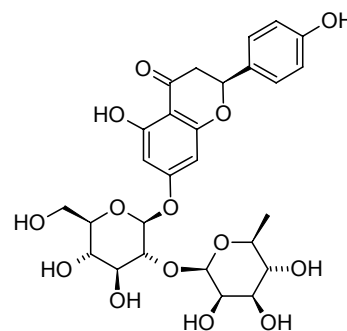
Podle Štaffla je čtvrtou, nejslabší kategorií hořkých přísad typ „aromatický a mírně hořký“. Sem zařazuje např. kůru plodů zralých i nezralých citrusů, která obsahuje hořké látky. Některé z nich jsou používány jako chuť zesilující a upravující sloučeniny²⁵, jako např. nomilin, limonin (citrolimonin, diktamnolakton, evodin, obakulakton), naringin ((2*S*)-naringin, naringenin-7-rhamnoglukosid, naringosid) a jejich kombinace, většinou na koncentrační úrovni počátku chuťové detekce. Podstatu hořkosti plodů a květů grapefruitů (*Citrus paradisi* Macf., *Rutaceae*) tvoří naringin (aurantiin).



nomilin

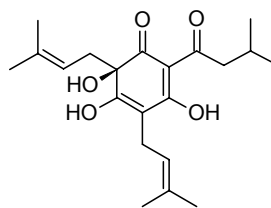


limonin

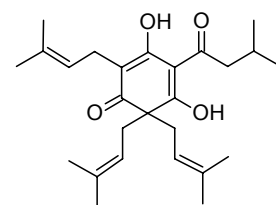


naringin

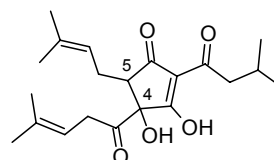
Chmel otáčivý, *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*) obsahuje α -hořké kyseliny, skládající se převážně z humulonů, kohumulonů a adhumulonů, β -hořké kyseliny (lupulon, kolupulon, adlupulon), nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputrinony), tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové kyseliny)^{26–28} a další prenylderiváty floroglucinolu. Nejvíce je v samičích květech obsažen humulon (2–6 %) a lupulon (8–12 %), vzájemný poměr hořčin a jejich složení závisí na odrůdě chmelu. Nejdůležitější z hlediska chuťových účinnů a bakteriostatických vlastností jsou tzv. isosloučeniny vznikající z hořkých kyselin během vaření piva. Isohumulony však také moduluji hladiny krevních lipidů cestou aktivace PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Isohumulon se vyskytuje ve formě *trans* (4*S*,5*S*) a *cis* (4*R*,5*S*); nejčastěji je však pod CAS RN 25522-96-7 uváděn isohumulon bez rozlišení chiralit. Je nutno připomenout, že škála odvozených derivátů vyskytujících se v pivu, ať to jsou sekundární metabolity, nebo produkty zpracování, je široká.



humulon



lupulon

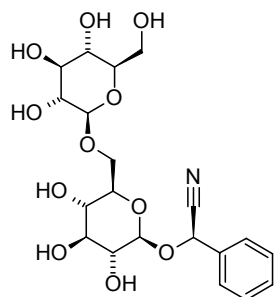


isohumulon

Některé drogy, které jsou uvedeny na Štafflovu seznamu hořkých ingrediencí, řepíček mochnovitý *Agrimonia agrimonoides* L., *Rosaceae*, vítod hořký krátkokřídý *Polygala amara* L. subvar. *brachyptera* Chodat, kořen reveně (dlanitě: *Radix rhei*; bulharské: *Radix (rhei) rhapontici*, *Polygonaceae*), květ a nať řebříčku obecného (*Herba et flores millefolii*, *Achillea millefolium* L., *Asteraceae*) [podle Štaffla cypřiš polní (*Herba Ivae*)] ořechové slupky (*Pericarpium juglandis*) zůstaly zatím stran hořkých komponent chemicky nepopsány. Jiné, jako např. „choroš modřínový *Agaricus albus*“, jsou soudobé botanické nomenklatury neznámé.

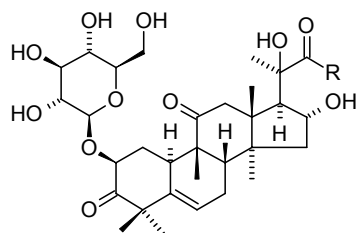
4. Ostatní známé hořké sloučeniny

Známa sloučenina z hořkých mandlí (*Amygdalus communis* R.J.Roemer var. *amara*, syn. *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb. var. *amara* (DC.) Buchheim, *Amygdalaceae*) je amygdalin, gentiobiosid benzaldehydkyanhydrinu.



amygdalin

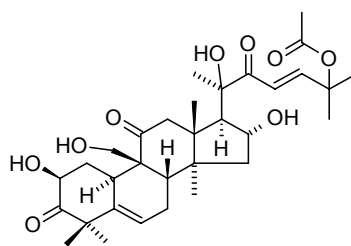
Hořké glukosidy arvenin I a II byly izolovány²⁹ z drchničky rolní *Anagallis arvensis* L. (*Primulaceae*); později byly identifikovány další hořké glukosidy³⁰.



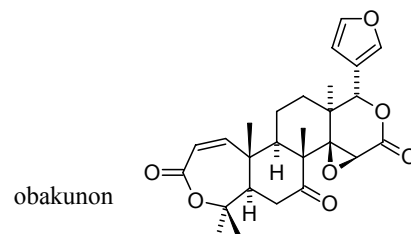
arvenin I, R = $-\text{CH}=\text{CHCMe}_2\text{OAc}$

arvenin II R = $-(\text{CH}_2)_2\text{CMe}_2\text{OAc}$

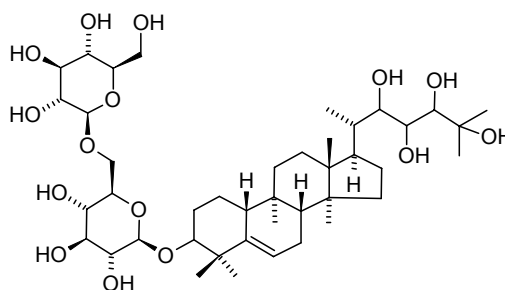
Skupina příbuzných hořkých kukurbitacinů byla izolována z dýní (čeleď *Cucurbitaceae*). Podobné příbuzné momordikosidy se vyskytují v hořké okurce *Momordica charantia* L. (*Cucurbitaceae*). Obakunon patří k hořkým limonoidům citrusů a byl nalezen i v korkovníku amurském, *Phellodendron amurense* Rupr. (*Rutaceae*), který je používán k léčení průjmů a zánětů (v tomto případě však spíše díky obsahu protoberberinových alkaloidů, zejména berberinu).



kukurbitacin A

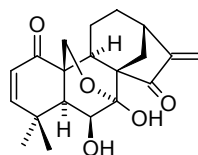


obakunon

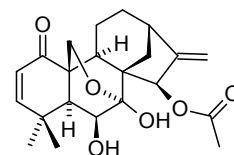


momordikosid A

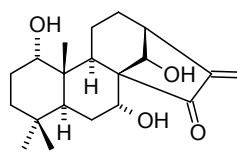
Hořké diterpeny, rabdosianon I a II byly izolovány³¹ z japonské rostliny *Isodon japonicus* Hara (syn. *Plectranthus japonicus* Koidz., *Lamiaceae*). Z příbuzného *I. kameba* Okuyama byl izolován kamebanin³². Hořký je i isodomedin, izolovaný z *I. shikokianus*. Na příkladu těchto entkauranů byl vysloven strukturně-molekulární předpoklad vjemu hořké chuti. Ke studii byly použity skeletálně modifikované diterpeny abietan, kauran, podokarpan a labdan. Dále byly zahrnuty sloučeniny jako enmein, cesalpin, a



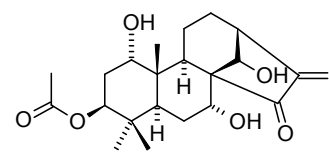
rabdosianon I



rabdosianon II

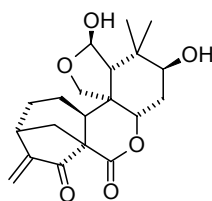


kamebanin

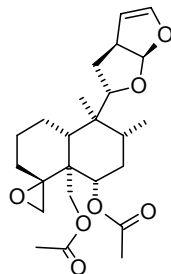


isodomedin

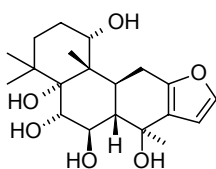
marrubiin, chaparrin, klerodin a kolumbin. Má-li být sloučenina této skupiny vnímána jako hořká, musí obsahovat alespoň jednu „jednotku“, která se skládá z donoru a akceptoru protonu, přičemž tyto dvě skupiny musí být od sebe vzdáleny 0,15 nm, a umožňovat tak vznik vodíkové vazby³³.



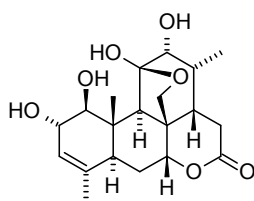
enmein



klerodin

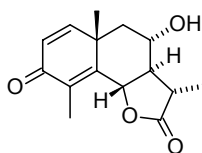


δ-cesalpin

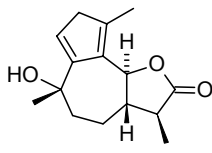


chaparrin

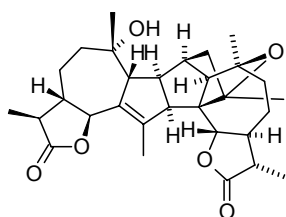
Z nerozvitých květenství rostlin pelyňků, *Artemisia* sp., zvláště *Artemisia maritima* L. (*Asteraceae*) byly izolovány hořké terpeny artemisin, artabsin a anabsinthin.



artemisin

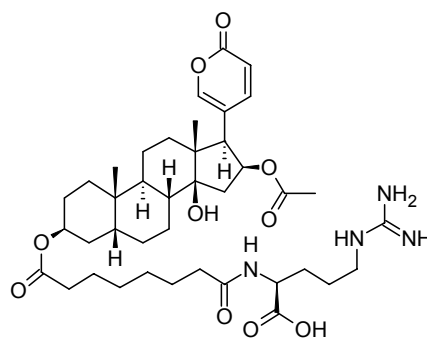


artabsin

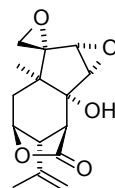


anabsinthin

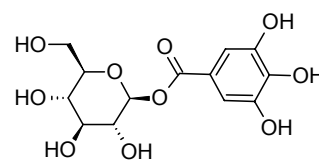
Hořký je i bufotoxin, hlavní toxin jedu běžné evropské ropuchy *Bufo vulgaris*. I další bufadienolidy (např. scillaren A v mořské cibuli, *Urginea maritima* (L.) Baker, *Hyacinthaceae*) jsou také hořké.



bufotoxin

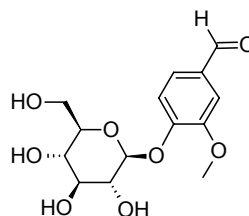


koriamyrtin

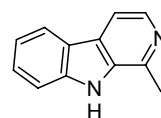


β-glukogallin

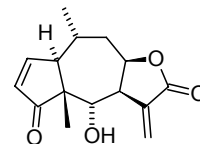
Koriamyrtin je hlavní toxický a hořký princip listů a plodů *Coraria myrtifolia* L., *Coriariaceae*. β-Glukogallin je hořká látka (glukotannoid) z rebarbory lékařské, *Rheum officinale* Baill., *Polygonaceae*. Podobným malým glykosidem je i glukovanilin hořká látka ze zelených tobolek vanilky *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, *Orchidaceae*. Hořký je i alkaloid harman z kůry kubánského mahagonu *Sickingia rubra* (Mart.) K. Schum. (syn. *Arariba rubra* Mart.), z čeledi *Rubiaceae*.



glukovanilin



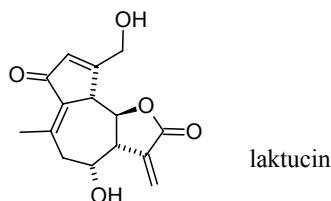
harman



helenalin

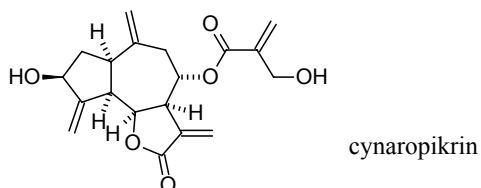
Hořkost salátu (locika setá, *Lactuca sativa* L., *Asteraceae*), ale i příbuzné lociky jedovaté, *Lactuca virosa* L., a listové čekanky, *Cichorium intybus* L., *Cichoriaceae*)

způsobuje azulenový derivát laktucin, též uváděný jako analgetikum a sedativum³⁴.

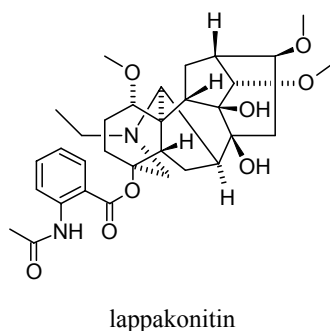
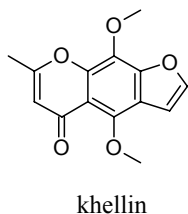


Hořký helenalin, pseudogujanolid, seskviterpenový lakton byl izolován ze zápleváku podzimního, *Helenium autumnale* L., a hořkého *H. amarum* (Raf.) H. Roch, i malohlavého *H. microcephalum* DC., *Asteraceae*.

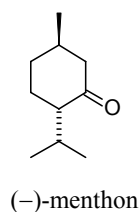
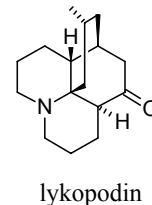
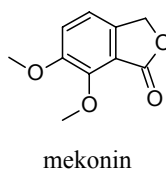
V čeledi *Asteraceae* jsou hojně zastoupeny seskviterpenové laktony. Cynaropikrin (seskviterpen guajanolidového typu) je hlavní obsahovou složkou hořčinné frakce listů jak artyčoků (artyčok zeleninový *Cynara scolymus* L., artyčok kardový *C. cardunculus* L.), tak v současnosti významné rostliny parchy saflorovitě (*Leuzea carthamoides* (Willd.) Iljin. Listy obou rostlin našly použití ve formě čajoviny a extraktů jako roborans, tonikum a digestivum³⁵. V případě parchy saflorovitě je tento zdroj o to zajímavější, že obsahuje frakci ekdysteroidů (především 20-hydroxyekdyson).



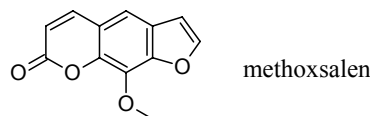
Hořký khellin (visammin) je ze semen morače zákrovnatého, *Ammi visnaga* Lam., *Apiaceae* a je jednou z aktivních složek egyptské tradiční drogy známé jako „khella“. Lappakonitin je hořká substance z oddenků a listů několika různých omějů *Aconitum* sp. (*Helleboraceae*). Jak to již u alkaloidů, natož z oměje, bývá, je značně jedovatý. V omějích se vyskytuje několik dalších hořkých diterpenových alkaloidů podobné struktury, jako lykoktonin, roylin aj., které se používají jako analgetika při neuralgiích a artritidách.



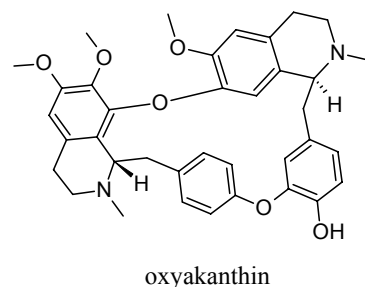
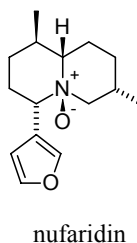
Z opia byl izolován ostře hořký mekonin, jenž se vyskytuje také ve vodilce kanadské, *Hydrastis canadensis* L., *Hydrastidaceae*. Hořký lykopodin se vyskytuje v plavuníku zploštělém *Diphasiastrum complanatum* (L.) Holub (syn. *Lycopodium complanatum* L.), či plavuni vidlače, *Lycopodium clavatum* L., *Lycopodiaceae*, tedy v rostlinách vyznačujících se antipyretickým účinkem. Hořký olejovitý (–)-menthon je nejběžnějším optickým isomerem menthonu, který se nalézá v řadě vonných olejů rostlin především z čeledi *Lamiaceae* (máta peprná, *Mentha x piperita* L., aj. taxony).



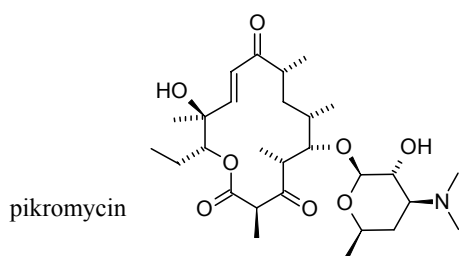
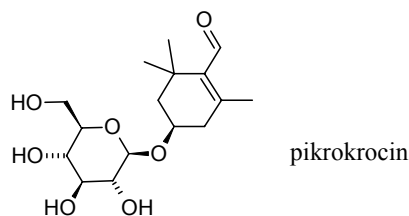
Methoxsalen je látka z řady rostlin *Fabaceae*, *Apiaceae* a *Rutaceae*, která se projevuje po odeznění hořké chuti pocitem brnění. Je to o to zajímavější, že je téměř nerozpustná ve vodě.



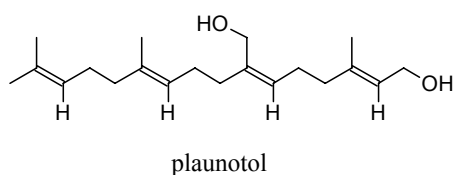
V oddencích stulíku žlutého (*Nuphar luteum* L., *Nymphaeaceae*) se nachází alkaloid nufaridin, který je jako volná báze bez chuti, leč ve formě soli je hořký. Alkaloid oxykanthin (vinetin) z kořenů dřeváku obecného *Berberis vulgaris* L., *Berberidaceae* je jako volná báze sice hořký, ale opět téměř nerozpustný ve vodě.



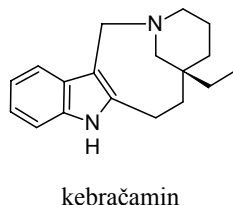
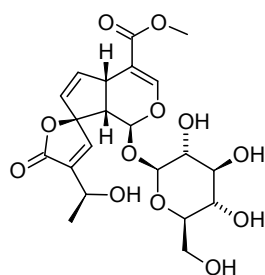
Hořký glykosid pikrokrocin je izolován z blizen šafránu setého, *Crocus sativus* L. *Iridaceae*. Velmi hořký pikromycin (pikromycin, albomycetin, amaromycin) je izolován jako prvé makrolidové antibiotikum z aktinomycet, je zařazován také do skupiny polyketidů. Je zde syntetizován skupinou enzymů polyketidových synthas.



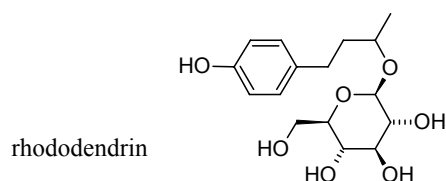
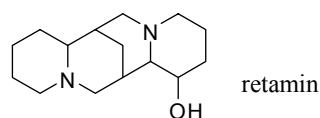
Acyklický diterpenový alkohol plaunotol izolovaný z thajské léčivé rostliny *Croton sublyratus* Kurz, *Euphorbiaceae*, má kromě hořké chuti protivředovou účinnost.



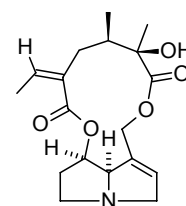
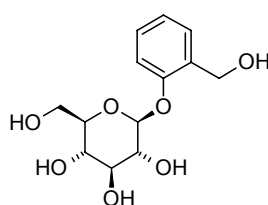
Plumierid (agoniadin) je hořký glykosid nacházející se v kůře *Plumeria lancifolia* Muell.-Arg., *Apocynaceae* a několika dalších plumerií. Hořký alkaloid kebračamin (kamassin) se vyskytuje v kůře štítosemenky kebračo *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht., *Apocynaceae*.



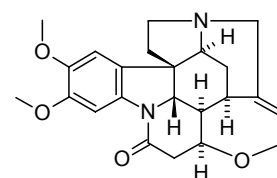
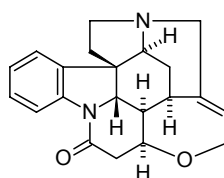
Retamin z kůry a mladých větvíček kručinky *Genista sphaerocarpa* Lam., *Fabaceae*, je opět jedním ve vodě nerozpustným alkaloidem, který je hořký. Hořký glykosid rhododendrin (betulosid) je izolován z listů řady pěnišníků, *Rhododendron* sp., *Ericaceae*.



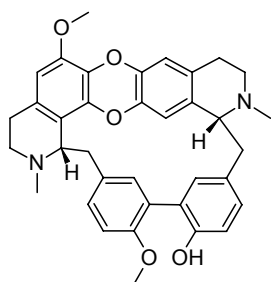
Z kůry topolu (*Populus* sp., *Cortex populi*) a vrby (*Salix* sp., *Cortex salicis*), *Salicaceae*, je vodou extrahován hořký salicin, který byl používán jako analgetikum, antipyretikum a antirheumatikum a který byl vzorem pro vývoj řady velmi účinných derivátů kyseliny salicylové. Senecionin (aurein) je dalším ve vodě nerozpustným hořkým alkaloidem. Tento hepatotoxický pyrrolizidinový alkaloid se vyskytuje v starčku obecném *Senecio vulgaris* L., *Asteraceae*.



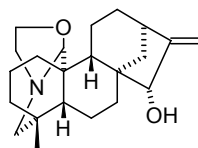
Silně hořký alkaloid strychnin má číslo hořkosti 700 000 a je velmi jedovatý; LD₅₀ u krys je méně než 1 mg kg⁻¹. Vyskytuje se v kulčibě dávivé, *Strychnos nuxvomica* L., *Loganiaceae*, spolu s velmi hořkým brucinem.



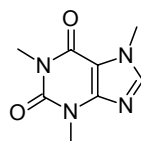
Tiliakorin je alkaloid z kůry *Tiliacora acuminata* Miers, *Menispermaceae*. Hořký alkaloid veatchin se vyskytuje v *Garrya veatchii* Kellogg, *Garryaceae*.



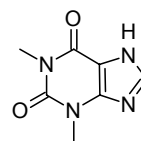
tiliakorin



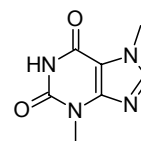
veatchin



kofein

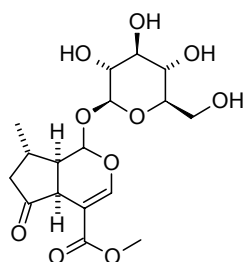


teofylin

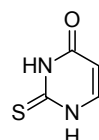


teobromin

Hořký glykosid verbenalin (kornin) byl izolován ze sporýše lékařského *Verbena officinalis* L., *Verbenaceae* či dřínu květnatého *Cornus florida* L., *Cornaceae*.

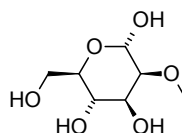


verbenalin

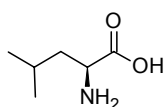


2-thiouracil

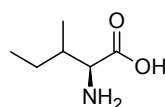
Methyl- α -D-mannopyranosid je např. sacharidová část glykosidu konkanavalinu A, která vyniká s hořkosladkou chutí. Chuťová adaptace na sacharosu vede k zdůraznění pocitu jeho hořkosti a naopak adaptace na chinin redukuje hořkost methyl- α -D-mannopyranosidu³⁶.

methyl- α -D-mannopyranosid

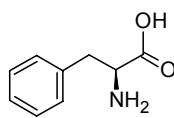
Jsou známy také typicky hořké aminokyseliny: L-leucin, L-isoleucin, L-fenylalanin, L-tyrosin a L-tryptofan. Dále je znám hořký galegin z nati a také ze semen jestřabiny lékařské *Galega officinalis* L., *Fabaceae*, hořký vitamin B₂ (riboflavin) a značně hořký kofein z kávy (*Coffea arabica* L. aj., *Rubiaceae*), teobromin z kaka (kakaovník pravý, *Theobroma cacao* L., *Sterculiaceae*) a teofylin z listů čajovníku čínského *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (syn. *Thea sinensis* L.), *Theaceae*.



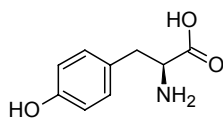
L-leucin



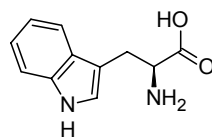
L-isoleucin



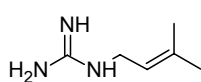
L-fenylalanin



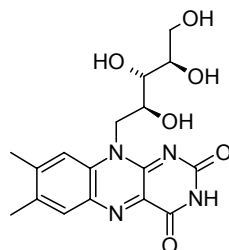
L-tyrosin



L-tryptofan

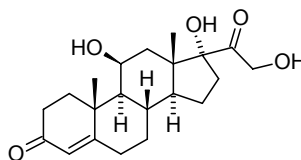


galegin

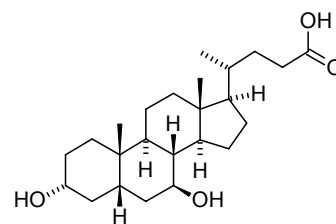


riboflavin

Hořké látky se vyskytují i v říši živočišné, jako např. známý hydrokortizon, hlavní glukokortikoid produkovaný kůrou nadledvinek. Hořké jsou i některé další steroidy, jako např. žlučová kyselina ursodiol, vyskytující se jako konjugát s taurinem ve žluči medvědů (*Ursus*).

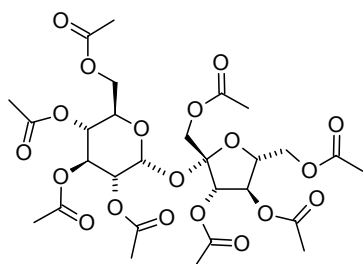


hydrokortizon



ursodiol

Přestože je tento článek o hořkých látkách z přírody, musíme se zmínit o oktaacetyl-sacharose, zvané též amerin či SOA, která slouží m.j. k náhradě chininu v některých limonádách. Je to látka, která je údajně naprosto netoxická (samozřejmě v používaných koncentracích a množstvích), která je však tak hořká, že hořko v ústech vyvolá již jen otevření prachovnice, ve které je uchována. Její hořkost je tak silná, že se v Rusku používala k denaturování alkoholu



amerin

v koncentraci 0,001 % a to hovoří za mnoho.

5. Trocha teorie o chuti hořké

Jak píší čeští pivovarníci³⁷, vjem hořké chuti v ústech, jak je všeobecně známo, vyvolává bez ohledu na typ hořkosti zvýšenou sekreci trávicích šťáv a tím i chuť k přijímání potravy. Konkrétně např. sekrece příušních slinných žláz, které jsou největšími slinnými žlázami, je reflexně vyvolávána podněty z oblasti zadní třetiny jazyka, tedy z oblasti nejcitlivější pro vnímání hořkosti. Tyto žlázy mají na rozdíl od ostatních slinných žláz výrazně seriózní funkci (produkce enzymu) a současně obohacují potravu vodou. Výrazně se uplatňují zvláště při požívání suché potravy. S tím patrně souvisí i jisté podněty, vedoucí ke konzumaci tekutiny. Reflexně na základě podnětů vycházejících z chuťových receptorů lze vyvolat rovněž sekreci žaludečních šťáv. Silná intenzita hořkosti piva českého typu podporuje proces trávení a je zdrojem podnětu pobízejících ke konzumaci tuhé potravy i tekutin. Tento fyziologický mechanismus je podporován mírně drsným, až drsným charakterem hořkosti. Drsnější hořkost déle ulpívá v ústech a tím i déle dráždí chuťové receptory. Naproti tomu vjem velmi jemné, až jemné hořkosti daleko rychleji vymizí a má tudíž daleko nižší fyziologickou účinnost.

S hořkou chutí je to zajímavé. Například mějme chuťový receptor TAS2R16, kterým zjišťujeme hořkou chuť kyanogenních glykosidů. Gen pro tento receptor se vyskytuje ve dvou variantách, jež se vzájemně liší v citlivosti. Obyvatelé subsaharské Afriky mají v drtivé většině (85 %) necitlivou variantu genu. Naopak, zbytek světa je z 90 % vybaven citlivou variantou.

Vysvětlení je, jak už to autoři podobných studií prezentují, zcela prosté. Necitlivá varianta genu je výhodná v oblastech zamořených malárií. Její nositelé konzumují větší množství rostlin s obsahem kyanogenních glykosidů a ty je pak chrání před malárií. Zároveň se tak sice trochu otravují, ale to je daň, kterou platí za ochranu před parazitickými prvky a nebezpečnou chorobou. V době, kdy se člověk druhu *Homo sapiens* vydal mimo Afriku, přišla vhod citlivá varianta. V chladnějších oblastech už malárie nepředstavovala takovou hrozbu a lidem se začalo vyplácet, když se rostlinám obsahujícím kyanogenní glykosidy vyhnuli³⁸.

Na úrovni vědeckých výpočetních studií jde výzkum

ještě hlouběji. Studium interakcí ligand-receptor u receptoru hořké chuti byly získány zajímavé výsledky³⁹. Fenylylthiokarbamid je intenzivně hořký, ale jen pro některé lidi; pro jiné je bez jakékoliv chuti. Bylo navrženo, že fenylylthiokarbamid vyvolává pocit hořkosti na úrovni interakce s lidským receptorem napojeným na G protein (hTAS2R38) kódovaný genem PTC. Příznak necitlivosti k chuti fenylylthiokarbamidu byl přiřazen k polymorfii třech jednotlivých nukleosidů v genu PTC. S použitím krystalové struktury hovězího rhodopsinu jako šablony byla generována 3D struktura receptorů hořké chuti hTAS2R38 a hTAS2R16. Tak bylo možno zmapovat u receptorů aminokyseliny ovlivněné genetickou polymorfií a navrhnout molekulární funkci pro dva z nich, které vysvětlovaly výskyt příznaku necitlivosti k hořké chuti.

6. Závěr

Přehled přírodních látek hořké chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiversity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, např. potravinářských a farmaceutických chemiků při hledání nových možností využití takových látek v praxi. Hledání nových hořčinných látek s čistě hořkou chutí použitelných nejen v humánní, ale i zemědělské praxi (živočišné výrobě, kde se mohou uplatnit jako určitý tonizující prostředek) je však jen jednou stránkou problému hořkosti: druhou je hledání postupů (a látek) – modifikátorů vnímání⁴⁰, které mohou tento vjem naopak tlumit. Dokud však nebudou dobře známy molekulární mechanismy principů vnímání hořkosti, budeme jen na začátku tohoto studia „tlumení hořké chuti“, tak jako v současnosti.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a grantu NAZV ČR č. 1G46085.

LITERATURA

- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2006).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 233 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 314 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Benešová E., Marková M., Lipovová P., Králová B.: Chem. Listy 99, 324 (2006).
- Harmatha J.: Chem. Listy 99, 622 (2006).
- Chandrashekar J., Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: Nature 444, 288 (2006).
- Štafl F.: *Likérnický receptář*, nákladem vlastním,

- Praha 1940.
11. Yamada Y.: New Food Ind. 44, 49 (2002); Chem. Abstr. 137, 309631 (2002).
 12. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
 13. Ziegler H. (ed.): *Flavourings*, 2. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
 14. Vyhláška č. 304/2004 Sb.
 15. Rouseff R. (ed.): *Bitterness In Foods And Beverages, (Developments in Food Science, 25)*. Elsevier, Amsterdam 1990.
 16. Moncrieff R.: Perfum Essent. Oil Rec. 42, 51 (1951).
 17. Pfaffmann C., Bartoshuk L. M., McBurney D. H.: *Handbook of Sensory Physiology*, Part 2, 75, (Beidler L. M., ed.), Springer, Berlin 1971.
 18. Samuelson G.: *Drugs of Natural Origin, A Textbook of Pharmacognosy*. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm 1992.
 19. *Český lékopis 2005*, str. 508, GRADA Publishing, Praha 2005.
 20. Remington J. P., Wood H. C. (ed.): *The Dispensatory of the United States of America, 1918*; <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/usdisp/> (staženo 31. 1. 2007).
 21. Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T., Tanamoto K.: Shokuhin Eiseigaku Zasshi 44, 328 (2003).
 22. Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastr R.: Phytochemistry 14, 2709 (1975).
 23. <http://www.florahealth.com/flora/home/Canada/HealthInformation/Encyclo-pedias/BlessedThistle.htm> (staženo 4. 2. 2007).
 24. http://en.wikipedia.org/wiki/Angostura_bitters (staženo 31. 7. 2007).
 25. Soukup R. J., Parliment T. H.: Fr. Demande FR 2529446 (1984), Chem. Abstr. 100, 137686 (1984).
 26. <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/sladarstvi.pdf> (staženo 31. 1. 2007).
 27. Von Hirsch H.: Ger. Offen. DE 2007023 (1971); Chem. Abstr. 75, 139418 (1971).
 28. Shimura M., Hasumi A., Minato T., Hosono M., Miura Y., Mizutani S., Kondo K., Oikawa S., Yoshida A.: Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 1736, 51 (2005).
 29. Yamada Y., Hagiwara K., Iguchi K., Suzuki S.: Tetrahedron Lett. 1977, 2099.
 30. Yamada Y., Hagiwara K., Iguchi K., Suzuki S., Hsu H.-Y.: Chem. Pharm. Bull. 26, 3107 (1978).
 31. Yamada Y., Sako N., Ando E., Yamada M., Kikuzaki H., Yamamoto T.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 524 (1999).
 32. Kubo I., Miura I., Kamikawa T., Isobe T., Kubota T.: Chem. Lett. 1977, 1289.
 33. Kubota T., Kubo I.: Nature 223, 97 (1969).
 34. Wesolowska A., Nikiforuk A., Michalska K., Kisiel W., Chojnacka-Wojcik E.: J. Ethnopharmacol. 107, 254 (2006).
 35. Opletal, L., Sovová, M., Dittrich, M., Solich, P., Dvořák, J., Krátký, F., Čerovský, J., Hofbauer, J.: Čes. Slov. Farm. 46, 247 (1997).
 36. McBurney D. H., Gent J. F.: Chem. Senses 3, 45 (1978).
 37. <http://www.prionord.cz/projects/colitiscrohn/product.asp?productid=224> (staženo 31. 1. 2007).
 38. <http://www.osel.cz/index.php?clanek=1377> (staženo 31. 1. 2007).
 39. Miguët L., Zhang Z. D., Grigorov M. G.: J. Receptors Signal Trans. 26, 611 (2006).
 40. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: Chem. Listy 101, v tisku (2007).

L. Opletal^a, J. Čopíková^b, M. Uher^c, O. Lapčík^d, J. Moravcová^d, and P. Drašar^d (^a Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, ^b Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^c Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, ^d Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague): **Naturally Occurring Bitter Compounds**

A brief survey of bitter compounds occurring in nature aims to show the importance of this group of renewable materials and to contribute to the knowledge of biodiversity of secondary metabolites which can be utilized, among others, in food and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of this group of mostly secondary metabolites are illustrated.

LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ VNÍMÁNÍ ORGANOLEPTICKÝCH VLASTNOSTÍ

JITKA MORAVCOVÁ^a, LUBOMÍR OPLETAL^b,
OLDŘICH LAPČÍK^a, JANA ČOPÍKOVÁ^c,
MICHAL UHER^d a PAVEL DRAŠAR^a

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta, UK v Praze, 500 05 Hradec Králové, ^c Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^d Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
pavel.drasar@vscht.cz

Došlo 18.8.07, přijato 27.9.07.

Klíčová slova: přírodní látka, ovlivnění chuti a vůně, potravní doplněk, obnovitelné zdroje, modifikátor chuti a vůně, definice modifikátoru, flavor modifier definition

Obsah

1. Úvod
2. Vnímání chuti, vůně, dotyku a barvy
3. Tradiční potravinářské přísady ovlivňující organoleptické vlastnosti
4. Ostatní známé modifikátory
5. Efekt synergismu
6. Závěr

1. Úvod

Organoleptický vjem je možno dodatečně modifikovat látkou, která mění vnímání některých vlastností ať již jednotlivě, nebo spolu s ovlivněním jiných vjemů. Tento článek je dalším z řady přehledů, ve kterých jsou popisovány přírodní látky a potravní doplňky^{1–8}, a je koncipován ve zmíněné řadě zejména jako učební pomůcka. Literatura zná několik přehledných prací na toto téma^{9–11}. Naše zákonodárství kodifikuje použití přídatných látek v rámci vyhlášky č. 304/2004 Sb.

V oblasti výroby a využití vjemových modifikátorů působí dvě organizace, International Organization of the Flavor Industry (IOFI) a International Fragrance Association (IFRA). Zatímco prvá se modifikátory ve svých materiálech zabývá, druhá nikoli, ačkoli jejich role v např. oblasti voňavkářství je zřejmá. Je možné, že používají jinou terminologii.

V souvislosti s ovlivňováním vnímání pocitů je nutno poznamenat, že zejména halucinogenní látky (často ve formě různých rostlinných částí nebo extraktů z nich připravených), někdy zařazované mezi „nekanonickou“ skupinu látek tzv. psychomimetik (látek navozujících stav srovnatelný s psychickou poruchou, zde konkrétně halucinogenním stavem) a řada dalších látek, dosud mezi nelegální omamné drogy nezařazovaných, významně mění vnímání (a to i v oblasti vnímání barev) způsobem, který je dokonce v určitých kruzích vyhledáván jako stimulující umělecký podnět [viz. např. absint (*Artemisia absinthium* L., *Asteraceae*), hašiš, marihuana (*Cannabis indica* Lam., *Canabaceae*), šalvěj divotvorná (*Salvia divinorum* Epling et Játiva, *Lamiaceae*)]. Těmito látkami se v tomto článku zabývat nebudeme a odkazujeme na relevantní zdroje¹².

2. Vnímání chuti, vůně, dotyku a barvy

Organoleptická vlastnost je vjem, který vnímáme u určitého produktu. Vjemy rozdělujeme na čtyři skupiny, chuť (sladké, slané, kyselé, hořké a umami)¹³, barvu, vůni (vnímanou přímo nosem a vnímanou nepřímo retronasální cestou) a vjem z hmatu a dotyku (teplý, studený, svíravý, dráždivý, pevný, měkký)¹¹. Barevný vjem¹⁴ pomineme, neboť souvisí s naprosto odlišnými principy vnímání než vjemy pocíťované prostřednictvím kontaktních procesů. Nebudeme se zabývat ani tzv. vomeronasálními vjemy, které jsou předpokládány např. u působení „lidských feromonů“, neb zatím jde o oblast lidského poznání, kde někteří přírodovědci vyslovují určitou rezervovanost¹⁵, i když je role těchto sloučenin, zejména v sestavách parfémů údajně velmi důležitá.

Modifikátory těchto „kontaktních“ vjemů můžeme pak charakterizovat, ve shodě s International Organization of the Flavor Industry (IOFI)¹⁶, jako látky bez zápachu či (v použité koncentraci), se zápachem zanedbatelným. Jejich hlavním účelem použití je zesílit chuť či vůni určité (potravní) komponenty nad vlastnosti, které má přirozeně ta daná složka sama o sobě. Podle legislativy EU jde o sloučeninu, která zesiluje vůni a/nebo chuť jídla¹⁷. Zdá se důležité obě definice doplnit o látky, které určitý vjem potlačují, nebo mění a zdůraznit i vjemy dotykové. Dotykové vjemy v ústech např. způsobují, že určitá potravina je vnímána jako chuťově plná, jakoby ústa naplňující a tudíž lépe uspokojující potřebu potravy. Navrhujeme proto definici novou, která zní: *Modifikátorem kontaktního vjemu (flavor modifier) je látka nebo směs látek, která sama za daného způsobu použití není výrazně vnímána chutí, či chem či dotykem, ale která podstatně mění, zesiluje či zeslabuje (maskuje) chuťový, vonný či dotykový pocit látky či směsi látek, ke které je přidána*. Stabilizátory (např. vůni), které nesplňují tuto naši definici, tudíž v tomto přehledu

neuvádíme.

Zcela zvláštní kategorií kontaktních vjemů je efekt (chuť) umami, který je popisován v literatuře různě: někdy jako jeden z chuťových vjemů, jindy jako chuťový modifikátor, někdy jako látka nemající vliv na žádnou ze zbývajících čtyř chutí. Protože látky s vlastností umami jsou známy jako látky zlepšující chuť jídel a potlačující čichové vjemy, podržíme se jejich zařazení zde, mezi modifikátory.

Tento článek se přidržel rozdělení modifikátorů podle Zieglerové¹¹, protože se autorům jevilo jako věrohodné.

3. Tradiční potravinářské přísady ovlivňující organoleptické vlastnosti

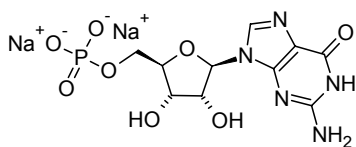
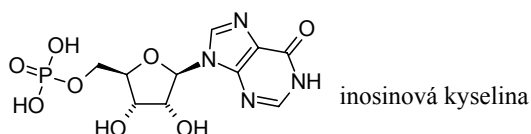
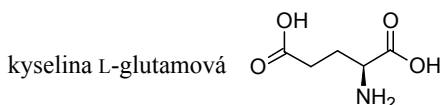
Komplex vlastností, které dokáží vytvořit z běžných surovin šikovní ručičky, vybroušený nos, jazyk a zkušenost kuchaře, vinaře, designéra voňavek a dalších kouzelníků zázračné dílo, je obtížně popsatelný inženýrským myšlením. Existují však známé principy a suroviny, které procesu takového zázraku napomohou asi tak jako hořká čekanka chuťové úrovni císařského salátu. Podívejme se blíže na to, co je známo. Historie poznání chuťových modifikátorů začala v zemi kulinářů, používajících při vaření téměř čarodějné přísady jako sušené mořské řasy, sušenou a rozdrcenou fermentovanou rybu bonito, sušené houby šiitake a podobné látky.

V roce 1908 Japonec Ikeda připsal chuťový efekt přidání mořských řas (řasy kombu, např. *Laminaria japonica* J. V. Lamouroux, *Laminariaceae*) do jídla v tradiční japonské kuchyni, v té době již známé, kyselině L-glutamové a nazval jej „umami“ s tím, že vlastní sloučeninu pojmenoval ajinomoto (podstata chuti)^{18–20}. Následoval v roce 1913 Kodama²¹, který našel další umami látku v rybí moučce ze sušených druhů tuňáka malého, bonito (*Katsuwonus pelamis*), 5'-O-inosin-fosfát (tehdy zvanou inosinová kyselina), látku, kterou Liebig již mnoho let před ním objevil v hovězím vývaru. Poté, v roce 1961 popsali Japonci další umami substanci, sodnou sůl 5'-O-

guanosin-fosfátu v sušené houbě šiitake (houževnatec jedlý, *Lentinus edodes* (Berb.) Pegler, *Tricholomataceae*)²².

Kyselina L-glutamová a příbuzné látky

Kyselina L-glutamová ((S)-glutamová, (+)-glutamová, Aciglut, E, E620, Glusate, Glutacid, Glutamicol, Glutamidex, GLU, Glutaminol, Glutaton), běžná neesenciální aminokyselina, která se používá hlavně v podobě monosodné soli (MSG, MonoSodium Glutamate, Accent, Aji-no-moto, E621), vykazuje umami efekt pouze při určitém pH. Právě monosodná sůl ve vodném roztoku napomůže potřebné disociaci, neboť mírně alkalické prostředí je pro efekt umami nejvýhodnější. Je to i proto, že její rozpustnost ve vodě je největší při pH vyšším než 5,5. Udává se, že optimální efekt je pozorován mezi pH 5 a 8. Je zajímavé, že právě mezi pH 5 a pH 8 je na křivce logD výrazné plato. Zatímco MSG je široce používána (roční spotřeba se odhaduje na půl milionu tun) a je všeobecně povolena (v některých zemích jsou omezena koncentrační maxima), ostatní soli jsou povoleny jen omezeně (L-glutamát monodraselný, MPG, E622; DL-glutamát vápenatý, E623; L-glutamát monoamonný, E624; DL-glutamát hořečnatý, E625). Kyselina glutamová se vyrábí fermentací za použití kmenů *Corynebacterium* a *Brevibacterium* ze škrobu nebo melasy za přítomnosti amonných solí či močoviny, dále hydrolyzou bílkovin, případně synteticky z akrylonitrilu. Vlastní chuť MSG je slano-sladká s detekčním limitem 100–300 ppm. Při vaření je kyselina L-glutamová stálá při pH 5–8. V kyselém prostředí a za zvýšené teploty dehydratuje a umami efekt se ztrácí. Také za vysokých teplot a působením silně kyselých či zásaditých prostředí racemizuje, čímž je umami efekt opět snížen. Chuť zlepšující vlastnosti jsou pozorovány u sýra, masa, omáček, majonéz, kečupů a podobně, v koncentraci 0,1–0,6 %. MSG nemá žádný, ba ani negativní efekt u sladkostí, mléčných výrobků či limonád. Určité potraviny obsahují pro umami efekt v dostatečném množství samy přírodní kyselinu L-glutamovou, jako např. sýry a některá zelenina; zajímavé je, že maso a mléko v čerstvém stavu obsahují pouze zlomek potřebného množství. Začátkem druhé poloviny minulého století se zdálo, že tzv. syndrom čínských restaurací, projevující se pálením v krku, tlakem v obličeji, bolestí v hrudi, pocením, nevolností, slabostí a bolením hlavy, je způsoben MSG. Po mnoha letech studií toto nebylo potvrzeno a FDA zařadila MSG do kategorie „bezpečných“ potravin GRAS (Generally Recognized As Safe) na úrovni běžných kuchyňských přísad. EU dokonce nestanovila ani nejvyšší přípustné denní dávky Merck Index²³ udává pro MSG LD₅₀ i.g. (myš) 19,9 g kg⁻¹; pro kyselinu není udáván. L-Glutamová kyselina je nejběžnějším rychlým excitačním neurotransmiterem savčího nervového systému (známa jako excitační aminokyselina EAA)²³ a prekurzorem inhibičního neurotransmiteru, kyseliny γ-aminomáselné (GABA). Sama je používána jako antiepileptikum; hydrochlorid jako žaludeční acidifikátor; hydrobromid hořečnaté soli jako anxiolytikum. Ve směsi s L-argininem se m.j. používá jako detoxikant amoniaku při jaterním selhání.

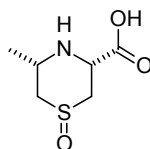


sodná sůl 5'-O-guanosin-fosfátu

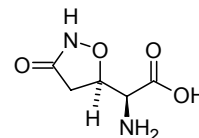
Kyselina D-glutamová nemá žádné pozorované vlastnosti modifikátoru či umami.

Existuje skupina látek příbuzných glutamové kyselině, která stojí za zmínku, i když nejsou používány tak často. Jde o L-cystein (E920; jeho hydrochlorid, sodná a draselná sůl jsou povoleny pouze pro zlepšování vlastností mouky [podobně jako močovina, E927b (karbamid) a mléčnan vápenatý, E 327 a některé další látky, které však neshledáváme hodny uvedení v kategorii modifikátorů]), DL-homocystein [0,77], 3-sulfo-L-alanin (cystein S-sulfonovou kyselinu), L-asparagovou kyselinu [0,01], L- α -aminoadipovou kyselinu [0,01], racemickou α -methylglutamovou kyselinu, (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylovou kyselinu (5-oxo-D-prolin), 3-(methylsulfanyl)propylamin, kyselinu DL-*threo*- β -hydroxyglutamovou [0,86], histamin, cykloalliin ((3R,5S)-5-methyl-1-oxido-thiomorfolin-3-kar-

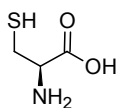
boxylová kyselina) a dvě látky izolované z hub tricholomovou kyselinu [5-30], ibotenovou kyselinu [5-30]; čísla uvedená v hranatých závorkách jsou relativní efekt umami¹¹, ve srovnání s MSG, pokud je znám.



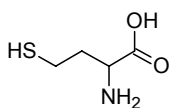
cykloalliin



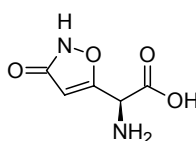
tricholomová kyselina



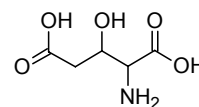
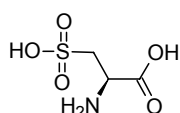
L-cystein



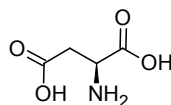
DL-homocystein



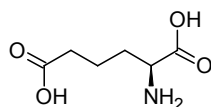
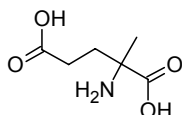
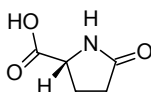
ibotenová kyselina

DL-*threo*-3-hydroxyglutamová kyselina

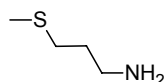
3-sulfo-L-alanin



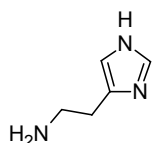
L-asparagová kyselina

L- α -aminoadipová kyselinaDL- α -methylglutamová kyselina

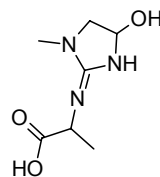
(R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylová kyselina



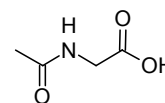
3-(methylsulfanyl)propylamin



histamin



A8



N-acetylglycin

Ibotenová kyselina je jako derivát glutamové kyseliny látkou známou z halucinogenních muchomůrek (*Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hook., *A. pantherina* (DC. ex Fr.) Krombh., *Amanitaceae*), která umí překonat hematoencefalickou bariéru (přestupuje z krve do mozkové tkáně). V mozku je metabolizována na muscimol (derivát γ -aminomáselné kyseliny). Tato látka je známým GABA-A agonistou a funguje jako primární inhibující neurotransmitter (ovšem falešný). Muscimol je odpovědný za psychoaktivní (halucinogenní) působení muchomůrek. Jako silný agonista GABA snižuje množství cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP) aktivací y Abu receptorů, což způsobuje v malých dávkách snížení motoriky, ve vyšších dávkách nastává ataxie (porucha koordinace pohybů). Jak ibotenová kyselina, tak muscimol působí v mozku v konečném stadiu jako silné neurotoxiny vyvolávající halucinace, delirium a svalové křeče; nezdá se však, že by se samotné ibotenové kyselině daly připsat psychoaktivní vlastnosti muchomůrek. Protože však má relativně silný umami efekt, je možné, že ona je důvodem, proč lidé, kteří se otrávilí muchomůrkami, si předtím (a někteří ani po-

tom) na houbách v životě tak nepochutnali.

Do této skupiny látek bude patřit i modifikátor chuti vývaru (BTM, Brothy Taste Modifier), kterým je *N*-(4-hydroxy-1-methylimidazolidin-2-yliden)alanin zvaný A8, který zlepšuje chuťové vlastnosti hovězího vývaru²⁴. Chiralita této molekuly není v literatuře popisována.

Zajímavá je i historie umami látky, *N*-acetylglutinu, která byla předpovězena počítačovým modelováním na základě analýzy 31 peptidů majících umami efekt. Jak zřejmě, skutečně tyto vlastnosti má²⁵. Látka byla vybrána z rozsáhlé předpovědní knihovny látek, m.j. i proto, že byla již předtím v potravinářství používána.

Purinové ribonukleotidy

Purinové ribonukleotidy, inosin monofosfát (IMP, inosinová kyselina), guanosin monofosfát (GMP, guanylová kyselina), původně získané z přírodních zdrojů se vyrábějí dnes buď hydrolyzou RNA z droždí za použití *Penicillium citrinum* anebo *Streptomyces aureus* anebo hydrolyzou této RNA až na nukleosidy, které jsou následně fosforylovány na nukleotidy. Oba mají umami efekt, GMP je silnější; někdy jsou používány ve směsi. Chuťová detekovatelnost je mezi 25 až 125 ppm pro IMP a 12–35 ppm pro GMP. Pro použití platí totéž, co bylo řečeno u MSG. Pro oblast přírodního výskytu také, s tím rozdílem, že vzhledem k tomu, že IMP je produktem vznikajícím z ATP, je obsah IMP v čerstvém masu obvykle vyšší a může dosahovat až koncentrací potřebných pro umami efekt (0,2 %). Lze vyslovit domněnku, že obsah přirozených umami modifikátorů může být v přímé souvislosti se zráním či nakládáním masa před kuchyňskou úpravou či s některými praktikami souvisejícími se způsobem porážky jatečných zvířat. Také je známo, že řada čerstvých potravin (zelenina, maso) obsahuje fosfomonoesterasy, které hydrolyzují IMP i GMP a tím likvidují umami efekt. Samy soli IMP a GMP jsou stabilní látky rozpustné ve vodě, odolné teplotám do cca 120 °C, s optimem použití, vzhledem k umami efektu, mezi pH 5 a 7, i když rozpustnost GMP je nejvyšší při pH > 7 (rozpustnost IMP je dostatečná již od pH 4,5).

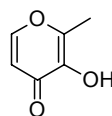
Vyhláška 304/2004 Sb. uvádí jako látky zvýrazňující chuť a vůni kyselinu 5'-guanylovou E626, 5'-guanylát disodný (GMP, guanylát sodný, guanylan, E627), 5'-guanylát didraselný (guanylát draselný, E628), E629 guanylát vápenatý (5'-guanylát vápenatý), kyselinu inosinovou E630, 5'-inosinát disodný (inosinát sodný, IMP, E631), 5'-inosinát didraselný (inosinát draselný, E632), 5'-inosinát vápenatý (inosinát vápenatý, E633), vápenaté soli 5'-ribonukleotidů (vápenaté ribonukleotidy, E634) a sodné soli 5'-ribonukleotidů (disodné ribonukleotidy, E635).

Maltol a ethylmaltol

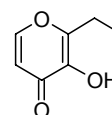
Když v roce 1861 Stenhouse izoloval z modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill., *Pinaceae*) příjemně vonící maltol, netušil, jaký ekonomický potenciál bude mít v budoucnosti. Maltol a jeho plně syntetický homolog jsou

potravinářským zázrakem. Přidáním 5–75 ppm maltolu do sladkých potravin umožní při zachování chuti snížit dávku cukru o 15 %. Maltol otupuje kyselost zejména octové kyseliny v salátových omáčkách a pikantních jídlech. Je schopen v dávce jednotek ppm vylepšit nízkotučné potraviny, jako jogurty, zmrzliny či omáčky tak, že chutnají bohatěji, plněji a smetanověji. V pečivu přispívá k dojmu čerstvě upečeného výrobku.

Dnes se maltol i ethylmaltol vyrábějí z kojové kyseliny. Přirozeně se maltol vyskytuje v pečených potravinách, kakau, čokoládě, kávě, karamelu, sladu, kondenzovaném mléku, borovicovém jehličí (*Abies alba* Mill., *Pinaceae*), čekance seté (cikorce, *Cichorium intybus* L., var. *sativus* DC. in Lam. et DC. *Cichoriaceae*, něm. Wurzelzichorie, Kaffeetichorie), dřevných dehtech a olejích. Tvoří se z cukrů za zvýšené teploty. Je to bílá krystalická látka s chutí podobnou karamelu, s mezi chuťového rozpoznání 35 ppm ve vodě. Ethylmaltol je 4–6krát silnější, denní dávka byla stanovena na 120 mg/den pro osobu vážící 60 kg, což je dávka mnohem vyšší, než běžně spotřebovávána. Oba jsou přidávány v množství 1–300 ppm do pečiva, nápojů, cukrovinek a cukroví, čokolády, mléčných výrobků a zavařenin.



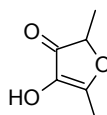
maltol



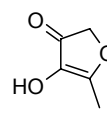
ethylmaltol

Furanony a cyklopentenolony

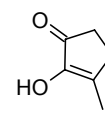
4-Hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2*H*)-on (HDMF, Furaneol[®]) a 4-hydroxy-5-methylfuran-3(2*H*)-on (HMF) jsou látky karamelovité vůně (HDMF připomíná svou vůni pečený ananas) s mezi chuťového rozpoznání 0,04 ppb ve vodě! Oba zdůrazňují dojem ovocné a smetanové vůně; používají se obvykle spolu s oběma maltoly. HDMF vzniká Maillardovou reakcí z rhamnosy za přítomnosti aminů. V přírodě se vykytují v masovém vývaru, ananasu, jahodách a popcornu.



HDMF



HMF



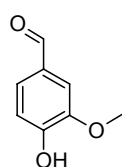
cykloten

Strukturně blízký cykloten (2-hydroxy-3-methylcyklopent-2-en-1-on, MCP), také s karamelovou vůní, je používán jako zesilovač dojmu oříškové a čokoládové vůně v koncentraci 5–100 ppm k vylepšení cukrovinek, pečiva, nápojů, žvýkaček a zmrzlin. V přírodě byl nalezen

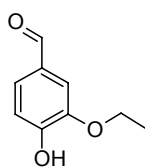
v javorovém sirupu a v dehtu z březového dřeva. Vzniká zahříváním cukrů při pH 8–10. Zajímavé je, že může maskovat dojem slané chuti; 10–20 ppm MCP může maskovat až 1–2 % soli. Podobně jako MCP je používán i 3-ethyl-2-hydroxy-cyklopent-2-en-1-on (ECP).

Vanilin a ethylvanilin

Vanilin, extrahovaný z vanilkových lusků (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew, Orchidaceae), se používá od poloviny 19. století. Dnes se většina vanilinu získává ze sulfitových louhů, kde vzniká z ligninu alkalickou hydrolyzou a oxidací. Může být také vyráběn synteticky z guajakolu. Protože je syntetický vanilin o mnoho lacinější a v řadě států je povoleno používat pouze vanilin přírodní, je syntetický často k nerozeznání dopován vaniliny obsahujícími příslušné isotopy tak, že je znesnadněno jeho jednoduché rozeznání od přírodního.



vanilin



ethylvanilin

Vanilin má charakteristickou vanilkovou vůni a mez chuťového rozpoznání 0,02 ppm ve vodě. Ethylvanilin je ještě 2–4krát silnější, je syntetizován z eugenolu, isoeugenolu a safrolu. Oba slouží nejen jako chuťová přísada, ale i k zesílení dojmu ovocné a čokoládové chuti. V lihovarnictví slouží oba ke zjemňování chuti, zejména řezaných lihovin.

4. Ostatní známé modifikátory

Peptidy a bílkoviny

Mirakulin (Mirlin), glykoprotein bez chuti o molekulové hmotnosti 40 000–48 000 se 14 % cukrů v molekule, izolovaný z plodů *Richardella dulcificia* (Schum et Thonn) Baehni (*Synsepalum dulcificum* A. DC., *Sapotaceae*) modifikuje kyselou chuť na sladkou. Po vypláchnutí úst roztokem mirakulinu chutná citrónová šťáva jako oslazená. Sladké, hořké ani slané chuti neovlivňuje.

Kurkulin, sladký protein o molekulové hmotnosti 28 000 izolovaný z plodů *Curculigo latifolia* Dryand., *Hypoxidaceae*, modifikuje kyselou chuť na sladkou jako mirakulin a dále sám ač chutná sladce, sladce chutnat přestane a poté i nesladké potraviny mohou být vnímány jako oslazené²⁶.

Ze stejného zdroje jako gymnemová kyselina, z listů gymnemy lesní (*Gymnema sylvestre* R. Br., *Apocynaceae*),

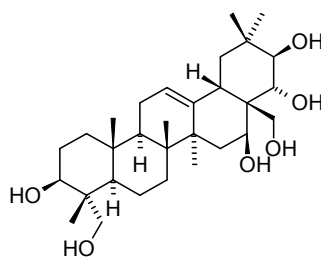
byl izolován i polypeptid (35 aminokyselin) gurmarin, který se údajně dá použít stejně jako gymnemová kyselina neb inhibuje vjem sladké chuti po několik hodin.

Oktapeptid BMP (Beafy Meaty Peptide, Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) se vyskytuje v hovězím mase, jeho mez chuťového rozpoznání je 1600 ppm. Zdůrazňuje chuť masa; je znám jako „lahodný peptid“.

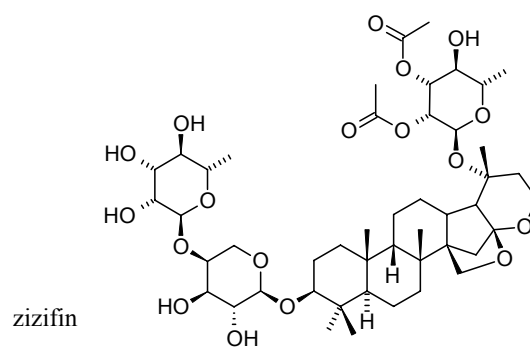
Sladce chutnající protein o molekulové hmotnosti 22 000 thaumatin (talin, E957) izolovaný z ovoce trvalky thaumatokoku (*Thaumatococcus daniellii* Bennett, *Marantaceae*) dokáže maskovat hořkou chuť²⁷.

Glykosidy

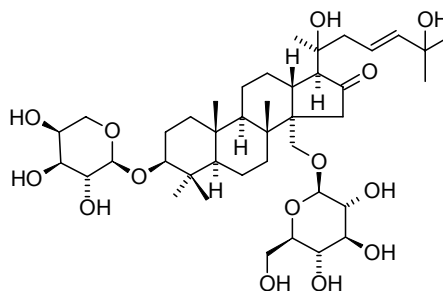
Gymnemová kyselina²⁸ (gymnemin), směs triterpenových glykosidů odvozených od gymnemageninu, který je různě substituován glukuronovou kyselinou a jinými sacharidy, z listů gymnemy lesní, inhibuje vjem sladké chuti po několik hodin. Přitom krystalový cukr chutná jako písek a roztok cukru jako vodovodní voda. Slané, hořké ani kyselé chuti neovlivňuje.



gymnemagenin



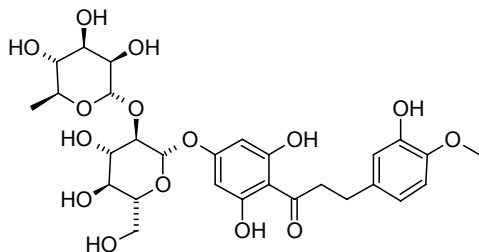
zizifin



hodulosid VI

Zizifin, triterpenový glykosid²⁹ z listů *Ziziphus jujuba* Mill. (*Rhamnaceae*) též potlačuje sladkou chuť. Podobně se chová i celá skupina dammaranových glykosidů, hodulosidů, izolovaných z listů hovenie sladké (*Hovenia dulcis* Thunb., *Rhamnaceae*).

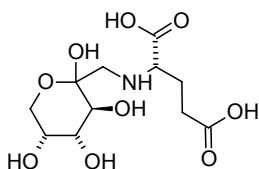
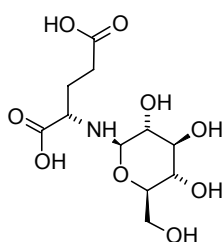
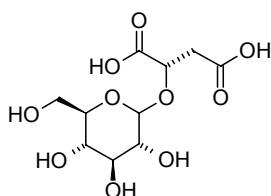
Dihydrochalkon neohesperidinu (NHDC, Sukor, E959) se používá nejen jako sladidlo¹, ale i jako látka zesilující ovocný charakter a potlačující ostré a kořeněné tóny.



NHDC

Glykokonjugáty glutamové kyseliny *N*-(1-deoxy-D-fruktos-1-yl)-L-glutamová kyselina a *N*-(D-glukopyranosyl)-L-glutamová kyselina byly zjištěny jako produkty Amadoriho a Maillardovy reakce. V podobě alkalických solí, či v příslušném prostředí vykazují umami efekt. Jejich mez chuťového rozpoznání je ve vodném roztoku blízká MSG, 1–2 mmol L⁻¹ (cit.³⁰).

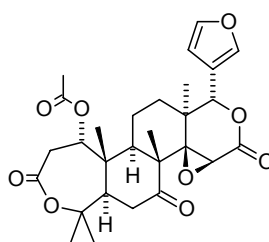
Ze smrže *Morchella deliciosa* Fr. (*Morchellaceae*) byla izolována směs (2*S*)-2-(α- a -β-D-glukopyranosyloxy) jantarové kyseliny nazvaná (*S*)-morelid, mající nakyslou chuť a v oblasti příslušného pH i umami efekt; její chuťový detekční limit je 6,0 mmol L⁻¹ (cit.³¹).

*N*-(1-deoxy-D-fruktos-1-yl)-
-L-glutamová kyselina*N*-(β-D-glukopyranosyl)-
-L-glutamová kyselina

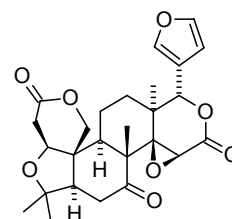
morelid

Ostatní látky

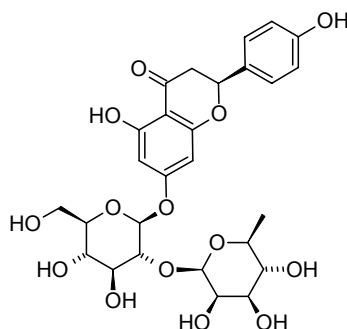
Kůra plodů zralých i nezralých citrusů obsahuje hořké látky³², z nichž některé jsou používány jako sloučeniny zesilující a upravující chuť³³, jako např. nomilin, limonin (citrolimonin, diktamnolakton, evodin, obakulakton), naringin ((2*S*)-naringin, naringenin-7-rhamnoglukosid, naringosid) a jejich kombinace, většinou na koncentrační úrovni počátku chuťové detekce.



nomilin

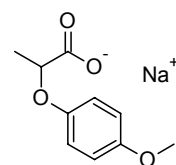


limonin



naringin

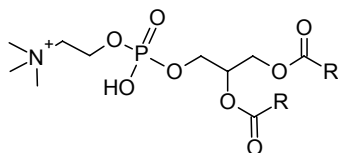
Laktisol (cypha, 2-(4-methoxyfenyloxy)propanoát sodný) snižuje pocit sladké chuti. Tato sloučenina však byla identifikována též v pražené kávě.



laktisol

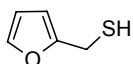
Lecitin, který se většinou používá jako emulgátor, je používán i jako látka, která maskuje hořkou chuť a hrubé příchuti mátou a mentholem ochucených žvýkaček. Většinou jde o směs glykolipidů, triglyceridů ale především fosfolipidů (tj. fosfatidylcholinu, fosfatidylethanol-aminu a fosfatidylinositolu), nicméně v biochemii je termín leci-

tin používán pro fosfatidylcholin³⁴, směs diglyceridů stearové, palmitové a olejové kyseliny vázaných na ester cholinu a kyseliny fosforečné (Lecithol, Vitellin, Kelecín, Granulestin), a proto je pro tuto přírodní směs vhodnější používat pojmu esenciální fosfolipidy lecitinového typu.

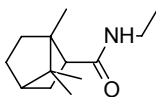


fosfatidylcholin

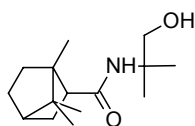
Celá široká skupina *N*-substituovaných nenasycených *N*-alkylamidů je patentově chráněna jako modifikátory alespoň jedné z pěti chutí³⁵. Furan-2-methanthiol z řepkových semen (*Brassica* sp.) je patentován jako modifikátor pro použití v potravinách, hygienických prostředcích a kosmetice ale i v tabáku³⁶. Za modifikátor může být pokládán i cyklohextrin¹⁰. *N*-Ethyl-1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-karboxamid (ETHC) je uváděn jako látka zlepšující chuť pomerančových nápojů obsahujících oxid uhličitý již v koncentraci 0,3 ppm (cit.³⁷), přidáním *N*-(2-hydroxy-1,1-dimethylethyl)-1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-karboxamidu (HDTHC) pak chutnají jako sladší a chuťově vyváženější. U nápoje z černého rybízu je naopak pocit chuti kyselější.



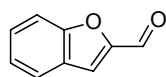
furan-2-methanthiol



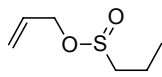
ETHC



HDTHC



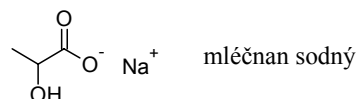
kumarylaldehyd



allyl-propan-1-sulfínát

Kumarylaldehyd a jeho deriváty zlepšují chuť kávy a potravin³⁸ již v koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ g l⁻¹. Allyl-propan-1-sulfínát a jeho deriváty zlepšují chuť a vůni tabáku a potravin v koncentracích 0,05–150 ppm (cit.³⁹).

Mléčnan sodný (laktát sodný, Lacolin, E325) a mléčnan draselný (laktát draselný, E326) jsou povoleny jako regulátory kyselosti a zvýrazňovače chuti.



Chlorid sodný, nejprostší chuťový modifikátor⁴⁰ je znám nejen z pohádky *Šel nad zlato*, ale i proto, že každý ví, že neosolené cukrovinky – pečivo či maso atp. – nebudou mít správnou chuť. Ne nadarmo se ve středověku za sůl platilo i drahými kovy.

V předchozím článku¹ o sladidlech byla zmíněna tzv. „aktivita vody“, velmi prostinkým regulátorem, který jistě ovlivňuje i chuť, je glycerin⁴¹.

Začali jsme tím, že jako modifikátory jsou používány sušené a drcené přírodní suroviny jako ryby, houby a podobně. Skončíme tím, že se používají též bohapusté směsi vzniklé hydrolyzou jiných přírodních látek, jako např. masa, ale často i potravinářských odpadů. Takovými hydrolyzáty jsou autolyzáty droždí obsahující až 6 % ribonukleotidů, např. GMP. Hydrolyzáty rostlinných proteinů (např. sóji) buď minerální, nebo organickou kyselinou (HCl) obsahuje až 17 % MSG a NaCl, či enzymy (až 35 % MSG, bez NaCl), je zastoupen např. sójovou omáčkou. Chuťový modifikátor známý každému v našich zeměpisných šířkách je hydrolyzáty, používající k hydrolyze zbytků masného průmyslu kyselinou chlorovodíkovou, kdy se po hydrolyze materiál zneutralizuje sodou nebo louhem a vznikne kvalitní (české) polévkové koření „maggiumami“ obsahující jak aminokyselinové, tak nukleotidové umami modifikátory a chlorid sodný, modifikátor chudých.

5. Efekt synergismu

Podobně jako tomu bylo např. u sladidel, je i u látek umami znám synergický efekt. Směs umami substancí má často větší umami účinek než každá komponenta sama o sobě. Tak např. směs MSG a IMP (1:1) má relativní intenzitu umami efektu 7 a podobná směs MSG a GMP dokonce 30. Je znám efekt MSG na chlorid sodný, kde optimální poměr MSG a NaCl je 2:1. Sladký thaumatokocin má podobný efekt na MSG jako nukleotidy, avšak v mnohem menších dávkách vzhledem ke své vlastní intenzivní chuti. Vzájemně se potencující umami efekt má celá řada výše jmenovaných aminokyselin.

6. Závěr

Je dnes dostatečně známo a zdokumentováno, že diversita přírodních látek a jejich derivátů je značná stejně jako vliv řady z nich na potravinářské a organoleptické vlastnosti potravin. Značný je i průmyslový význam těchto modifikátorů, neboť dnešní potravinářský průmysl vyrábějící žádané „dietní“ potraviny, obsahující stále méně stra-

vitelných komponent („... ten lehký jogurt je skoro jako smetanový ...“) a používající v honbě za nižšími a nižšími cenami na všech frontách náhražky, surogáty a často i odpady z jiných průmyslových odvětví, potřebuje alespoň napodobit potraviny vyrobené klasicky a ze surovin řádných. Bez syntetických vonných a chuťových látek a bez výše popsaných modifikátorů by byla pozice takových výrob více než obtížná. Tyto látky však mohou hrát v blízké budoucnosti významnou roli ve výkrmu hospodářských zvířat, zejména poté, co direktiva EU zakázala v členských zemích použití masokostních mouček a antibiotických stimulantů růstu. Současný výzkum v této oblasti se stále více vrhá do oblasti použití přírodních surovin a nutno říci, že takové směsi si vyžadují určitého ochucení, aby byly bez problémů přijímány, využitá krmná dávka a uplatnily se přísady doplňkových látek přírodního původu (např. s antimikrobiálním účinkem), které bývají chuti nevalné. Na straně druhé si nelze zastírat, že klasická potravina a krmivo jsou nezastupitelné a jen obtížně napodobitelné, ať již se chemici činí, jak chtějí. Tento článek si klade za cíl umožnit alespoň nahlédnout do laboratoře potravinářských mágů.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a grantu NAZV QH71284 (2007).

LITERATURA

- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2006).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy, 101, 44 (2007).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 233 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 314 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Benešová E., Marková M., Lipovová P., Králová B.: Chem. Listy 99, 324 (2006).
- Harmatha J.: Chem. Listy 99, 622 (2006).
- Matheis G.: Dragoco Report: Flavoring Information Service 1, 5 (1997); Chem. Abstr. 126, 233396 (1997).
- Hara K., Hashimoto H.: Denpun Kagaku 33, 152 (1986); Chem. Abstr. 105, 132206 (1986).
- Ziegler H. (ed.): *Flavourings*, 2.vyd., Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Perrine D. M.: *The Chemistry of Mind-Altering Drugs*, ACS, Washington 1996.
- Chandrashekar J., Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: Nature 444, 288 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).
- Meredith M.: Chem. Senses 26, 433 (2001).
- IOFI Information Letter 1343, Brussels, February 27, 2007. (http://www.leffingwell.com/IOFI_WGMA_2_07_LIST.pdf, staženo 31.5.2007).
- European Parliament and Council Directive. No. 95/2/EC.; Off. J. Eur. Comm. 38 (L61) 1 (1995).
- Ikeda K.: J. Chem. Soc. (Tokyo) 30, 820 (1909).
- Shizuko Y., Kumiko N.: J. Nutr. 130, 921S (2000).
- Ikeda, K. Japan. 4805 (1908); Brit. 9440 (1909); Chem. Abstr. 5, 836 (1911).
- Kodama S.: J. Tokyo Chem. Soc. 34, 751 (1913).
- Nakajima N., Ichikawa K., Kamada M., Fujita E.: Nippon Nogei Kagaku Kaishi 35, 797 (1961); Chem. Abstr. 60, 41721 (1964).
- The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
- Shima K., Yamada N., Suzuki E., Harada T.: J. Agric. Food Chem. 46, 1465 (1998).
- Grigorov M. G., Schlichtherle-Cerny H., Affolter M., Kochhar S.: J. Chem. Inform. Comput. Sci. 43, 1248 (2003).
- Kurihara Y.: Can. Pat. Appl. CA 2076830 (1993); Chem. Abstr. 119, 266953 (1993).
- Higginbotham J. D., Snodin D. J., Eaton K. K., Daniel J. W.: Food Chem. Toxicol. 21, 815 (1983).
- Stöcklin J.: J. Agric. Food Chem. 17, 704 (1969).
- Kurihara Y., Ookubo K., Halpern B. P.: Ann. NY Acad. Sci. 510, 427 (1987).
- Beksan E., Schieberle P., Robert F., Blank I., Fay L. B., Schlichtherle-Cerny H., Hofmann T.: J. Agric. Food Chem. 51, 5428 (2003).
- Rotzoll N., Dunkel A., Hofmann T.: J. Agric. Food Chem. 53, 4149 (2005).
- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy, 101, 895 (2007).
- Soukup R. J., Parliment T. H.: Fr. Demande FR 2529446 (1984), Chem. Abstr. 100, 137686 (1984).
- Lecithin [online], poslední aktualizace 7. srpna 2007 03:19 [cit. 25. 8. 2007], Wikipedie. Dostupné z [www: \(http://en.wikipedia.org/wiki/Lecithin\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Lecithin).
- Dewis M. L., Conklyn G., Pei T., Smith C. M., Janczuk A. J.: US 2006068071 (2006); Chem. Abstr. 144, 301190 (2006).
- Binggeli E., Gassenmeier K., Molnar J., Schieberle P.: PCT Int. Appl. WO 2003071863 (2003); Chem. Abstr. 139, 696644 (2003).
- Gascoyne J. M., Spring D. J.: Brit. 1,502,680; GB 1502706; Chem. Abstr. 89, 106206 (1978).
- Winter M., Gautschi F., Flament I., Stoll M., Goldman I. M.: U.S. 3917871 (1975); Chem. Abstr. 84, 57582 (1976).
- Pittet A. O., Pascale J. V., Hruzza D. E.: FR 72-41511 19721122 (1973); Chem. Abstr. 80, 13823 (1974).
- Breslin P. A. S., Beauchamp G. K.: *Book of Abstracts, 210th ACS National Meeting*, Chicago, IL, August 20–24 (1995), Pt. 1, AGFD-117.
- Sawhney I. K., Patil G. R., Kumar B., Rao K. J.: J. Food Sci. Technol. (Mysore) 31, 252 (1994).

J. Moravcová^a, L. Opletal^b, O. Lapčík^a, J. Čopíková^c, M. Uher^d, and P. Drašar^a (^a *Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b *Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové,* ^c *Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^d *Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*): **Compounds Influencing Perception of Organoleptic Properties (Flavor Modifiers)**

The review provides a comprehensive survey of compounds influencing perception of organoleptic properties or flavor/taste modifiers in the context of the diversity of natural compounds and materials used in food industry. The article proposes a new definition of flavor (or contact-perception) modifier as a compound or mixture of compounds which is not perceived intensively by taste, smell or touch but which substantially changes (masks), enhances or diminishes taste, smell or tactile perceptions of the material to which it is added.

DDAVP – 40 LET PRVÉHO SUPERAKTIVNÍHO VASOPRESINU. OBJEV A SOUČASNÝ PRAKTICKÝ VÝZNAM

Motto: I canterburský arcibiskup je z 60% jen voda. (Platí doslova). J.B.S. Haldane v E.H.F. Baldwin: The Nature of Biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge 1966.

Bei meiner Arbeit hat mir eigentlich niemand geholfen; diejenigen, die mich dabei behinderten, will ich nicht aufzählen, denn dies würde zuviel Platz erfordern. (Neplatí, naštěstí, doslova). Stanislaw Lem: Die Sterntagebücher des Weltraumfahrers Ijon Tichy. Verlag Volk und Welt, Berlin 1961.

MILAN ZAORAL

V r. 1949–1989 vědecký pracovník Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd, 166 10 Praha 6, Flemingovo nám. 2. Současná adresa: Na Louko-ti 12, 160 00 Praha 6

Došlo 14.5.07, přijato 11.7.07.

Klíčová slova: objev, vlastnosti, výroba DDAVP, DDAVP v lékařské praxi, DDAVP inovace

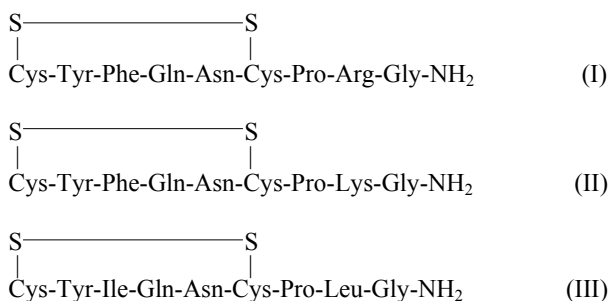
Obsah

1. Úvod
2. Základní úvahy
3. Od disociace antidiuretického a presorického účinku k DDAVP
4. Základní vlastnosti DDAVP
5. Zobecnění získaných poznatků
6. Struktura postranního řetězce bazické aminokyseliny v poloze 8 a biologické účinky vasopresinů. 8-D-substituce a 1-desaminace
7. Cesta DDAVP do výroby
8. DDAVP v lékařské praxi. Úvodní poznámka
 - 8.1. Terapie diabetes insipidus centralis
 - 8.2. Terapie enuresis nocturna
 - 8.3. Test na maximální koncentrační kapacitu ledvin
 - 8.4. Terapie hemofilie A a von Willebrandova syndromu
 - 8.5. DDAVP při uremiích
 - 8.6. DDAVP v chirurgii
 - 8.7. Další aplikace DDAVP
9. Inovace DDAVP
10. Závěr

1. Úvod

Vasopresiny, LVP a AVP (obr. 1), jsou neurohypofyzární, peptidové hormony, které jsou důležitým homeostatickým faktorem savčího a tedy i lidského organismu. Hormonem lidského organismu je AVP. Vasopresiny mají dva hlavní biologické účinky: diurézu snižující, antidiuretický účinek (AD) a účinek na krevní tlak. U savců krevní tlak zvyšují, mají presorický účinek (BP), u ptáků snižují, působí tedy depresoricky. Kromě toho mají reziduální účinky příbuzného hormonu oxytocinu (OT) (obr. 1 a tab. I). Z hlediska biologických účinků jsou vasopresiny látkami polyfunkčními, což má z praktického hlediska své zřejmé nevýhody.

V polovině 60. let minulého století – *hora ruit* – jsme se v naší tehdejší laboratoři Peptidy II Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd v Praze (ÚOCHB ČSAV), zabývali výzkumem vztahů mezi chemickou strukturou vasopresinů a jejich biologickými účinky. Práci jsme zaměřili atraktivním, ale v té době velmi riskantním směrem, tj. na přípravu látek s co nejvyšším a co nejčistším AD (cit.¹). Bylo zřejmé, že tyto látky, skutečné adiuretiny, by byly nejen teoreticky, ale také prakticky zajímavé. Na praktický význam výzkumu byl tehdy kladen – *per fas nefasque* – velký důraz.



Obr. 1. Primární struktura AVP (I), LVP (II) a OT (III)

Tabulka I
Biologické účinky LVP, AVP a OT^a

Sloučenina	AD	BP	UT
LVP	209±10	243±3	4,7±0,5
AVP	429±42	380±38	16±4
OT	5±1	5±1	450±30

^a Hodnoty biologických účinků uvedené v tabulce jsou převzaty z publikací (cit.^{4,7,23})

2. Základní úvahy

Klíč k přípravě látek s vysokým a specifickým AD jsme spatřovali v 8-D-substituci, tj. ve změně konfigurace bazické aminokyseliny v poloze 8 vasopresinové molekuly. Důvody, které nás k tomu vedly, jsem několikrát popsal dříve^{1–8}. Pro ty, kterým stále uniká podstata věci a snaží se parazitovat na DDAVP tím, že deformují základní racionále objevu, opakují:

Polohu 8 jsme vybrali za místo pro provádění strukturních změn na základě jejího významu pro kvalitu a kvantitu biologických účinků vasopresinů (OT jsme při tom považovali za analog vasopresinů^{9,10}). Byl znám značný počet přirozených analogů modifikovaných v této poloze (tab. II). Když tedy Příroda mohla provádět v této poloze strukturní změny, proč ne my. Není bez zajímavosti, že polohu 8 považují někteří autoři za velmi citlivou na strukturní změny¹¹.

Při úvahách o typu strukturních změn jsme vycházeli z plauzibilní představy o interakci vasopresinu se dvěma typy receptorů, antidiuretickým a presorickým. Bylo logické předpokládat, že tyto interakce budou odlišné povahy

a tedy že strukturní změny v poloze 8 ovlivní biologické účinky vasopresinu odlišným způsobem. Občas se nám vytýkalo, že existovala, v nejlepším případě, jen 50% pravděpodobnost, že se tak stane požadovaným způsobem a že pozitivní výsledek, který jsme získali, byl v tomto směru náhodný. Tito glosátoři však přehlédli existenci analogů^{12–17} uvedených v tabulce III. Z jejich vlastností jsme usuzovali na větší citlivost BP na stereochemické strukturní změny v poloze 8 než účinku AD. Na výzkumu dvou ze tří uvedených analogů jsem se podílel, takže jsem měl informace „z prvé ruky“ a dovedl jsem je správně využít. Na základě toho jsem zvolil jako strukturní změnu změnu konfigurace, ve snaze docílit maximální delokalizaci postranního řetězce bazické aminokyseliny v poloze 8.

Změnou konfigurace v poloze 8 jsme se snažili dosáhnout – a také dosáhli – disociace AD a BP, nikoliv prodloužení biologických účinků. Každý, kdo má alespoň elementární představu o enzymatické degradaci vasopresinů v organismu ví, že pokus o prodloužení biologických účinků vasopresinů pouhou změnou konfigurace v poloze 8 je absurdní.

Tabulka II
Přirozené analogy vasopresinů a oxytocinu^a

	S					S			
Arginin vasopresin	Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly-NH ₂
Lysin vasopresin								Lys	
Arginin vasotocin			Ile					Arg	
Fenypresin		Phe						Lys	
Oxytocin			Ile					Leu	
Mezotocin			Ile					Ile	
Valitocin			Ile					Val	
Izotocin			Ile	Ser				Ile	
Glunitocin			Ile	Ser				Glu	
Aspartocin			Ile	Asn				Leu	
Poloha	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Pozn.: Schematicky je vyznačen disulfidový most mezi Cys¹ a Cys⁶. ^a Další údaje k látkám uvedeným v tabulce lze nalézt v publikacích (cit.^{1,4,5,7,10}). Zaslouží zmínky, že vasotocin, mezotocin, valitocin a aspartocin byly připraveny synteticky dříve, než byly izolovány z přírodního materiálu

Tabulka III

Oxytocinové a vasopresinové analogy se zvýšenou specifičností antidiuretického účinku syntetizované před DDAVP

Sloučenina	AD	BP	UT	Lit.
[Phe ³]OT ^a	30	3	20	12,14
[D-Leu ⁸]OT	slabý účinek	0	20	15
[Tly ⁸]VP	400±50	35±5	5	16,17

^a Oxypresin

3. Od disociace antidiuretického a presorického účinku k DDAVP

Náš přístup byl úspěšný. Hned první analog, který jsme podle něj připravili^{18,19} [D-Dab⁸]VP, měl v podstatě vlastnosti, které jsme hledali, tj. měl značný a značně specifický AD (tab. IV). Důvod, proč jsme připravili tento analog jako první, byl jednoduchý. V té době, ve druhé polovině 60. let, byla totiž kyselina D-2,4-diaminomáselná jedinou bazickou aminokyselinou konfigurace D, kterou jsme měli k dispozici v dostatečném množství. Zaslouží zmínky, že diastereomerní látku, all-L-sloučeninu, jsme připravili^{18,20} již ve druhé polovině 50. let a referovali²¹ jsme o ní na Kongresu IUPAC v Mnichově (1959). Byl to druhý vůbec připravený vasopresinový analog a první se značnými biologickými účinky (tab. IV). Od [D-Dab⁸]VP vedla cesta přímo, přes [D-Lys⁸]VP a [D-Arg⁸]VP (cit.^{22,23}) k DDAVP, tj. k [Mpr¹, D-Arg⁸]VP (cit.²⁴).

4. Základní vlastnosti DDAVP

DDAVP má minimálně o dva řády vyšší AD ve srovnání s AVP, nepatrný BP a snížené reziduální účinky OT (tab. IV). V literatuře se setkáváme s širokým rozpětím hodnot pro AD DDAVP (což závisí na způsobu stanovení AD). Při stanovování AD metodou podle Sawyera²⁵ modifikovanou Pliškou a Rychlíkem²⁶, má závislost účinku na logaritmu dávky exponenciální podobu a příslušná křivka není paralelní s křivkou standardu (LVP nebo AVP). Velikost AD DDAVP nelze tedy vyjádřit jedním číslem.

Pro nízké nadprahové dávky jsme udávali pro AD DDAVP hodnotu 870 IU mg⁻¹. Pro terapeutické dávky jsme hodnotu AD DDAVP odhadovali na 50 000 IU mg⁻¹, což později, v nezávislé studii, potvrdil Vávra se spolupracovníky²⁷. Metoda podle Plišky a Rychlíka používá chirurgicky preparované pokusné zvíře (krysa potkan, dále jen krysa), které má zavedenou žaludeční sondu, voperovanou kanylu do močového měchýře a je v alkoholové narkóze. Velký rozptyl výsledků jsme zprvu přičítali nízké kvalitě pokusných zvířat, která jsme měli tehdy k dispozici, a účinkům stresu. Stres ovlivňuje nejen sekreci adrenalinu, ale také vasopresinu²⁸. AD vysokých dávek DDAVP podávaných pacientům při rozsáhlých chirurgických zásazích, se prakticky neprojevuje (viz kapitola DDAVP v chirurgii). A „sawyerovská krysa“, nebo krysa podle Plišky a Rychlíka chcete-li, je operované a narkotizované zvíře. Podle mého názoru nebyla také brána v úvahu existence vodního a solného centra v mezimozku, které je spojeno nervovými drahami s prodlouženou míchou²⁹. Nebyla tedy vzata v úvahu neuronální složka mechanismu antidiurézy, která může být významně ovlivněna chirurgickou přípravou a premedikací pokusného zvířete. Abychom se tomu všemu vyhnuli, obrátili jsme se k metodě podle Burna³⁰, která používá intaktní, nestresované zvíře. Metoda podle Burna nám poskytla mnohem konzistentnější, uspokojivé výsledky. Metoda podle Burna je také podstatně bližší klinickému experimentu a klinické praxi než metoda podle Plišky a Rychlíka. Pacienti by asi protestovali, kdyby měli být připravováni a premedikováni jako „sawyerovská krysa“ při hodnocení biologického účinku antidiuretik vasopresinového typu.

Tabulka IV

Analogy připravené na cestě k DDAVP

[X ⁸]VP	AD	BP	UT	Lit.
Dab	120±30	149	3,5	18,20,21
D-Dab	120±30	3,6	0,1	18,19
D-Lys	6–10	0,75	0,4	22,23
D-Arg	114	4,1	0,4	22,23
[Mpr ¹ , D-Arg ⁸]	50445±9840	0,96	5,1	24

5. Zobecnění získaných poznatků

Na papíře to vypadá vše velmi jednoduše a snadno. V počátcích naší práce jsme však nevěděli, jak obecný je vliv změny konfigurace v poloze 8 a není-li rušen dalšími strukturními změnami, což mělo zásadní význam pro cílelou konstrukci vasopresinových analogů. Abychom si tyto otázky objasnili, uskutečnili jsme v letech 1966–1979 dosti rozsáhlou studii, během níž jsme syntetizovali a resyntetizovali celkem 28 vasopresinových analogů. Získané výsledky jsme shrnuli v přehledu⁴ publikovaném v r. 1985. Vedly k těmto závěrům: Změna konfigurace bazické aminokyseliny v poloze 8 vasopresinové molekuly vede, prakticky obecně, k analogům s výrazně zvýšenou specifičností AD, způsobenou snížením BP. Změna konfigurace má dominantní postavení, tj. její vliv není rušen zavedením dalších strukturních změn do vasopresinové molekuly. *Změna konfigurace v poloze 8 vede tedy k nové skupině vasopresinových analogů, vyznačující se vysokou specifičností AD.* Délka postranního řetězce bazické aminokyseliny v poloze 8 ovlivňuje v L-řadě velikost a částečně i specifičnost AD. V D-řadě ovlivňuje velikost AD a jen nepatrně jeho specifičnost.

6. Struktura postranního řetězce bazické aminokyseliny v poloze 8 a biologické účinky vasopresinů. 8-D-substituce a 1-desaminace

Nyní, po uplynutí více než 20 let od zveřejnění souhrnné tabulky⁴, doplňujeme naši předchozí studii o korelaci vztahů mezi biologickými účinky analogů obsahujících v poloze 8 bazické aminokyseliny o sudém a lichém počtu uhlíkových atomů.

Srovnávali jsme 6 skupin analogů uvedených

v tabulce V. V jednotlivých skupinách jsme zprůměrovali hodnoty AD analogů obsahujících v poloze 8 bazické aminokyseliny o sudém a lichém počtu uhlíkových atomů v postranním řetězci. Výsledky jsou uvedeny v tab. VI. V L-řadách, jak vyplývá z tab. VI, je AD zřetelně vyšší u analogů obsahujících v poloze 8 bazickou aminokyselinu o sudém počtu uhlíkových atomů, v D-řadách je AD vyšší u analogů obsahujících v poloze 8 bazickou aminokyselinu o lichém počtu uhlíkových atomů. Tento nálezn je nesporně zajímavý a v oblasti biologicky účinných peptidů nový. Odráží, velmi pravděpodobně, rozdíly v prostorovém uspořádání vasopresinových analogů a jejich interakci s V2 receptory v ledvinách.

AD DDAVP a strukturně podobných látek je výsledkem kooperativního působení 8-D-substituce a 1-desaminace. Relativní příspěvek těchto strukturních změn vyplývá ze srovnání změn velikosti průměrného AD a BP při přechodu z amino-L-řady do desamino-L-řady, ze změn biologických účinků pozorovaných při analogických přechodech v D-řadě a při přechodech z L-řad do D-řad (tab. VII). 1-Desaminace způsobuje v L-řadě značné zvýšení AD (ze 125 na 721; 5,8×) a nesignifikantní snížení BP (226–220; 1,03×). Specifičnost AD vypočtená z poměrů AD/BP pro jednotlivé analogy, vzrostla sice 29× ve srovnání s amino-L-řadou, ale BP zůstává při tom vysoký. 1-Desaminace v D-řadě způsobuje značné zvýšení AD (111–415; 3,7×) a nevýznamné zvýšení BP (5,5–6,2; 1,13×), BP zůstává při tom velmi nízký. 8-D-substituce způsobuje v aminořadě a desaminořadě malé snížení AD (125–111; 1,13× a 721–415; 1,7×) a velké snížení BP (226–5,5; 41× a 220–6,2; 35×) (tab. VII). Hlavním faktorem při disociaci AD a BP je 8-D-substituce. 1-Desaminace má jen malý vliv na poměr mezi AD a BP a při přípravě vasopresinových analogů s vysokým a vysoce specifickým AD má jen podpůrný, potenciační význam.

Tabulka V
Srovnání skupin analogů

Aminokyselina v poloze 8			Řada											
			L			dL ^b			D			dD ^c		
			C ^a	AD	BP	AD/BP	AD	BP	AD/BP	AD	BP	AD/BP	AD	BP
I	Dap	1	50	109	0,5	1097	14	78	160	21	8	953	23	41
II	Dab	2	120	149	0,8	1373	450	3	120	3,6	33	360	2,0	176
III	Orn	3	88	360	0,2	202	355	0,6	60	0,2	250	590	4,8	123
IV	Lys	4	209	243	0,9	301	126	2,4	8	0,7	11	3.8	1,0	3,6
V	Hly	5	159	267	0,6	634	153	4,1	207	1,8	113	170	0,5	340
VI	Dap(G)	1	--	--	--	7500	49,1	152	--	--	--	43500	2,7	16100
VII	Nar	2	--	--	--	90500	150	60	--	--	--	10000	16,3	613
VIII	Arg	3	400	430	0,9	1300	370	3,5	--	--	--	50000	0,9	52000
IX	Har	4	--	--	--	5500	274	20	--	--	--	1500	0,5	3000

Hodnoty AD a BP uvedené v tabulce, použité pro výpočet dat uvedených v tabulce VI, jsou převzaty z přehledného článku⁴ str. 567.

^a Počet uhlíkových atomů v postranním uhlíkovém řetězci bazické aminokyseliny v poloze 8, ^b dL = desamino-L, ^c dD = desamino-D

Tabulka VI

Průměrný AD vasopresinových analogů obsahujících v poloze 8 bazické aminokyseliny o sudém nebo lichém počtu uhlíkových atomů v postranním řetězci

Skupina	L ^a	dL ^a	D ^a	dD ^a	dL ^b	dD ^b
lichý počet	99	644	142	571	4400	46 750
sudý počet	164	837	64	182	48 000	5750

^a Analogy lysinového typu (I–V, tab. V), ^b analogy argininového typu (VI–IX, tab. V)

Tabulka VII

Relativní vliv 8-D-substituce a 1-desaminace na průměrnou velikost a specifickou AD

Biologický účinek	1 L ^a	2 dL ^a	3 D ^a	4 dD ^a	5 dL ^b	6 dD ^b
AD	125	721	111	415	26200	26250
BP	226	220	5,5	6,2	211	5,1
AD/BP	0,6	17,6	83	137	59	1,8·10 ⁴

Vliv 8-D-substituce ilustruje srovnání sloupců 1,3; 2,4 a 5,6. Vliv 1-desaminace srovnání sloupců 1,2 a 3,4; ^a analogy lysinového typu (I–V, tab. V), ^b analogy argininového typu (VI–IX, tab. V)

7. Cesta DDAVP do výroby

Když byly nesporně atraktivní vlastnosti DDAVP nezávisle potvrzeny v tehdejší Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii³¹ a když orientační klinické testy prokázaly jeho vysokou účinnost při substituční terapii *diabetes insipidus*³², bylo rozhodnuto zavést jej urychleně do výroby a lékařské praxe. To je složitá, pracná a zdlouhavá procedura, kterou se zde nemůžeme podrobněji zabývat. Jednotlivé stupně realizačního procesu jsou chronologicky zachyceny v tab. VIII, převzaté z mé přednášky na 28. Peptidovém sympoziu⁸. Jak je z tab. VIII patrné, byl DDAVP vyráběn v České republice asi 28 let. V letech 1973–1975 byl produkován na ÚOCHB ČSAV, poněvadž podnik, který měl zajišťovat výrobu, nebyl na ni včas připraven. Oficiálně byla výroba v České republice zahájena v r. 1976. Preparát byl záhy zařazen mezi společensky nezbytná léčiva a jeho výroba byla subvencována státem. V podniku Léčiva np., závod 03 v Modřanech, byla výroba DDAVP skončena v r. 1989. V období 1976 až 1989 nevyvolal DDAVP v ČR žádnou zvláštní pozornost. Jeho roční produkce nepřesáhla několik set gramů. V r. 1989–1999 vyráběla DDAVP v ČR firma Ferring-Léčiva. Rok 1999 znamená definitivní konec výroby DDAVP v ČR.

V r. 1971 byla licence na výrobu DDAVP prodána švédské firmě Ferring AB, Malmö. Tato firma věnovala DDAVP zaslouženou pozornost. Stimulovala a podporovala klinický výzkum, organizovala konference, sympo-

zia, atd. Není divu, že produkce DDAVP měla u této firmy stále rostoucí tendenci. Jeho roční výroba se v současnosti odhaduje na 30–40 kg. To je, vyjádřeno v korunách, za použití běžných cenových relací, 10,5 · 10⁹–14 · 10⁹ Kč. Což je velmi slušný výsledek na preparát typu DDAVP.

8. DDAVP v lékařské praxi. Úvodní poznámka

Tuto pasáž koncipuji poněkud šířeji tak, aby umožňovala reálné zhodnocení významu DDAVP. Funkci vasopresinů můžeme ilustrovat jednoduchým způsobem. Ledvinami proteče asi 600 ml plazmy/min. (tj. cca 864 l/24 h). Z 600 ml plazmy se vytvoří asi 120 ml min⁻¹ (tj. cca 173 l/24 h) glomerulárního filtrátu. Z tohoto množství se zhruba 90 %, tj. cca 156 l/24 h vrací do organismu pasivní rezorpcí v ledvinách. Ze zbylých asi 17 l/24 h se zase asi 90 % vrací do organismu, ale rezorpcí řízenou vasopresinem. Zbytek, cca 1,5 l/24 h, odchází z organismu jako moč. Při úplném selhání vasopresinového regulačního mechanismu odtéká z organismu renální cestou minimálně 17 l moče/24 h. Lze si snadno představit, co to znamená, uvážíme-li, že vitální kapacita močového měchýře činí 300 až 600 ml, že ztráta vody vyvolává pocit žízně a že ztrátu vody je nutné nahrazovat*. Vzniká tak velmi nepříjemný stav, který bývá – poněkud naturalisticky – popisován jako život mezi WC a vodovodním kohoutkem. Přesněji řečeno, je to stav vyznačující se polyurií a polydipsií. To jsou symptomy choroby nazývané *diabetes insipidus* (DI), český

* Relevantní údaje lze nalézt v učebnicích lékařské biochemie, fyziologie a anatomie.

Tabulka VIII

Cesta DDAVP do výroby a lékařské praxe

Příhláška patentu:	PV 5996, 15.9.1966.
Patent:	č. 132685, 15.6.1969.
Publikace:	1967 (cit. 24).
Základní farmakologický výzkum:	ÚOCHB ČSAV 1965–1966.
Podrobný farmakologický výzkum:	Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha 1966–1968. Závěrečná zpráva, Praha 1968.
Výrobní předpis:	Adiuretin SD, DDAVP. ÚOCHB ČSAV, Praha 1972.
Předklinické testy:	III. Klinika pro interní medicínu, LF UK Praha, 1966–1968 (cit. 32).
Klinické testy:	tamtéž, 1968–1972.
Rozšířené klinické testy:	tamtéž, 1972–1975.
Prodej licence:	Licence na výrobu a využití DDAVP byla prodána švédské firmě Ferring AB, Malmö, 1972.
Výroba DDAVP v ČSSR a ČR:	ÚOCHB ČSAV Praha, 1973–1975. Léčiva np. závod 03, Praha, 1976–1989. Ferring-Léčiva, Praha, 1989–1999.
Výroba lékové formy:	Ferring-Léčiva, Jesenice u Prahy, 1999–2006.
Výroba DDAVP (desmopressinu) u firmy Ferring AB, Malmö:	1972 až dosud.
Zavedení DDAVP do lékařské praxe:	V ČSSR od r. 1972, komerční název Adiuretin SD-Spofa, od r. 1999 komerční název Adiuretin [FERRING-Léčiva].
Objem výroby:	V ČSSR a ČR nepřekročil množství několika set g rok ⁻¹ . Objem výroby DDAVP (desmopressinu) u firmy Ferring AB se odhaduje na 30–40 kg rok ⁻¹ .

úplavice žíznivá, lidově žíznivka. Pro orientační informaci viz např.³³. Polyurie je ovšem různá, podle stupně rozvoje choroby. Za polyurii se považuje stav, kdy je množství vyloučené moče vyšší než 3–4 l/24 h. Pro informaci: z 59 pacientů sledovaných na III. Interní klinice Fakultní nemocnice UK v Praze během testování DDAVP, mělo 30 pacientů (51 %) diurézu 4–10 l/24 h a 29 pacientů (49 %) diurézu 10–20 l/24 h a vyšší. Z toho 6 pacientů mělo diurézu vyšší než 20 l/24 h.

Sekrece vasopresinu není v průběhu dne konstantní. V nočních hodinách je vyšší než ve dne. V nočních hodinách se proto tvoří menší množství moče, což je z fyziologického hlediska důležité. Pokud je cirkadiánní rytmus sekrece vasopresinu porušen, tj. když se v nočních hodinách uvolňuje do krevního řečiště méně vasopresinu, tvoří se větší množství moče, které pak přesahuje vitální kapacitu močového měchýře a vznikají tak podmínky pro velmi nepříjemnou chorobu, pro noční pomočování dětí (*enuresis nocturna*, EN), která ale postihuje i asi 1 % dospělé populace. Jak DI tak EN jsou choroby, které neohrožují přímo život pacienta, ale způsobují mu vážné psycho-

logicko-sociální problémy (k EN viz např.^{34–36}).

8.1. Terapie diabetes insipidus

DI není naštěstí příliš časté onemocnění. Podle starších údajů připadá 15–16 nemocných na 100 000 obyvatel. Nyní jsou tato čísla podstatně vyšší, díky rostoucímu počtu dopravních nehod nezřídka spojených s poraněním hlavy a poškozením hypotalamo-neurohypofyzární oblasti. Hlavní způsob léčby DI spočívá, podobně jako u *diabetes mellitus* (úplavice cukrová), v substituční terapii, tj. do organismu dodáváme chybějící hormon. Až do zavedení DDAVP, používaly se k tomuto účelu preparáty založené na LVP a AVP nebo na směsi obou hormonů. Všechny tyto preparáty měly řadu nevýhod. Především nízký a krátkodobý účinek (2–3 h u LVP a 4–6 h u AVP) a vedlejší účinky, vysoký účinek na krevní tlak a reziduální účinky oxytocinové. Vysoký presorický účinek AVP a LVP je nebezpečný pro pacienty s refrakterním kardiovaskulárním systémem a prakticky znemožňuje potřebné zvyšování terapeutických dávek. Podobně je tomu u reziduálních

účinků oxytocinových, které jsou nebezpečné pro těhotné ženy. Problém substituční terapie DI vyřešil teprve DDAVP. 1–2 kapky vodného roztoku DDAVP obsahujícího 0,1–0,2 mg DDAVP v 1 ml roztoku normalizují polyurii a polydipsii u většiny pacientů po dobu 12–24 h. DDAVP má jen nepatrný presorický účinek a velmi snížené reziduální účinky oxytocinové. Lze jej tedy aplikovat i u pacientů s oběhovými poruchami a u těhotných žen. U preparátů DDAVP nedochází také k postupné ztrátě účinnosti, která se vyskytuje u preparátů obsahujících LVP a AVP. DDAVP terapie DI je velmi účinná. Ještě dnes, po více než 30 letech DDAVP terapie DI, je DDAVP v této oblasti stále považován za preparát první volby. Je možné namítnout, že počet pacientů trpících DI je nízký. To je pravda z regionálního hlediska, ale ne z hlediska globálního. A současný svět se rychle globalizuje. Pak máme co dělat s počty pacientů zajímavých nejen z humánního, ale také z komerčního hlediska. Vedle vodného roztoku DDAVP jsou dnes na trhu k dispozici i preparáty pro použití *per os*.

8.2. Terapie enuresis nocturna

EN lze definovat jako samovolné pomočování dětí starších 5 let, s frekvencí 1–3× týdně. Příčina EN zůstávala dlouho v oblasti dohadů a spekulací. S oblibou bývala spojována s různými psychosomatickými faktory. Dětské enuretické končily často v psychiatrických léčebnách, kde jim byla aplikována různá, i toxická psychofarmaka, např. tricyklická antidepresiva, což nebyl zrovna nejšetrnější přístup. Není bez zajímavosti, že teprve pozitivní výsledky DDAVP terapie^{37–40} EN obnovily zájem o velikost noční produkce moče u enuretiků⁴¹ a o cirkadiánní rytmus vylučování vasopresinu. Tak původně symptomatická DDAVP terapie EN byla vlastně kauzální terapií a přispěla k objasnění příčiny EN. Podobně jako u DI je v současné době DDAVP považován za lék první volby i u EN. Velmi úspěšná je DDAVP terapie EN v akutních případech, jako jsou výlety, zájezdy, krátkodobé pobyty, ap. Při krátkodobé aplikaci (kratší než 3 měsíce) však dochází k recidivám choroby³⁴. Tomu lze zabránit dlouhodobou (více než 8 měsíční) kontrolovanou léčbou⁴⁴. Doporučuje se rovněž kombinace DDAVP terapie se zvukovou signalizací³⁴. DDAVP terapie EN má dva aspekty. Kromě, v podstatě substituční terapie zaměřené na snížení produkce moče v nočních hodinách, jde o vytvoření a fixaci podmíněného „antidiuretického reflexu“. V tomto případě se patrně uplatňuje i pozitivní vliv DDAVP na paměť.

8.3. Test na maximální koncentrační kapacitu ledvin

Používá se při diagnostice ledvinových chorob. Fyziologicky nejpřirozenější je postup založený na žíznění. Pacient nepřijímá tekutiny a sleduje se množství a koncentrace (osmolalita) vylučované moče. Test je dlouhodobý (14–36 h) a pro pacienty nepříjemný a náročný. Problema-

tický je u malých dětí. U batolat a kojenců je prakticky neproveditelný. Dobu testu se podařilo zkrátit aplikací pitressin tannátu⁴⁵ (suspenze tannátu vasopresinu v podzemnicovém oleji). Olejové injekce však byly velmi nepříjemné. Komplikujícím faktorem byl rovněž vysoký BP preparátu. Tyto problémy byly odstraněny náhradou Pitressin tannátu DDAVP. Test založený na použití DDAVP byl zaveden v pediatrii^{46–48}. Byl standardizován a kvantifikován Jandou a spol.⁴⁹ a jeho aplikační možnost byla rozšířena i na batolata a kojence. V těchto případech je nutno provádět test za pečlivé kontroly. Předávkování může vést k vážným komplikacím (intoxikace vodou). V současné době lze DDAVP test použít ve všech věkových kategoriích pacientů^{46–51} a je považován za nejlepší metodu pro stanovení maximální koncentrační kapacity ledvin⁵².

8.4. Terapie hemofilie A a von Willebrandova syndromu

Hemofilie je vážné, především dědičné, ale také získané onemocnění, způsobené poruchami srážlivosti krve. Srážlivost krve je složitý, mnohastupňový proces, na němž se podílí řada faktorů. U klasické hemofilie A chybí v krvi pacienta faktor VIII (antihemofilní globulin), u hemofilie B faktor IX (Christmas factor), u von Willebrandovy choroby faktor von Willebrandův (vWF), který hraje klíčovou roli při adhezi krevních destiček k subendotelové pojivové tkáni. Mírné formy hemofilie se vyskytují mnohem častěji než těžké formy.

Bylo známo, že intravenózní aplikace vasopresinů, pitressinu a AVP, zvyšuje aktivitu aktivátoru plasminogenu^{53–55} a tak ovlivňuje krvácivost. Toto působení se přisuzovalo jednak vasokonstrikčnímu účinku vasopresinů, jednak jejich nespecifickému působení, především schopnosti vyvolávat silnou abdominální bolest. Bylo proto dosti překvapivé, když se ukázalo, že DDAVP, který má jen nepatrný vasokonstrikční účinek a nevyvolává abdominální bolesti, výrazně ovlivňuje aktivátor plasminogenu, faktor VIII a von Willebrandův faktor vWF (cit.⁵⁶). Tento poznatek otevřel pro DDAVP cestu do oblasti terapie krvácivosti⁵⁷.

Standardní způsob terapie hemofilie A, před vstupem DDAVP do této oblasti, spočíval v aplikaci plazmatických koncentrátů faktoru VIII a kryoprecipitátů. Tento postup je nákladný a rizikový. Pacientovi při něm hrozí nebezpečí infekce takovými chorobami, jako jsou hepatitida B a C a AIDS. Riziko přenosu těchto virálních onemocnění se sice postupně snižuje, ale stále zůstává. Kromě toho, další problém aplikace koncentrátů faktoru VIII a kryoprecipitátů, spočívá v omezených zdrojích plazmy, v nízkých výměřích při přípravě obou preparátů a v jejich nákladnosti. Využití DDAVP v oblasti krvácivosti byla proto věnována značná pozornost. Souborné základní informace lze nalézt např. ve Sborníku pracovní sekce (workshop) věnované použití desmopressinu (DDAVP) při poruchách krvácivosti²⁸. V současné době se DDAVP doporučuje pro terapii mírných forem hemofilie A a typu 1 von Willebrandova

syndromu. DDAVP terapie je méně nákladná ve srovnání s používáním koncentrátů faktoru VIII a kryoprecipitátů a pacienti nejsou vystaveni riziku infekce. DDAVP lze použít nejen k terapii, ale také k přípravě koncentrátů faktoru VIII a kryoprecipitátů. Spotřeba výchozí plazmy se v tomto případě snižuje zhruba o 1/2 (cit.²⁸, str. 227).

8.5. DDAVP při uremiích

Ke krvácivosti dochází i při akutním i chronickém selhání funkce ledvin. Krvácivost komplikuje řadu lékařských ošetření a vyšetření nemocných, jako jsou chirurgické zásahy, trháni zubů, biopsie ap. Má značný podíl na celkové úmrtnosti mezi uremickými pacienty. Příčina krvácivosti u uremiků je komplexní povahy. Etiologie choroby není dosud dostatečně známa.

K částečnému zlepšení poruch hemostázy dochází po dialyzách^{58,59}, které jsou součástí celkové terapie uremiků, ale neodstraňuje se tak nebezpečí krvácivosti. Pozitivní efekt mají transfuze červených krvinek^{60,61} a podávání erythropoietinu⁶². Velmi dobré výsledky byly získány při aplikaci kryoprecipitátů⁶³, které obsahují velké množství vyšemolekulárních von Willebrandových multimerů. Nevýhodou tohoto postupu je obtížná reprodukovatelnost výsledků a nebezpečí přenosu hepatitidy B a C a AIDS na pacienta. DDAVP nemá tyto nevýhody^{64,65} a je účinný i v případech, kdy kryoprecipitáty selhávají. Ve srovnání s nimi je tedy DDAVP výhodnější. Nevýhodou DDAVP je relativně krátkodobý účinek a pokles účinnosti při opakovaném podávání⁶⁶. Jako nejvýhodnější se dosud jeví aplikace konjugátů estrogenů⁶⁷. Účinek nasazuje sice až po několika hodinách, ale je dlouhodobý, trvá až 14 dnů. DDAVP je vhodný pro zvládnutí akutních stavů, konjugátů estrogenů pro dlouhodobou terapii.

8.6. DDAVP v chirurgii

Při rozsáhlých, nicméně poměrně často prováděných chirurgických zásazích, jako jsou srdeční operace (bypass) a náhrady kyčelního kloubu (totální endoprotéza), dochází ke značné ztrátě krve. Bylo logické pokusit se využít v těchto případech hemostatických účinků DDAVP. Výsledky této aplikace se očekávaly se značným optimismem. Klinická realita byla střídavější (cit.²⁸, str. 177, 191, 203). V případech, kdy zmíněné chirurgické zásahy probíhaly bez komplikací, premedikace pacienta DDAVP nesnížila ztrátu krve, v řadě případů ji dokonce zvýšila. Jinak tomu bylo u operací srdce s komplikovaným průběhem, kdy byl pacient např. delší dobu zapojen na mimotělní oběh. U těchto případů docházelo k významnému snížení ztráty krve. U diskutovaných rozsáhlých chirurgických zásahů nelze používat DDAVP paušálně, nýbrž je nutné pečlivě volit jeho aplikaci případ od případu. V tomto kontextu zasluhuje zmínky, že antidiuretický účinek vysokých dávek DDAVP, které se používaly při rozsáhlých chirurgických zásazích, se prakticky neprojevoval a nevyvolával komplikace.

8.7. Další aplikace DDAVP

Kromě lékařské praxe a klinické diagnostiky, zmíněné v předchozím, využívá se DDAVP jako standard ve farmakologii a jako selektivní agonista při výzkumu vasopresinových receptorů. Nesporně velmi zajímavé a atraktivní jsou neurotropní a psychotropní účinky DDAVP. Ten, podobně jako LVP, AVP, OT a některé jejich analogy, aktivuje prvky učení a paměti. DDAVP má zřejmě pozitivní vliv na posttraumatickou amnézii a retrogradní amnézii při elektrošokové terapii. Mohl by se také uplatnit při odvykací terapii alkoholismu a při terapii Korsakovova syndromu. V oblastech, zmíněných v předchozím, však DDAVP soustavněji užíván nebyl. Touto problematikou se proto zde nebudeme zabývat.

9. Inovace DDAVP

Historie DDAVP by nebyla úplná bez zmínky o jejím pokračování. V polovině 80. let (20. století) vyslovila tehdejší SPOFA zájem o inovaci DDAVP. To bylo v té době něco tak neobvyklého, a tak nás to příjemně překvapilo, že jsme se rozhodli projevenému zájmu vyhovět, i když se již tehdy těžiště našeho zájmu přesouvalo do jiné oblasti (imunologie). Při této příležitosti jsme obrátili pozornost na druhý konec vasopresinové molekuly, na její *N*-konec, který obsahuje druhou klíčovou polohu, polohu 3. Výsledky orientačních pokusů, které jsme v této poloze uskutečnili, nebyly bez zajímavosti, ale nebyly v souladu s naším záměrem. Pozornost jsme proto přesunuli k sousední poloze, k poloze 2, interakci (stacking) svázané s polohou 3. Změnu konfigurace v této poloze uskutečnil již V. Hruby a spol.⁶⁸. Podle nich má [D-Tyr²]AVP značný AD a BP, přičemž oba účinky jsou v poměru zhruba 1:1. V našich rukách však [D-Tyr²]AVP (I) vykazoval značně vysoký a značně specifický^{4,69} AD (tab. IX, cit.⁴). Tento poznatek se stal východiskem pro naši další práci. Abychom získali základní informaci, zda lze získat kombinaci 2-D-Tyr substituce s dalšími strukturálními změnami látky požadovaných vlastností, připravili jsme [Mpr¹, D-Tyr²]AVP (II) (cit.⁴). Když jsme získali pozitivní výsledek, (tab. IX), připravili jsme 5 analogů DDAVP: [D-Tyr²]DDAVP (III), [D-Tyr², Abu⁴]DDAVP (IV) a carbaanalogy [Car¹, D-Tyr²]DDAVP (V), [Car¹, D-Tyr², Val⁴]DDAVP (VI) a [Car⁶, D-Tyr²]DDAVP (VII) (cit.⁶⁹) (tab. IX). Analog III má zřetelně vyšší AD než DDAVP, více než o řád nižší BP a má nízký, ale dobře patrný inhibiční účinek na UT. Analogy IV–VII představují nový typ vasopresinových analogů. Mají vysoký (IV, VII) až mimořádně vysoký a zcela specifický AD (V, VI). Působí dokonce jako slabé, ale zcela zřetelné kompetitivní inhibitory BP a UT. Nejméně 2 z uvedených analogů (V, VI) přicházely v úvahu jako nástupci DDAVP, především v preparátech pro použití *per os*. Ve srovnání s DDAVP mají až o řád vyšší a zcela specifický AD. Jejich relativně nízké inhibiční účinky proti BP a UT by se neměly v praxi negativně projevit. Do lékařské praxe se však tyto nesporně perspek-

Tabulka IX

Aktivity vasopresinových analogů obsahujících aminokyseliny konfigurace D v poloze 2 a v polohách 2 a 8

Sloučenina	AD	BP	UT	AD/BP	Lit.
I. [D-Tyr ²]AVP	207±10 10% ^a	194±11 39,5	1,53±0,09 0,01	1,1 126	68 4,69
II. [Mpr ¹ , D-Tyr ²]AVP	100% ^a	483	0,045	104	4,69
III. [D-Tyr ²]DDAVP	120–150% ^a	0,1	inh.	7,1·10 ⁵	4,69
IV. [D-Tyr ² , Abu ⁴]DDAVP	40–60% ^a	inh.	inh.	–	4,69
V. [Car ¹ , D-Tyr ²]DDAVP ^b	790% ^a	pA ₂ 7,2	pA ₂ 7,5	–	69
VI. [Car ¹ , D-Tyr ² , Val ⁴]DDAVP	1000% ^a	pA ₂ 6,8	pA ₂ 7,9	–	69
VII. [Car ⁶ , D-Tyr ²]DDAVP	100–200% ^a	pA ₂ 6,8	pA ₂ 7,8	–	69

^a % účinku DDAVP, ^b Car = Carba

tivní látky bohužel nedostaly.

10. Závěr

V lékařské praxi se využívá především homeostatických a hemostatických účinků DDAVP. DDAVP poprvé úspěšně vyřešil starý problém, substituční terapii *diabetes insipidus centralis*. I dnes, po více než 30 letech od zavedení DDAVP do této oblasti, je zde DDAVP stále považován za lék první volby. Podobně je tomu u terapie *enuresis nocturna*, kde se DDAVP velmi dobře osvědčil, zvláště při zvládání akutních situací. Dobré výsledky byly získány i při dlouhodobé léčbě, zaměřené na snížení výskytu recidiv. Léčebný význam DDAVP v oblasti hemofilii dobře vystihuje výrok Světové federace pro hemofilii, který označil desmopressin (DDAVP) za první, oficiálně doporučený preparát pro terapii mírných forem hemofilie A a von Willebrandova syndromu. DDAVP se osvědčil také při léčbě krvácivosti při uremiích. U rozsáhlých chirurgických zásahů (bypass, totální endoprotéza) s komplikovaným průběhem, DDAVP výrazně snižuje ztrátu krve. V klinické diagnostice DDAVP slouží jako pomůcka k rozlišení typu onemocnění. Zavedení DDAVP do testu pro stanovení maximální koncentrační kapacity ledvin umožnilo zrychlení a zjednodušení testu, takže jej lze použít i u dětí nejútlejšího věku. Ve farmakologii se DDAVP používá jako standard, jako selektivní agonista se využívá při výzkumu vasopresinových receptorů, atd. Pod heslem desmopressin (DDAVP) obsahuje odborná literatura přes 3000 citací. Desmopressin (DDAVP) byl řazen mezi 15 nejvýznamnějších vyráběných léků. A to plným právem.

Použité zkratky

V textu jsou použité obvyklé třípísmenné zkratky aminokyselin. Další zkratky:

Mpr	kyselina 3-merkaptopropionová
Dap	kyselina 2,3-diaminopropionová
Dab	kyselina 2,4-diaminomásečná
DapG	kyselina 2-amino-3-guanidinopropionová
Nar	norarginin
Har	homoarginin
Hly	homolysin
Tly	thialysin, thiozin, S-(2-aminoethyl)cystein
Car ^x	náhrada jednoho atomu S disulfidového můstku methylenovou skupinou, v poloze vyznačené indexem
VP	vasopresin
AVP	arginin vasopresin
LVP	lysin vasopresin
OT	oxytocin
AD	antidiuretický účinek
BP	presorický účinek
UT	uterotonický účinek
DI	diabetes insipidus
EN	enuresis nocturna

Pokud není uvedeno jinak, jsou aminokyseliny konfigurace L. All-L vasopresinové analogy jsou považovány za členy L-řad, ty, které obsahují v poloze 8 aminokyselinu konfigurace D, za členy D-řad. Údaje biologických účinků jsou vyjádřeny v mezinárodních jednotkách (IU mg⁻¹), případně jsou vztaženy k aktivitě DDAVP jako standardu.

LITERATURA

1. Zaoral M.: *Doktorská dizertace*, str. 9. Ústav organické chemie a biochemie ČSAV, Praha 1968.
2. Zaoral M.: *Vesmír* 51, 100 (1970).
3. Zaoral M.: *Adiuretin. Závěrečná zpráva*, ÚOCHB ČSAV, Praha 1972.
4. Zaoral M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 561 (1985).
5. Zaoral M. v: *Vztahy mezi strukturou látek a jejich biologickou účinností*. Edice Macro, řada N-

- Monografie, sv. N-13, cyklus Organická chemie sv. 12 (Bláha K., Tichý M., ed.) str. 143. Ústav organické chemie a biochemie ČSAV a Ústav makromolekulární chemie ČSAV, Praha 1985.
6. Zaoral M.: *Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products*, 4th Int. Conf., str. 1, Budapest 1987.
 7. Zaoral M.: *Česko-Slovenská Pediatrie* 53, 506 (1998).
 8. Zaoral M.: *PEPTIDES 2004, Proceedings of the Third International and Twenty-Eight European Peptide Symposium, Prague 5 – 10 September* (Flegel M., Fridkin M., Gilon Ch., Slaninová J., ed.), str. 113. Kenes International, Geneva 2005.
 9. Schwartz I. L., Livingston L. M.: *Vitamins and Hormones* 22, 261 (1964).
 10. Walter R., Rudinger J., Schwartz I. L.: *Symposium on Antidiuretic Hormones*. *Am. J. Med.* 42, 653 (1967).
 11. Hruby V. J., Smith C. W., v: *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology* (Smith C. W., ed.), sv. 8, str. 77. Academic Press, New York 1987.
 12. Boissonnas R. A., Guttman S., Jaquenoud P. A., Waller J. P.: *Helv. Chim. Acta* 39, 1421 (1956).
 13. Katsoyannis P. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 109 (1957).
 14. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 21, 770 (1956).
 15. Schneider C. H., du Vigneaud V.: *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3005 (1962).
 16. Hermann P., Stalla K., Zaoral M.: *PEPTIDES 1964, Proceedings of the 7th European Peptide Symposium, Budapest* (Bruckner V., Medzihradszky K., ed.), str. 219. Akadémiai Nyomda, Budapest 1965.
 17. Hermann P., Zaoral M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2817 (1965).
 18. Zaoral M., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 611 (1965).
 19. Zaoral M., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31, 310 (1966).
 20. Zaoral M., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31, 90 (1966).
 21. Zaoral M., Jošt K., Šorm F., Rudinger J.: *Symposium on the Structure, Biogenesis and Synthesis of Biologically Important Oligopeptides. XVIIth Internat. Congress of Pure and Applied Chemistry*, Munich 1959.
 22. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31, 382 (1966).
 23. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 1242 (1967).
 24. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 1250 (1967).
 25. Sawyer W. H.: *Endocrinology* 63, 694 (1958).
 26. Pliška V., Rychlík I.: *Acta Endocrinol.* 54, 129 (1967).
 27. Vávra I., Machová A., Krejčí J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 241 (1974).
 28. Grant P. J., v: *Desmopressin in Bleeding Disorders* (Mariani G., Mannucci P. M., Cattaneo M., ed.). NATO ASI Series, Vol. 242, str. 2. Plenum Press, New York 1993.
 29. Hamsík A., Šantavý F.: *Biochemie*, str. 602. Stát. zdrav. nakl., Praha 1962.
 30. Burn J. H., Finney D. J., Goodwin L. C.: *Biological Standardization*, 2. vyd., str. 187. Oxford University Press, Oxford 1950.
 31. Vávra I., Machová A.: *Farmakologie desamino-D-arginin vasopresinu. Závěrečná zpráva*. Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha 1967.
 32. Vávra I., Machová A., Holeček V., Cort J. H., Zaoral M., Šorm F.: *Lancet* 1 1968, 948.
 33. Schück O.: *Poruchy metabolismu vody a elektrolytů v klinické praxi*, str. 53. GRADA, Praha 2000.
 34. Kovács L.: *Detský lékař* 1, 154 (1994).
 35. Kolektiv autorů.: *Česko-Slovenská Pediatrie* 50, (3), 1 (1995).
 36. *Poruchy močení u dětí* (Kovács L., Valanský L., ed.). Osveta, Martin 2001.
 37. Lichardus B., Némethová V., Lehotská V.: *Sov. Med.* 1976(10), 106.
 38. Dimson S. B.: *Lancet* 1 1977, 1260.
 39. Birkášová M., Birkáš O., Flynn M. J., Cort J. H.: *Pediatrics* 62, 970 (1978).
 40. Aladjem M., Wohl R., Boichis H., Orda S., Lotan D., Freeman S.: *Arch. Dis. Child.* 57, 137 (1982).
 41. Poulton E. M.: *Lancet* 2 1952, 906.
 42. Norgaard J. P., Pedersen E. B., Djurhuus J. C.: *J. Urol.* 134, 1029 (1985).
 43. Rittig S., Knudsen U. B., Norgaard J. P., Pedersen E. B., Djurhuus J. C.: *Am. J. Physiol.* 25, 664 (1989).
 44. Lehotská V., Lichardus B., Némethová V.: *Bratislav. Lek. Listy* 72, 670 (1979).
 45. Jones R. V. H., Wardener H. E.: *Brit. Med. J.* 1956, 271.
 46. Aronson A. S., Svenningsen N. W.: *Arch. Dis. Child.* 49, 654 (1974).
 47. Némethová V., Lichardus B., Lehotská V.: *Monatschr. Kinderheil.* 125, 165 (1977).
 48. Helin I.: *J. Urol.* 127, 78 (1982).
 49. Janda J., Marek V., Reitspiesová K., Šikut M., Korous J.: *Česko-Slovenská Pediatrie* 37, 285 (1982).
 50. Nádvorníková H., Schück O., Cort J. H.: *Clin. Nephrol.* 14, 142 (1980).
 51. Delin K., Aurell M.: *J. Urol. Nephrol.* 20, 143 (1986).
 52. Andersson K.-E., Bengtsson B., Paulsen O.: *Drugs of Today* 24, 509 (1988).
 53. Schweck S. A., von Kaulla K. N.: *Neurology* 21, 959 (1961).
 54. Mannucci P. M., Barbi G. L.: *Eur. Clin. Invest.* 3, 253 (1973).
 55. Cash J. D., Bader A. M. A., Da Costa J.: *Brit. J. Haematol.* 27, 363 (1974).
 56. Mannucci P. M., Aberg M., Nilsson I. M., Robertson B.: *Br. J. Haematol.* 30, 81 (1975).
 57. Mannucci P. M.: *Blood* 72, 1449 (1988).
 58. Castaldi P. A., Rozenberg M. C., Stewart J. H.: *Lancet* 2 1968, 66.
 59. Remuzzi G., Livio M., Marchiaro G., Mecca G., de Gaetano G.: *Nephron* 22, 347 (1978).

60. Livio M., Marchesi D., Remuzzi G., Gotti E., Mecca G., de Gaetano G.: *Lancet* 2 1982, 1013.
61. Fernandez F., Goudable C., Sic P.: *Br. J. Haematol.* 59, 139 (1985).
62. Moia M., Mannucci P. M., Vizzotto L., Casatis S., Cattaneo M., Ponticelli C.: *Lancet* 2 1987, 1227.
63. Jason P. A., Jubelier S. J., Weinstein M. J., Deykin O.: *N. Engl. J. Med.* 303, 1318 (1980).
64. Mannucci P. M., Remuzzi G., Pusineri F., Lombardi R., Valsecchi C., Mecca G., Zimmermann T. S.: *New Engl. J. Med.* 308, 8 (1983).
65. Vigano G., Mannucci P. M., Lattuada A., Harris A., Remuzzi G.: *Am. J. Haematol.* 32, 31 (1989).
66. Canavese C., Salomone M., Pacitti A., Magiarotti G., Calitri V.: *Lancet* 1 1985, 867.
67. Livio M., Mannucci P. M., Vigano G., Mingardi G., Lombardi R., Mecca G., Remuzzi G.: *New Engl. J. Med.* 315, 731 (1986).
68. Hruby V., Yamamoto D. M., Smith C. W., Walter R.: *J. Am. Chem. Soc.* 101, 2717 (1979).
69. Zaoral M., Bláha I., Lebl M., Barth T.: *PEPTIDES 1986, Proceedings of the 19th European Peptide Symposium, Porto Carras Chalkidiki, Greece, August 31 – September 5* (Theodoropoulos D., ed.), str. 465. Walter de Gruyter, Berlin – New York 1987.

M. Zaoral (1949–1989 *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, 166 10 Praha 6, Flemingovo nám. 2. Present address: Na Loukotě 12, 160 00 Praha 6*): **DDAVP – 40 Years of the First Superactive Vasopressin. Discovery and Contemporary Importance**

The change of configuration of the basic amino acid in position 8 of the vasopressin molecule (8-D-substitution) impressively shifts the ratio of antidiuretic/

pressor activity in favor of the first one. Vasopressin analogues are thus formed possessing strongly increased specificity of AD. A number of structural parameters of the amino acid side chain in position 8, such as its size, shape, space location and the presence of even and odd numbers of C atoms in it, exert influence on the magnitude and specificity of AD. The combination of 8-D-substitution with additional structural changes yields vasopressin analogues with very high and highly specific AD – even analogues with extremely high and entirely pure AD. One of such compounds [Mpr¹,D-Arg⁸]VP (known worldwide under the commercial name Desmopressin and abbreviation DDAVP) proved useful in medical practice. Both homeostatic and hemostatic properties of DDAVP are exploited. DDAVP satisfactorily solved the old problem of substitution therapy of diabetes insipidus centralis for the first time. For over 30 years it has been considered the drug of first choice in this field. For nearly quarter of a century DDAVP has also been successfully used as the drug of first choice for the treatment of enuresis nocturna in children as well as in adult patients. Hemostatic properties of DDAVP are employed for the therapy of bleeding disorders. The World Organization for Hemophilia declared Desmopressin the first recommended drug for the treatment of milder forms of hemophilia A and von Willebrand's disease. DDAVP corrects bleeding in uremic patients and prevents excessive blood loss in complicated, extensive surgeries. In clinical diagnostics DDAVP helps to differentiate between the types of diabetes insipidus. The frequently performed test on the maximum concentrating capacity of the kidney, based on DDAVP, is considered the best for the purpose. As a selective vasopressin agonist, DDAVP is often used in studies on vasopressin receptors. In pharmacology DDAVP serves as a standard, etc. The key words DDAVP and Desmopressin cover thousands of citations. DDAVP has been included among the 15 most important drugs so far produced.

GC-MS ANALÝZY PŘÍRODNÝCH
BANÁNOVÝCH ARÓMLUKÁŠ GREMEŇ^a, PETRA MORAVČÍKOVÁ^a
a PETER FODRAN^b

^a Ústav biochémie výživy a ochrany zdravia, Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b FLOP, Gercenova 33, 851 01 Bratislava
moravcikova.p@gmail.com

Došlo 15.2.06, prepracované 24.4.07, prijaté 15.6.07.

Kľúčové slová: GC/MS, banánová aróma, prírodná aróma

Úvod

Analýzam prírodnej banánovej arómy bola a stále je venovaná mimoriadna pozornosť, najmä z dôvodov výroby kvalitných potravinárskych aróm. Kvalita prvých analýz od roku 1905 (cit.¹) do roku 1961 (cit.²) bola výrazne limitovaná možnosťami klasických techník organickej chémie. Prvé chromatografické analýzy výrazne rozšírili rozsah poznatkov o zložení banánových aróm³. Ďalším veľkým pokrokom pri analýze prírodných materiálov bola kombinácia plynovej chromatografie s hmotnostnou spektroskopiou⁴. Aj napriek týmto nesporným pokrokom v analýze banánových prírodných aróm sa ani zďaleka nedá povedať, že sú známe všetky komponenty, najmä minoritné a subminoritné, s mimoriadne vysokou senzoricou výdatnosťou. V oblasti analýz stopových komponentov banánovej arómy je veľmi zaujímavá práca Bergera a spol.⁵, ktorí analyzovali celý súbor subminoritných látok v banánovej aróme, v koncentráciách 5–40 µg / 100 g. V súčasnosti sa na analýzu banánových aróm používajú rôzne metódy. Základ je vždy plynová chromatografia, pričom sa nevylučuje okrem detekcie jednotlivých obsahových zložiek hmotnostnou spektroskopiou aj napríklad „sniffing metóda“ (olfaktorická, teda senzorická metóda), kde ako detektor je analytik, ktorý senzoricke hodnotí jednotlivé frakcie opúšťajúce kolónu, i napriek výraznej subjektivite pri vyhodnocovaní záznamu⁶. Čo sa týka analyzovanej zmesi ide väčšinou o extrakty z ovocia, sporadicky sa využíva „head space“ metóda, kde sa analyzuje súbor zložiek ovocia odprchávaných z analyzovaného materiálu a unášaných hnacím plynom, ktorá však nedáva reprezentatívne výsledky⁷, vzhľadom k veľkému rozptylu medzi výsledkami analýz dosiahnutými „head space“ metódou a inými metódami izolácie prchavých zložiek.

Najdôležitejším faktorom pri analýze banánovej prírodnej arómy je úprava ovocia. Banán je z hľadiska sen-

zorických vlastností ovocím mimoriadne háklivým. Nie je jedno, v akom štádiu dozrievania sa materiál extrahuje, pretože prítomný enzýmový aparát v ovoci postupne hydrolyzuje glykozidicky viazané alkoholy a najmä fenoly, takže senzoricke charakter ovocia sa mení od banánovo-zeleného až po banánovo-klinčekový, čo je dôsledok uvoľňovania fenolov eugenolového typu. Samozrejme na kvalitu prírodnej banánovej arómy výrazne vplýva vzhľadom na pôdno-klimatické podmienky proveniencie a tiež aj odroda ovocia použitého na analýzu. Z tohoto dôvodu teda výrazne kolíše kvantitatívne zloženie banánových aróm. Preto napríklad výsledky dosiahnuté Tresslom⁸, ktorý udáva pomer esterov : alkoholom : karbonylom na približne 95 : 4 : 1, sú v príkrom rozpore s niektorými ďalšími analýzami. Najväčšiu odchýlku od ostatných analýz vykazuje jednoznačne Shiotova práca⁹, ktorý ako absolútne dominantnú komponentu banánovej arómy izolovanej z filipínskych plodov identifikoval pentán-2-ón, v množstve 23,3 %, čo je raritný výsledok.

Z analýz uvedených v literatúre jednoznačne vyplýva, že pre typický charakter banánovej arómy sú dôležité najmä izoamylacetátové estery, s vhodným doplnkom „zelených“ komponentov, ako sú (Z)-3-hexenol, (E)-2-hexenal a niektoré olefinické ketóny. Tieto látky sú typické pre banánovú šupu, pre dužinu okrem už uvedených najmä substituované alylfenoly.

Experimentálna časť

Chemikálie a prístroje

Dietyléter, dichlórmetán p.a kvality (Mikrochem SR), etylalkohol jemná rafináda (SLL SR)

Destilačná kolóna 35 teoretických prepážok (Schott & Gen, Jena, BRD), plynový chromatograf HP 5890 II s detektorom MSD 5071A (oboji Hewlett-Packard, USA).

Podmienky

Pec:

Počiatková teplota 60 °C (On), začiatok detekcie 1,00 min, maximálna teplota 325 °C, rovnovážny čas 0,50 min.

Vstup:

Mód Split, počiatková teplota 250 °C (On), tlak 72,9 kPa (On), deliaci pomer 30 : 1, prietok nosného plynu deličom 36,4 ml min⁻¹, celkový prietok 40,7 ml min⁻¹, typ plynu: He.

Kolóna:

DB-Wax, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; 60 °C min⁻¹, 10 °C min⁻¹ do 250 °C, typ plynu: He, 13 psi.

MSD:

m/z 29–400 dalton, záznam celého hmotnostného spektra, 1,16 sken s⁻¹.

Použitá databáza:

NIST02.L

Úprava a spracovanie vzoriek

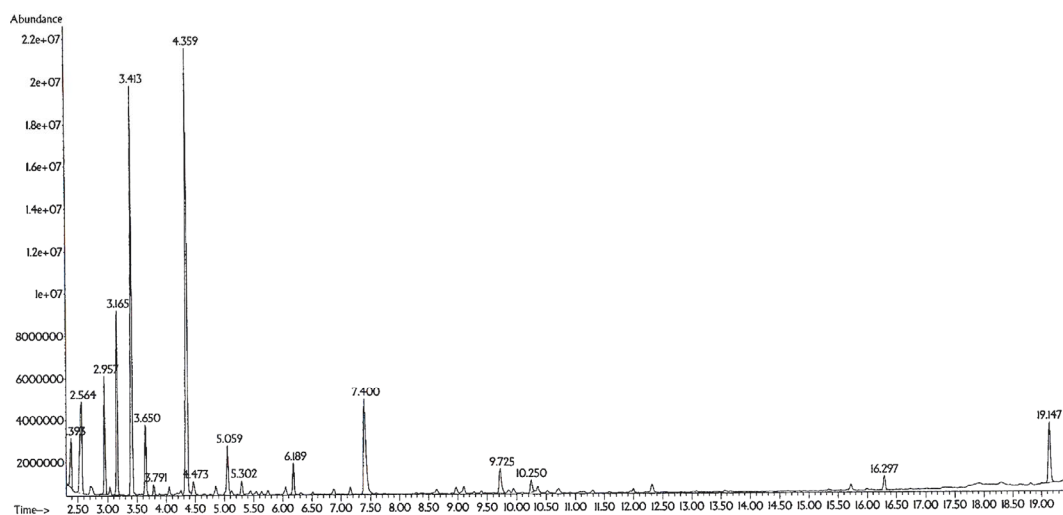
2,5 kg importovaných banánov (Guadaloupe a Martinique) sa naplätkuje na cca 3 cm veľké časti a perkoluje sa 2 × 2,5 litrami dietyléteru a následne 2 × 2,5 litrami dichlórmetánu. Každý perkolačný cyklus trvá 2 hodiny. Perkolačný roztok sa opatrne zahustí oddestilovaním rozpúšťadiel na destilačnej aparatúre opatrenej destilačnou kolónou. Koncentrované perkoláty sa spoja a zahustia na objem cca 50 ml. K destilačnému zvyšku sa pridá 10 ml etylalkoholu a destiluje sa ďalej tak, aby teplota na destilačnej hlave nepresiahla 42 °C. Takto sa oddestiluje dominantná časť rozpúšťadiel použitých na perkolačnú

aromatických zložiek banánov. Z takto vzniknutej suspenzie ochladením vypadnú vosky, ktoré sa odsajú na Büchnerovom lieviku, roztok sa mimoriadne opatrne odplyní, stanoví sa zvážením celkový výťažok, koncentrovaný perkolát sa zriedi etanolom na cca 10% koncentráciu a roztok sa podrobí GC-MS analýze.

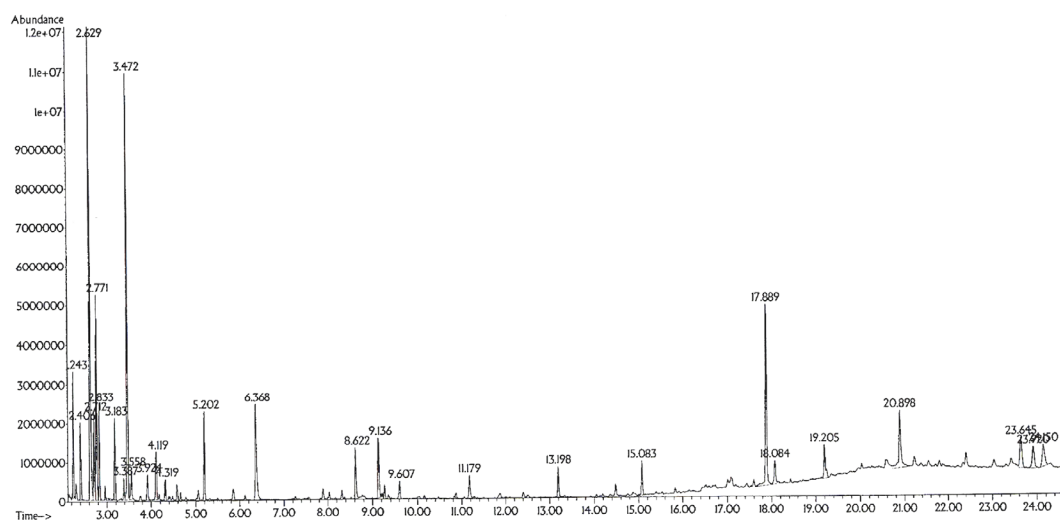
Výťažky prírodných banánových aróm v absolútnom hmotnostnom vyjadrení a v zodpovedajúcom percentuálnom vyjadrení

Import Guadaloupe: 150 mg/2,5 kg, 0,006 % (viď tabuľka I a obr. 1).

Import Martinique: 56 mg/2,5 kg, 0,00224 % (viď tabuľka II a obr. 2).



Obr. 1. GC/MS chromatogram banánového extraktu, odroda Martinique



Obr. 2. GC/MS chromatogram banánového extraktu, odroda Guadaloupe

Výsledky GC-MS analýz perkolátov dokumentujú obr. 1 a 2 a tabuľky I a II.

Diskusia a závery

Mimoriadne dôležitým faktorom pri analýze prírodných látok, najmä mnohוזložkových zmesí, ako sú napr. aj prírodné arómy, je metóda izolácie. Optimálnym riešením je extrakcia, prípadne perkolácia obsahových látok do organických rozpúšťadiel. Použitie iných metód, ako je napr. destilácia s vodnou parou vo všeobecnosti nedáva dobré, ale najmä nie reprodukovateľné výsledky. Samozrejme že aj extrakcia alebo perkolácia prírodných látok je metóda chýlostivá, kde treba vhodne voliť používané rozpúšťadlá. Obyčajne sa volí kombinácia takých rozpúšťadiel, kde je zaručený maximálny výťažok obsahových látok, pričom pri koncentrácii miscely nedochádza k strhávaniu obsahových látok rozpúšťadlom. V prípade izolácie banánových prírodných aróm sa preto pristúpilo k použitiu dietyléteru a dichlórmetánu, pričom perkolácia bola realizovaná postupne, najprv dietyléterom a následne dichlórmetánom. Táto postupnosť nebola náhodná, ale cieľená, pretože sa dá predpokladať, že dietyléter vzhľadom k svojej relatívne dobrej rozpustnosti vo vode bude

eliminovať enzýmový aparát ovocia, čo je mimoriadne dôležité najmä z hľadiska ďalšieho uvoľňovania aromatických zložiek ovocia, najmä fenolov.

Pri vyhodnocovaní analýz prírodných banánových aróm sa prišlo k viacerým prekvapujúcim zisteniam. V perkoláte z ovocia importovaného z Guadeloupe sa identifikovala zmes všetkých troch dimetylbenzénov (xylénov) v enormnom zastúpení vzhľadom na relatívne plochy pík v percentuálnom zastúpení. V tomto prípade evidentne nemôže ísť o metabolit, ale ide najskôr o penetráciu zvyšku rozpúšťadiel z ofsetovej potlače na obale. Toto zdôvodnenie sa zdá byť relevantným vzhľadom k mimoriadne nízkemu absolútnemu zastúpeniu týchto zlúčenín v perkoláte, i napriek vysokému percentuálnemu podielu v perkoláte, ktorý je pod 5 mg kg^{-1} plodov. Zaujímavý je tiež extrémne vysoký obsah organických kyselín v arómach, ktorý v takýchto objemoch nebol identifikovaný. Pritom v aróme z Martinique je suma kyseliny octovej a kyseliny maslovej viac ako 11 % a v aróme z Guadeloupe bol identifikovaný celý súbor organických kyselín, kde dve predchádzajúce sú rozšírené o kyselinu 3-metyl maslovú (izovalérovú) a kyselinu valérovú, pričom celkový obsah kyselín je zrovnateľný s predchádzajúcim prípadom. Tento fakt môže byť spôsobený rozdielnymi pôdno-klimatickými podmienkami na jednotlivých ostrovoch. Ďalšie obsahové látky nami analyzovaných banánových aróm, ako 3-metylbutyl acetát a 3-metylbutanol vcelku korešpondujú s obsahmi hodnôt týchto látok, ktoré boli namerané inými autormi. Je dosť prekvapujúci zvýšený obsah (*E*)-2-hexenalu s porovnaním s analýzami publikovanými inými autormi, čo môže byť dôsledok odlišnej izolačnej techniky. Jednoznačným prínosom našej analýzy je identifikácia 3-metyl (*E*)-4-hexén-2-ónu v perkoláte z plodov z Guadeloupe, ktorý bol vôbec prvýkrát identifikovaný v banánovej aróme a tiež vanilínu (3-metoxi-4-hydroxy benzaldehydu) a škoricového aldehydu taktiež prvýkrát identifikované ako komponenty prírodnej banánovej arómy. Všetky tri obsahové látky sú obsiahnuté v množstvách presahujúcich 1 %, teda nemôže ísť o artefakty. Všetky tri zlúčeniny boli identifikované ako súčasť perkolátu z ovocia importovaného z Guadeloupe, teda ich prítomnosť v ovoci bude spôsobená rozdielnymi pôdno-klimatickými faktormi, pretože podľa vzhľadovej analýzy ide o ten istý typ ovocia. Skutočným problémom sa zdá byť biogéniza oboch aromatických aldehydov, t.j. vanilínu a škoricového aldehydu, pretože žiaden autor neuvažuje s eventualitou existencie metabolickej cesty vedúcej k týmto zlúčeninám. Jednoznačným príkladom je Tresslova⁹ vysoko fundovaná práca. Jediným vysvetlením môže byť odlišnosť enzymatického aparátu existujúceho prakticky výlučne v ovoci pestovaného v tejto proveniencii, pretože prítomnosť potrebných prekursorov, kyseliny ferulovej pre vanilín a kyseliny škoricovej pre škoricový aldehyd bola dokázaná aj v iných typoch banánov¹⁰. Je treba venovať tiež pozornosť absencii nízkovrúcich zložiek v oboch prírodných arómach. Senzorickým vyhodnotením regenerovaných perkolačných rozpúšťadiel neboli identifikované ani stopy po karbonylo-

Tabuľka I

Zlúčeniny identifikované GC/MS analýzou, banánový extrakt, odroda Martinique. Uvedené sú retenčné časy zlúčenín (min) a relatívne plochy pík (%)

Pík	Retenčný čas [min]	Plocha [%]	Zlúčenina
1	2,392	2,83	2-pentanón
2	2,566	7,61	2-metylpropylacetát
3	2,951	4,83	1-metylpropylacetát
4	3,165	8,30	2-metyl-1-propanol
5	3,409	19,36	3-metyl-1-butyl-acetát
6	3,653	4,49	1-butanol
7	3,795	0,60	2-metylpropylbutyrát
8	4,365	26,22	3-metyl-1-butanol
9	4,479	1,09	(<i>E</i>)-2-hexenal
10	5,065	3,10	3-metylbutylbutyrát
11	5,308	0,95	3-hydroxy-2-butanón
12	6,190	2,06	1-hexanol
13	7,396	9,14	kyselina octová
14	9,723	2,15	kyselina maslová
15	10,247	0,96	kyselina 3-metyl maslová
16	16,296	1,12	1,2,3-trimetoxy-5-(2-propenyl) benzén
17	19,144	5,20	3,4-dimetoxy-1-(2-propenyl) benzén

Tabuľka II

Zlúčeniny identifikované GC/MS analýzou, banánový extrakt, odroda Guadeloupe. Uvedené sú retenčné časy zlúčenín (min) a relatívne plochy pík (%)

Pík	Retenčný čas [min]	Plocha [%]	Zlúčenina
1	2,240	3,43	2-pentyl acetát
2	2,412	2,73	2-metyl-1-propanol
3	2,624	15,49	izoamyl acetát
4	2,711	3,45	1,4-dimetylbenzén
5	2,768	7,49	1,2-dimetylbenzén
6	2,840	2,51	1-butanol
7	3,181	2,58	1,3-dimetyl benzén
8	3,380	0,62	undekán
9	3,466	15,11	3-metyl-1-butanol
10	3,552	1,13	2-hexenal
11	3,921	1,04	3-metyl-4-hexén-2-ón
12	4,120	2,21	2-metyl-3-metylbutylpropionát
13	4,318	0,84	1-metoxi-2-metyl-propán
14	5,197	2,88	1-hexanol
15	6,373	4,80	kyselina octová
16	8,625	2,40	kyselina maslová
17	9,136	2,95	kyselina 3-metyl maslová (izovalérová)
18	9,607	0,88	2-metyl-3-butén-2-ol
19	11,183	1,08	kyselina valérová
20	13,204	1,39	škoricový aldehyd
21	15,076	1,54	1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenyl)-benzén
22	17,891	8,07	2,6-dimetoxi-4-(2-propenyl)-fenol
23	18,084	1,68	vanilín (3-metoxi-4-hydroxy benzaldehyd)

vých zlúčeninách s teplotou varu pod 30 °C, prípadne nízkoprúchových esterov, tiež test s dinitrofenylhydrazónium perchlorátom bol negatívny, z čoho sa dá jednoznačne usúdiť, vzhľadom k citlivosti testu, že najmä nízkoprúchové karbonylové zlúčeniny v oboch perkolátoch chýbajú. Pri senzorickej analýze perkolátov bolo konštatované, že ide o markantný rozdiel v senzorickej kvalite aróm, pričom

prírodná banánová aróma ovocia z Guadeloupe bola vyhodnotená ako senzorickejšia, charakteristickejšia, majúca typickú príjemnú mäkkú zeleno-banánovú vôňu a chuť. Rozdiel je treba jednoznačne pripísať na vrub novo identifikovaným zložkám prírodnej banánovej arómy izolovanej z ovocia z Guadeloupe.

Autori ďakujú za podporu tejto práce prostredníctvom projektov APVV-20-005605 a VEGA/1/3579/06. Ďakujeme Ing. Emilovi Kolekovi za vykonanie GC/MS analýzy.

LITERATÚRA

1. Rothenbach F., Eberlein L.: Dtsch. Essigind. 9, 81 (1905).
2. Hultin H. O., Procter B. E.: Food Technol. 15, 440 (1961).
3. Issenberg P., Wick E. L.: J. Agric. Food Chem. 11, 3 (1963).
4. Isenberg P.: Food Technol. 23, 103 (1969).
5. Berger R. G., Drawert F., Kollmannsberger H.: Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10, 120 (1986).
6. Mayr D., Märk D., Van Ruth S. M.: Eur. Food Res. Technol. 217, 291 (2003).
7. Myers M. J., Issenberg P., Wick E. L.: J. Food Sci. 34, 504 (1969).
8. Tressl R., Drawert F., Heimann W.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 142, 249 (1970).
9. Shiota H.: J. Agric. Food Chem. 41, 2056 (1993).
10. Tressl R., Drawert F.: J. Agric. Food. Chem. 21, 560 (1973).

L. Gremeň^a, P. Moravčíková^a, and P. Fodran^b
^{(^a Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, ^b FLOP Co., Bratislava): GC-MS Analysis of Natural Banana Flavours}

Two natural banana aromas of Caribbean origin, isolated by direct percolation, were analyzed by GC/MS. In addition to high amounts of organic acids, the Guadeloupe bananas contained vanillin, cinnamaldehyde and 3-methylhex-4-en-2-one. Quite a high content of xylene, originating probably from the solvent of the packaging offset paint, is also of interest.

FIBRINOGEN

ROMAN KOTLÍN a JAN E. DYR

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, 128
20 Praha 2

kotlinr@centrum.cz

Došlo 11.10.07, přijato 5.12.07.

Klíčová slova: fibrinogen, fibrin, koagulace krve

Obsah

1. Úvod
2. Struktura fibrinogenu
3. Biosyntéza fibrinogenu
4. Degradace fibrinogenu
5. Úloha fibrinogenu v organismu
6. Závěr

1. Úvod

Jednou z nejdůležitějších molekul účastnících se koagulace krve je fibrinogen. Fibrinogenu je věnována značná pozornost odborné veřejnosti, neboť fibrinogen, fibrin, či jeho degradační produkty hrají důležitou roli v hemostáze, zánětu, agregaci krevních destiček, angiogenezi, obraně proti virovým infekcím, vasodilataci, vasokonstrikci, buněčné proliferaci, migraci buněk či procesu hojení¹. Důležitou roli hraje však i v patologii některých závažných chorob jako např. dysfibrinogenémie, hypofibrinogenémie, kardiovaskulární choroby, porucha ukládání fibrinogenu v hepatocytech (fibrinogen storage disease), trombózy, plicní embolie a jiné.

V roce 1687 M. Malpighi pozoroval strukturní bázi krevního gelu (výraz gel není úplně přesný při popisu struktury fibrinu, nejpřesněji vystihuje strukturu fibrinu výraz klot, který však nemá v češtině ekvivalent) jako bílou fibrilární látku, kterou nazývá fibrea – touto látkou byl fibrin – polymer vytvořený působením α -trombinu na fibrinogen². W. Hewson (1770) a později R. Virchow (1847) předpokládali, že se tento polymer vyskytuje jako rozkouskovaná látka v plasmě před vytvořením gelu. Existenci fibrinogenu, jakožto prekurzoru fibrinu, poprvé předpověděl v roce 1859 Deni de Commercy, který také dal fibrinogenu jeho název². V roce 1876 se podařilo O. Hammarstenovi poprvé izolovat fibrinogen z koňské plasmy³. Izolace lidského fibrinogenu se podařila až v roce 1946 E. J. Cohnovi⁴. Od té doby je fibrinogen předmětem intenziv-

ního studia. V padesátých a následujících letech byl popsán proces aktivace koagulační kaskády, fyzikální a chemické vlastnosti fibrinogenu, struktura fibrinogenu či proces jeho přeměny na fibrin. Mnoho zajímavého však stále zůstává neodkryto. V tomto článku se pokusíme shrnout dosavadní znalosti o molekule fibrinogenu – především lidského, neboť aktualizovaný přehled ohledně této molekuly v české odborné literatuře stále chybí.

2. Struktura fibrinogenu

Fibrinogen je fibrilární glykoprotein cirkulující v krvi o fyziologické koncentraci 2–4,2 g l⁻¹. Základní fyzikálně-chemické charakteristiky fibrinogenu jsou shrnuty v tab. I. Molekula fibrinogenu je protáhlá, 47,5 nm dlouhá⁵ a 5 až 6 nm široká⁵, o hmotnosti 340 kDa. Fibrinogen je sestaven ze tří párů různých polypeptidových řetězců označovaných $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ a γ (označovaného také jako γ_A)⁶. Molekula je bohatě posttranslačně modifikována, četné jsou různé polymorfismy v jednotlivých řetězcích a uplatňují se i rozličné alternativní sestřihy mRNA. Lidský fibrinogen se tedy vyskytuje v milionech neidentických molekul⁷. Nejběžnější forma $\text{A}\alpha$ řetězce je tvořena 610 aminokyselinovými zbytky⁸ a má molekulovou hmotnost 66,5 kDa, forma $\text{B}\beta$ řetězce je tvořena 461 aminokyselinovými zbytky⁸ a má molekulovou hmotnost 52 kDa, a γ řetězce je tvořena 411 aminokyselinovými zbytky⁸ a má molekulovou hmotnost 46,5 kDa. Alternativním sestřihem mRNA, nesoucí informaci o primární struktuře $\text{A}\alpha$ řetězce, vzniká $\text{A}\alpha_E$ řetězec, který nese odlišných 14 aminokyselinových zbytků na C-konci řetězce a unikátní C-terminální rozšíření o 236 aminokyselinových zbytků⁹. Je složen z 847 aminokyselinových zbytků a má molekulovou hmotnost 93 kDa. Molekula fibrinogenu sestavená ze dvou molekul isoformy

Tabulka I
Fyzikálně-chemické vlastnosti fibrinogenu

Parametr	Hodnota
Molekulová hmotnost, kDa	340
Molekulární objem, nm ³	$3,7 \cdot 10^3$
Sedimentační koeficient $S_{20,w}$, s	$7,8 \cdot 10^{-13}$
Parciální specifický objem, cm ³ g ⁻¹	0,72
Absorpční koeficient $A_{280, 1\%}$	15,1
Stupeň hydratace, g/g proteinu)	6
Zastoupení α -helixů, %	33
Isoelektrický bod	5,5

α_E má molekulovou hmotnost 420 kDa a jiné vlastnosti než běžná forma fibrinogenu. Tato forma tvoří 1 až 3 % dominantní formy lidského fibrinogenu, vyskytuje se například podkménem obratlovců, je vysoce konzervativní a nazývá se fibrinogen-420 (cit.¹⁰).

Alternativním sestřihem mRNA nesoucí informaci o primární struktuře γ řetězce vzniká γ' řetězec¹¹, který nese jiné 4 aminokyselinové zbytky na C-konci řetězce a unikátní C-terminální rozšíření o 16 aminokyselinových zbytků. Má tedy celkem 427 aminokyselinových zbytků a molekulovou hmotnost 48,2 kDa (cit.¹²). Molekula fibrinogenu sestavená z isoformy γ a γ' tvoří cca 15 % dominantní formy lidského fibrinogenu¹³. Na isoformu γ' se váže α -trombin a faktor XIII, fibrinová síť má jiné mechanické vlastnosti, je odolnější fibrinolýze a zvýšená koncentrace v krvi je rizikovým faktorem kardiovaskulárních chorob¹⁴.

Jednotlivé řetězce fibrinogenu jsou kódovány geny označovanými *FGA* ($A\alpha$ řetězec), *FGB* ($B\beta$ řetězec) a *FGG* (γ řetězec), které zaujímají přibližně 50 kb regionu chromosomu 4q31.3–4q32.1 (cit.¹⁵). Geny jsou uspořádány v pořadí *FGG*, *FGB* a *FGB*, gen *FGB* v opačné transkripční orientaci¹⁵. Gen *FGB* je sestaven z 6 exonů, gen *FGB* je sestaven z 8 exonů a gen *FGG* je sestaven z 10 exonů¹⁵. Primární struktury jednotlivých řetězců jsou homologní, což předznamenává, že mají stejného předka. Například všechny tři geny mají konzervovány dvě hranice mezi introny a exony, další je stejná pro $B\beta$ a γ řetězec. Předpokládá se, že evoluce tří různých řetězců začala zhruba před miliardou let, kdy se původní gen zduplikoval a vytvořil se $A\alpha$ gen a pre $B\beta$ - γ gen. Před 500 miliony let se pre $B\beta$ - γ gen také zduplikoval a nechal vzniknout genu pro $B\beta$ a genu pro γ řetězec⁶.

V jednotlivých genech se uplatňuje značný polymorfismus, který má za následek, že existují tisíce variant molekuly fibrinogenu lišící se pouze v jednom aminokyselinovém zbytku⁷. Nejznámějšími polymorfismy jsou *FGB* 6534 A/G, kdy alela G je rizikovým faktorem hluboké žilní trombózy¹⁶, *FGB* 455 G/A, kde alela A je opět rizikovým faktorem hluboké žilní trombózy¹⁷ či polymorfismus *FGG* 10034 C/T ovlivňující zastoupení γ' (cit.¹⁸).

Molekula fibrinogenu je bohatě posttranslačně modifikována. Fibrinogen je glykosylován na asparagylu 364 $B\beta$ řetězce¹⁹ a asparagylu 52 γ řetězce²⁰. Sacharidová část je biantennární *N*-acetylglukosaminového typu s proměnlivým zastoupením *N*-acetylneuraminové kyseliny²¹. Nejčastější je sializace jedné z antén. Sacharidová složka hraje důležitou roli v sekreci a rozpustnosti fibrinogenu a vzájemné interakci fibrinových monomerů. Vysoký stupeň sializace, který se objevuje u některých onemocnění, má za následek poruchy v polymeraci fibrinu a vzniku získané dysfibrinogenémie²².

$A\alpha$ řetězec fibrinogenu je fosforylován na serinovém zbytku²³ 3 a serinovém zbytku²⁴ 345. Fetální fibrinogen (fibrinogen novorozenců a malých dětí) je dvakrát více fosforylován na serinovém zbytku 3 než fibrinogen dospělých²⁵. Fosforylace serinového zbytku 3 ovlivňuje interak-

ci mezi α -trombinem a $A\alpha$ řetězcem (zvýšuje vazebné interakce mezi α -trombinem a $A\alpha$ řetězcem)²⁶. Neovlivňuje však rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin²⁷. Fosforylace serinového zbytku 345 pravděpodobně ovlivňuje schopnost faktoru XIIIa kovalentně prokřížovat jednotlivé molekuly fibrinu²⁸. Zjistilo se, že po chirurgickém zákroku byla zvýšena fosforylace fibrinogenu, která měla za následek vznik tlustších fibrinových vláken a citlivost na plasmin (enzym štěpící fibrinovou síť *in vivo*) se snížila o 50 % (cit.²⁹).

V γ' řetězci fibrinogenu nalézáme také dva sulfotyrosylové zbytky³⁰, a to na pozicích γ 418 a γ 422. Tyto sulfotyrosyly jsou důležité pro vysokoafinitní vazbu α -trombinu³¹.

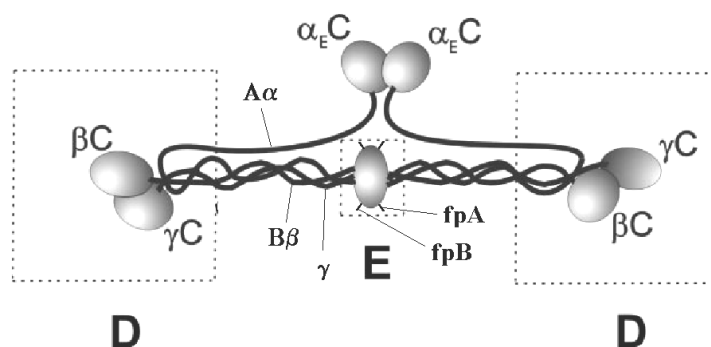
Všech šest řetězců fibrinogenu je pomocí kovalentních a nekovalentních interakcí sestaveno v jednu molekulu. V molekule fibrinogenu nalézáme tři významné globulární domény, které jsou patrné i v elektronovém mikroskopu⁵. V centrální doméně, označované jako E, je soustředěno všech šest N-koncových částí jednotlivých řetězců fibrinogenu. Nalézáme zde fibrinopeptidy A (N-koncové části $A\alpha$ řetězců, $A\alpha$ 1-16) a fibrinopeptidy B (N-koncové části $B\beta$ řetězců, $B\beta$ 1-14). Fibrinopeptidy hrají důležitou roli v procesu přeměny fibrinogenu na fibrin, neboť zabráňují samovolné polymeraci fibrinogenu. Působením serinové proteasy α -trombinu (EC 3.4.21.5) dojde k postupnému uvolnění fibrinopeptidů A a B a odkrytí polymeračního místa.

Ve dvou symetrických koncových (distálních) doménách, označovaných jako D, jsou soustředěny C-koncové části vždy tří jednotlivých řetězců fibrinogenu. D domény hrají důležitou roli v polymeraci fibrinu, při kovalentní stabilizaci fibrinu faktorem XIIIa, interakcích s dalšími proteiny, či fibrinolýze. Jsou zde soustředěny γ C (aminokyselinové zbytky γ 151-411) a β C (aminokyselinové zbytky $B\beta$ 207-461) domény, které hrají významnou roli v polymeraci fibrinu a jeho stabilizaci. Centrální doména je s koncovými doménami spojena dvojité vinutou (coiled-coil) oblastí, která je tvořena převážně α helikálními strukturami. Pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) bylo zjištěno, že dvojité vinutá struktura je schopna se částečně reverzibilně rozvinout, což molekule fibrinogenu dodává dobré mechanické vlastnosti³².

C-koncová část $A\alpha$ řetězce (aminokyselinové zbytky $A\alpha$ 221-610) tvoří globulární α C doménu, která je velice pohyblivá a v molekule fibrinogenu je směřována zpět k centrální doméně³³. Doména α C hraje důležitou roli při agregaci protofibril, ve struktuře výsledné fibrinové sítě³⁴, vazbě plasminogenu³⁵, tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA)³⁵ či fibronektinu³⁶. Schematický obrázek molekuly fibrinogenu je na obr. 1.

V molekule fibrinogenu se nachází celkem 29 disulfidových vazeb³⁷, které společně s nekovalentními interakcemi drží molekulu fibrinogenu pohromadě (tab. II).

Fibrinogen má několik vazebných míst. V molekule fibrinogenu nacházíme tři vazebná místa s vysokou afinitou pro vápenaté ionty³⁸. Jedno je lokalizováno na centrální

Obr. 1. Schematické znázornění molekuly fibrinogenu (upraveno z cit.⁸³)

Tabulka II

Mezifetěžcové a vnitrořetěžcové disulfidové vazby v molekule fibrinogenu

Vazba	Počet v molekule
Aα47-Aα47	1
Aα461-Aα491	2
Aα64-γ49	2
Aα180-γ165	2
Aα55-Bβ95	2
Aα68-Bβ106	2
Aα184-Bβ223	2
Bβ231-Bβ316	2
Bβ241-Bβ270	2
Bβ424-Bβ437	2
Bβ110-γ45	2
Bβ227-γ161	2
γ34-γ35	2
γ179-γ208	2
γ352-γ365	2

ní doméně³⁹ a dvě na distálních doménách⁴⁰ (γ311-336). Dalších 11–20 vazebných míst pro vápenaté ionty má nízkou afinitu (sem patří i sialové kyseliny cukerných částí molekuly)⁴¹. V centrální doméně nalézáme také dvě vazebná místa pro koncové domény jiných dvou molekul fibrin(ogen)u (Aα17-19) (cit.⁴²). Na koncové doméně je vazebné místo pro interakci s centrální doménou⁴³ situováno na řetězci γ374-396. Fibrinogen má dále vazebné místo s nízkou afinitou pro α-trombin⁴⁴ (Aα27-50, Bβ15-42), vazebné místo s vysokou afinitou pro α-trombin⁴⁴ se nalézá na C-konci γ řetězce (γ408-427). V molekule fibrinogenu dále nalézáme vazebné místo pro plasminogen⁴⁵ (Aα 148-160), tkáňový aktivátor plasminogenu⁴⁵ (γ312-324, A α148-160) a krevní destičky⁴⁶ (γ400-411). V molekule fibrinogenu byla také identifikována vazebná místa pro

adhezivní integriny endoteliálních a jiných buněk⁴⁷ (Aα 95-97, Aα572-574, γ400-411 – RGDS sekvence), vazebné místo pro ICAM-1⁴⁸ (γ117-133), VE-cadherin⁴⁹ (Bβ15-42) a další vazebná místa (např. pro integrin α_Mβ₂, fibronektin, inhibitor aktivátoru plasminogenu typ 1, faktor XIIIa či bakterie).

3. Biosyntéza fibrinogenu

Fibrinogen je syntetizován převážně v jaterních parenchymatických buňkách a sekretován do krevního oběhu, kde má poločas 3,36 dnů⁵⁰. V malé míře je syntetizován i v dalších tkáních, převážně během zánětu, infekce, či poranění. Proces syntézy fibrinogenu se dá rozdělit do několika po sobě jdoucích kroků.

Prvním krokem je syntéza mRNA pro jednotlivé řetězce fibrinogenu. Bylo zjištěno, že hladina jednotlivých mRNA je za normálních i zánětlivých podmínek téměř stejná⁵¹. Promotory jednotlivých genů nejsou homologní, avšak mají mnoho společných rysů⁵². Všechny tři geny mají CAAT vazebný motiv a CTGGGAA motiv, které jsou důležité pro regulaci exprese genů pomocí interleukinu 6 (IL6). Promotory Aα a Bβ řetězců mají tkáňově specifický motiv pro jaterní nukleární faktor 1 (HNF-1), který je nezbytný pro genovou expresi v jaterní tkáni. Promotor γ řetězce má tři CTGGGAA sekvence důležité pro regulaci transkripce během akutní odpovědi na zánět. Promotory Aα a Bβ řetězců mají také sekvence odpovědné za regulaci exprese pomocí glukokortikoidů⁵³.

Hladina fibrinogenu v normálním stavu organismu je udržována v rozmezí 2–4,2 g l⁻¹. Doposud není jasné, zda okamžitá koncentrace cirkulujícího fibrinogenu ovlivňuje jeho produkci. Bylo zjištěno, že degradační produkty fibrinu mohou nepřímo ovlivňovat transkripci genů kódujících jednotlivé řetězce stimulací produkce IL6 (cit.⁵³). Jaterní sekrece fibrinogenu je kontrolována především pomocí HNF-1. Během poranění či zánětu dochází vlivem IL6 a glukokortikoidů k zvýšení produkce fibrinogenu játry a produkci fibrinogenu i jinými tkáněmi. Bez zajímavosti není ani fakt, že hladina fibrinogenu se zvyšuje během

těhotenství⁵⁴. Zvýšením exprese jednoho z řetězců fibrinogenu dojde ke zvýšení exprese i dalších dvou a zvýšené produkci fibrinogenu⁵⁵. Jakým způsobem dochází k regulaci zvýšeným množstvím jednoho z řetězců není známo. Je pouze patrné, že regulace exprese všech tří genů je úzce propojena a koordinována. U myši jež nebyly schopny produkovat mRNA pro $\alpha\alpha$ řetězec bylo zjištěno, že exprese ostatních dvou genů nebyla narušena⁵⁶.

Makrofágy a monocyty produkují během zánětlivé reakce interleukin 6 (IL6), který ovlivňuje míru exprese mnoha proteinů včetně fibrinogenu. Jakým způsobem ovlivňuje produkci $\alpha\alpha$ a $\beta\beta$ řetězců, není doposud jasné. Je známo pouze to, že regulace se účastní promotorová sekvence CTGGGAA. Na krysím modelu bylo ukázáno, že regulace exprese γ řetězce pomocí IL6 probíhá přes STAT3 (signální transduktor a aktivátor transkripce 3)⁵⁷. Navázáním IL6 či glukokortikoidů na receptor dojde k fosforylaci STAT3 pomocí Jak (Janus kinasa, EC 2.7.10.2) a Tyk2 (Tyrosin kinasa 2, EC 2.7.10.2) kinas. Fosforylovaný STAT3 dimerizuje a prochází do jádra, kde nasedá na promotor a zesiluje transkripci⁵⁸.

Jednotlivé řetězce fibrinogenu vznikají na hrubém endoplasmatickém retikulu a ihned jsou translokovány do lumen endoplasmatického retikula. Jednotlivé řetězce jsou syntetizovány i se signálními sekvencemi, které jsou během translokace limitovanou proteolýzou odštěpeny. Translokace jednotlivých řetězců fibrinogenu probíhá ko-translačně pomocí membránového translokačního kanálu Sec61 (proteinový transportní protein Sec61). Při tomto způsobu translokace je signální sekvence vznikajícího peptidu na ribosomu rozpoznávána pomocí SRP (částice rozpoznávající signál, komplex šesti různých peptidů a 7SL RNA). SRP je navázána na signální část peptidu a ribosom. Tento komplex se váže na SRP receptor, který je v blízkosti kanálu. Poté se SRP uvolní a ribosom se váže na translokační kanál. Energie potřebná pro translokaci se získává z hydrolýzy GTP během translace⁵⁹. Po průchodu do lumen endoplasmatického retikula se dokončuje sbalování jednotlivých řetězců, čemuž napomáhají molekulární chaperony GRP78 (glukosou regulovaný protein 78) a calnexin⁶⁰.

Sestavení molekuly fibrinogenu je postupný proces. Nejprve se vytvoří meziprodukty $\beta\beta\gamma$ a $\alpha\alpha\gamma$. Vytvoření těchto meziproduktů je umožněno díky hydrofobním interakcím, zprostředkovaným převážně aminokyselinovými zbytky isoleucinu, valinu a leucinu v koncových částech dvojité vinuté oblasti. Meziprodukt $\alpha\alpha\beta\beta$ se netvoří. Následuje asociace s třetím řetězcem a vytvořením „polomolekuly“ fibrinogenu $\alpha\alpha\beta\beta\gamma$ (hlavní linií biosyntézy je připojení $\alpha\alpha$ řetězce k $\beta\beta\gamma$ heterodimeru). Konečným krokem je propojení dvou polomolekul v *N*-koncové oblasti a vytvoření dimerního hexameru⁶¹ ($\alpha\alpha\beta\beta\gamma$)₂. Správnému sestavení molekuly fibrinogenu napomáhají molekulární chaperony GRP78, GRP94 (glukosou regulovaný protein 94) a calnexin⁶². Vytvoření disulfidových vazeb napomáhá protein disulfid-isomerasa (EC 5.3.4.1). Vytvořený dimerní hexamer je následně fosforylován a glykosy-

lován. Sacharidová složka vzniká v dolicholfosfátovém cyklu. Poté je fibrinogen transportován do Golgiho aparátu, kde je dokončena glykosylace sializací a je sekretován do krevního řečiště. Jedna kompletní molekula fibrinogenu je sestavena za necelých 5 minut^{62,63}. Za fyziologických podmínek jsou sekretovány pouze kompletně sestavené molekuly fibrinogenu.

4. Degradace fibrinogenu

Nadbytečné řetězce a heterodimery fibrinogenu, nesprávně sestavené molekuly a část správně sestavených molekul fibrinogenu (např. u HepG2 buněk⁶⁴ cca 33 %) je degradována. K degradaci jsou využívány různé buněčné mechanismy. Poločasy jednotlivých řetězců fibrinogenu v endoplasmatickém retikulu jsou poměrně krátké, $\alpha\alpha$ a $\beta\beta$ řetězce mají poločas 1,5 hodiny, γ řetězce mají poločas více než 3 hodiny⁶⁵. $\beta\beta$ a γ řetězce jsou degradovány v proteasomech, $\alpha\alpha$ řetězce jsou degradovány v proteasomech a lysosomech, $\alpha\alpha\gamma$ heterodimery jsou degradovány v lysosomech⁶⁶.

Jednotlivé nevyužité řetězce $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ a γ jsou transportovány za pomoci Sec61p (součást proteinového translokačního kanálu Sec61) z endoplasmatického retikula do cytosolu, kde jsou označeny ubiquitinem a proteolyticky degradovány v proteasomech⁶⁷. Nejpomaleji jsou degradovány γ řetězce, čímž vzniká v hepatocytech nadbytek γ řetězců⁶⁷.

Heterodimery a část $\alpha\alpha$ řetězců jsou transportovány z endoplasmatického retikula a kyselou hydrolýzou degradovány v lysosomech⁶⁶. Proč je část $\alpha\alpha$ řetězců degradována v lysosomech, není jasné.

5. Úloha fibrinogenu v organismu

Fibrinogen, fibrin a jejich degradační produkty mají několik důležitých úloh v organismu. Nejdůležitější a zároveň nejznámější úlohou fibrinogenu je vytvoření fibrinové sítě během zástavy krvácení. Krevní koagulace je sled přísně regulovaných aktivačních reakcí, jejichž výsledkem je tvorba trombinu, který katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrinový monomer. Fibrinový monomer následně polymeruje a tvoří síť, která zpevňuje primární hemostatickou zátku vytvořenou krevními destičkami.

Fibrinogen hraje důležitou roli při agregaci krevních destiček. Zde vystupuje fibrinogen jako adhezivní protein, který váže aktivované krevní destičky přes svůj aktivovaný transmembránový receptor glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)⁴⁶. Zachycení aktivovaných krevních destiček na imobilizovaném fibrin(ogen)u je důležitým prvkem hemostázy. Vazba fibrinogenu na GPIIb/IIIa spouští také endocytosu plasmatického fibrinogenu do krevních destiček a jeho uložení v α granulích⁶. Snížené množství, nebo nefunkční GPIIb/IIIa, má za následek vznik krvácivého onemocnění – Glanzmannovy trombastenii⁶⁸. Naopak

velice aktivní GPIIb/IIIa dává vzniknout trombům, které mohou mít vážné následky pro organismus.

Angiogeneze je proces, jehož výsledkem je tvorba nových cév. Růstový faktor fibroblastů 2 (FGF-2) zvyšuje proliferaci endoteliálních buněk, stimuluje migraci a podporuje angiogenezi⁶⁹. Je produkován ve velké míře cévní stěnou v blízkosti poranění a váže se specificky a s vysokou aktivitou na fibrinogen a fibrin, který potencuje schopnost FGF-2 stimulovat proliferaci endoteliálních buněk⁷⁰. Na druhou stranu fragment E inhibuje angiogenezi^{71,72}.

Bylo zjištěno, že degradační produkty fibrin(ogen)u mají přímé četné vasoaktivní účinky zahrnující vazokonstrikci, vasodilataci a zvýšenou cévní permeabilitu⁷³. Fibrinogen se může vázat přímo na ICAM-1 (intracelulární adhezivní molekula 1) endotelií cév a spustit tak signalizační kaskádu vedoucí k syntéze vasoaktivních mediátorů⁷⁴. Má tedy nepřímé vasoaktivní účinky.

Mnoho typů buněk je schopno specificky adherovat a migrovat po fibrinové matrix. Mezi tyto buňky patří např. endoteliální buňky, fibroblasty, makrofágy, buňky hladkého svalstva, keratinocyty či nádorové buňky. Vazba endoteliálních buněk^{75,76} a fibroblastů⁷⁷ je uskutečňována přes integriny ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$) – váží se na RGDS sekvenční na molekule fibrinogenu a neintegrinové receptory (VE-Cadherin, ICAM-1, P-selektin, GPIIb)^{78,79}. Během hojení poranění slouží fibrinová síť jako lešení pro buňky migrující do místa poranění, které zajišťují reepitalizaci, vaskularizaci, tvorbu kolagenu a tím obnovu poraněného místa a jeho zahojení⁸⁰. Po infiltraci fibrinové matrix endoteliálními buňkami, začínají indukovat fibrinolýzu a generovat volné radikály. Fibroblasty migrují do poraněného místa po 5 dnech od poranění. Působením fibrinu, PDGF (destičkový růstový faktor), TGF- β (transformující růstový faktor β), fibronektinu proliferují a nahrazují fibrin kolagenem typu I (cit.⁸¹).

Fibrinopeptidy B byly popsány jako chemotaktické látky stimulující migraci neutrofilů a fibroblastů⁸². Tím stimulují zánětlivou odpověď. Účinnost této stimulace je srovnatelná s chemotaktickými účinky leukotrienu E a růstového faktoru odvozeného od destiček (PDGF)⁸². Fragmenty D a E (distální a centrální části molekuly uvolněné fibrinolýzou) stimulují migraci monocytů⁸². Fibrinogen reguluje aktivitu mikrofágů a monocytů a tím hraje významnou roli v udržování rovnováhy mezi zánětem v ráně a opravou tkáně.

Na molekule fibrin(ogen)u se nachází několik sekvencí schopných vázat se na leukocytární integrin $\alpha_M\beta_2$, který je především na povrchu neutrofilů a monocytů⁸³. To umožňuje adhezi monocytů a neutrofilů, a akumulaci imunitní odpovědi v blízkosti poranění.

Fibrinogen hraje roli i při nádorových onemocněních. Některé studie ukázaly, že fibrin(ogen) podporuje adhezi a přežití nádorových buněk v plicích⁸⁴. Bylo také prokázáno, že plicní epitel je schopen produkovat fibrinogen⁸⁵.

6. Závěr

Fibrinogen má v organismu mnoho funkcí, které jsou nezbytné pro přežití. Jako součást koagulační kaskády se účastní procesu zástavy krvácení. Je důležitým faktorem ovlivňujícím zánětlivou odpověď, hojení ran, angiogenezi či migraci a proliferaci buněk. Může se však stát i faktorem ohrožujícím život. Věda nám o fibrinogenu přinesla mnoho důležitých poznatků, ale mnoho práce nás stále ještě čeká. Doposud nejsou jasné veškeré úlohy a procesy, kterých se fibrinogen v organismu účastní. Poznání všech dějů, jichž se fibrinogen účastní, prospěje nejen biochemii, ale především pacientům, kterým by nové informace mohly pomoci v léčení závažných chorob, a to buď přímo spojených s fibrinogenem (trombózy, krvácivé stavy, kardiovaskulární choroby), nebo chorob, u nichž bychom nějakou roli fibrinogenu ani nepředpokládali.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GA AV ČR, číslo KAN200670701.

LITERATURA

- Herrick S., Blanc-Brude O., Gray A., Laurent G.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 741 (1999).
- Blombäck B.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 936, 1 (2001).
- Hammersten O.: *Zeitschr. Physiol. Chem.* 28, 98 (1899).
- Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L., Mulford D. J., Ashworth J. N., Melin M., Taylor H. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459 (1946).
- Hall C. E., Slayter H. S.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 11 (1959).
- Weisel J. W.: *Adv. Protein Chem.* 70, 247 (2005).
- Henschen-Edman A. H., v knize: *Methods in Protein Structure Analysis*. (Atassi M. Z., Appella E., ed.), s. 435. Plenum Press, New York 1995.
- Henschen A.: *Arkiv Kemi* 22, 397 (1964).
- Fu Y., Weissbach L., Plant P. W., Oddoux C., Cao Y., Liang T. J., Roy S. N., Redman C. M., Grieninger G.: *Biochemistry* 31, 11968 (1992).
- Fu Y., Grieninger G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2625 (1994).
- Chung D. W., Davie E. W.: *Biochemistry* 23, 4232 (1984).
- Wolfenstein-Todel C., Mosesson M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5069 (1980).
- Siebenlist K. R., Mosesson M. W., Hernandez I., Bush L. A., Di Cera E., Shainoff J. R., Di Orio J. P., Stojanovic L.: *Blood* 106, 2730 (2005).
- Mannila M. N., Lovely R. S., Kazmierczak S. C., Eriksson P., Samnegård A., Farrell D. H., Hamsten A., Silveira A.: *J. Thromb. Haemost.* 5, 776 (2007).
- Kant J. A., Fornace A. J., Saxe D., Simon M. I.,

- McBride O. W., Crabtree G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 185, 1 (1985).
16. Carter A. M., Catto A. J., Kohler H. P., Ariëns R. A., Stickland M. H., Grant P. J.: *Blood* 96, 1177 (2000).
 17. Renner W., Cichocki L., Forjanics A., Köppel H., Gasser R., Pilger E.: *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 755 (2002).
 18. Grünbacher G., Weger W., Marx-Neuhold E., Pilger E., Köppel H., Wascher T., März W., Renner W.: *Thromb. Res.* 2007, doi: 10.1016/j.thromres.2007.03.007, staženo 5.11.2007.
 19. Iwanaga S., Blombäck B., Gröndahl N. J., Hessel B., Wallén P.: *Biochim. Biophys. Acta* 160, 280 (1968).
 20. Watt K. W., Takagi T., Doolittle R. F.: *Biochemistry* 18, 68 (1979).
 21. Townsend R. R., Hilliker E., Li Y.-T., Laine R. A., Bell W. R., Lee Y. C.: *J. Biol. Chem.* 257, 9704 (1982).
 22. Narvaiza M. J., Fernández J., Cuesta B., Páramo J. A., Rocha E.: *Ric. Clin. Lab.* 16, 563 (1986).
 23. Blombäck B., Blombäck M., Edman P., Hessel B.: *Biochim. Biophys. Acta* 115, 371 (1966).
 24. Seydewitz H. H., Kaiser C., Rothweiler H., Witt I.: *Thromb. Res.* 33, 487 (1984).
 25. Witt I., Müller H.: *Biochim. Biophys. Acta* 221, 402 (1970).
 26. Maurer M. C., Peng J.-L., An S. S., Trosset J.-Y., Henschen-Edman A., Scheraga H. A.: *Biochemistry* 37, 5888 (1998).
 27. Witt I., Hasler K.: *Biochim. Biophys. Acta* 271, 357 (1972).
 28. Seydewitz H. H., Kaiser C., Rothweiler H., Witt I.: *Thromb. Res.* 33, 487 (1984).
 29. Martin S. C., Ekman P., Forsberg P. O., Ersmark H.: *Thromb. Res.* 68, 467 (1992).
 30. Henschen A. A.: *Blood Coag. Fibrinol.* 4, 822 (1993).
 31. Meh D. A., Siebenlist K. R., Brennan S. O., Holyst T., Mosesson M. W.: *Thromb. Haemost.* 85, 470 (2001).
 32. Brown A. E., Litvinov R. I., Discher D. E., Weisel J. W.: *Biophys. J.* 92, L39 (2007).
 33. Veklich Y. I., Gorkun O. V., Medved L. V., Nieuwenhuizen W., Weisel J. W.: *J. Biol. Chem.* 268, 13577 (1993).
 34. Gorkun O. V., Veklich Y. I., Medved L. V., Henschen A. H., Weisel J. W.: *Biochemistry* 33, 6986 (1994).
 35. Tsurupa G., Medved L. V.: *Biochemistry* 40, 801 (2001).
 36. Mokogonenko E., Tsurupa G., Ingham K., Medved L.: *Biochemistry* 41, 7907 (2002).
 37. Henschen A., McDonagh J., v knize: *Blood Coagulation*. (Zwaal R. F. A., Hemker H. C., ed.), s. 171. Elsevier Science, Amsterdam 1986.
 38. Nieuwenhuizen W., Haverkate F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 408, 92 (1983).
 39. Nieuwenhuizen W., Vermond A., Hermans J.: *Thromb. Res.* 31, 81 (1983).
 40. Dang C. V., Ebert R. F., Bell W. R.: *J. Biol. Chem.* 260, 9713 (1985).
 41. Dang C. V., Shin C. K., Bell W. R., Nagaswami C., Weisel J. W.: *J. Biol. Chem.* 264, 15104 (1989).
 42. Olexa S. A., Budzynski A. Z.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1374 (1980).
 43. Pratt K. P., Côté H. C. F., Chung D. W., Stenkamp R. E., Davie E. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7176 (1997).
 44. Meh D. A., Siebenlist K. R., Mosesson M. W.: *J. Biol. Chem.* 271, 23121 (1996).
 45. Medved L., Nieuwenhuizen W.: *Thromb. Haemost.* 89, 409 (2003).
 46. Andrieux A., Hudry-Clergeon G., Ryckewaert J.-J., Chapel A., Ginsberg M. H., Plow E. F., Marguerie G.: *J. Biol. Chem.* 264, 9258 (1989).
 47. Smith R. A., Rooney M. M., Lord S. T., Mosesson M. W., Gartner T. K.: *Thromb. Haemost.* 84, 819 (2000).
 48. Altieri D. C., Duperray A., Plescia J., Thornton G. B., Languino L. R.: *J. Biol. Chem.* 270, 696 (1995).
 49. Bach T. L., Barsigian C., Chalupowicz D. G., Busler D., Yaen C. H., Grant D. S., Martinez J.: *Exp. Cell Res.* 238, 324 (1998).
 50. Takeda Y.: *J. Clin. Invest.* 45, 103 (1966).
 51. Crabtree G. R., Kant J. A.: *J. Biol. Chem.* 257, 7277 (1982).
 52. Fowlkes D. M., Mullis N. T., Comeau C. M., Crabtree G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2313 (1984).
 53. Fuller G. M., Zhang Z.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 469 (2001).
 54. Hellgren M.: *Semin. Thromb. Hemost.* 29, 125 (2003).
 55. Roy S., Overton O., Redman C.: *J. Biol. Chem.* 269, 691 (1994).
 56. Suh T. T., Holmback K., Jensen N. J., Daugherty C. C., Small K., Simon D. I., Potter S., Degen J. L.: *Genes Dev.* 9, 2020 (1995).
 57. Zhang Z., Fuentes N. L., Fuller G. M.: *J. Biol. Chem.* 270, 24287 (1995).
 58. Horvath C. M.: <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/2004/260/tr9>, staženo 5.10.07.
 59. Osborne A. R., Rapoport T. A., van der Berg B.: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 529 (2005).
 60. Roy S., Sun A., Redman C.: *J. Biol. Chem.* 271, 24544 (1996).
 61. Redman C. M., Xia H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 480 (2001).
 62. Yu S., Sher B., Kudryk B., Redman C. M.: *J. Biol. Chem.* 258, 13407 (1983).
 63. Kudryk B., Okada M., Redman C. M., Blombäck B.: *Eur. J. Biochem.* 125, 673 (1982).
 64. Yu S., Sher B., Kudryk B., Redman C. M.: *J. Biol. Chem.* 259, 10574 (1984).
 65. Xia H., Redman C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 590 (1999).
 66. Roy S., Yu S., Banerjee D., Overton O., Mukhopadhyay G., Oddoux C., Grienering G., Redman C.: *J. Biol. Chem.* 267, 23151 (1992).
 67. Xia H., Redman C. M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 137 (2001).

68. Nurden A. T., George J. N., v knize: *Hemostasis and Thrombosis*. (Colman R. W., Marder V. J., Clowes A. W., George J. N., Goldhaber S. Z., ed.), s. 987. Lippincott, Philadelphia 2006.
69. Carmeliet P.: *Nat. Med.* 9, 653 (2003).
70. Laurens N., Koolwijk P., De Maat M. P. M.: *J. Thromb. Haemost.* 4, 932 (2006).
71. Brown N. J., Staton C. A., Rodgers G. R., Corke K. P., Underwood J. C., Lewis C. E.: *Br. J. Cancer* 86, 1813 (2002).
72. Staton C. A., Brown N. J., Rodgers G. R., Corke K. P., Tazzyman S., Underwood J. C., Lewis C. E.: *Blood* 103, 601 (2004).
73. Francis C. W., Bunce L. A., Sporn L. A.: *Blood Cells* 19, 291 (1996).
74. Hicks R. C. J., Golledge J., Mir-Hassaine R., Powell J. T.: *Nature* 379, 818 (1996).
75. Sahni A., Francis C. W.: *Blood* 104, 3635 (2004).
76. Suehiro K., Gailit J., Plow E. F.: *J. Biol. Chem.* 272, 5360 (1997).
77. Farrell D. H., Mondhry H. A.: *Biochemistry* 36, 1123 (1997).
78. Martinez J., Ferber A., Bach T. L., Yaen C. H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 386 (2001).
79. Ugarova T. P., Yakubenko V. P.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 368 (2001).
80. Greiling D., Clark R. A. F.: *J. Cell Sci.* 110, 861 (1997).
81. Clark R. A.: *Am. J. Med. Sci.* 306, 42 (1993).
82. Skogen W. F., Senior R. M., Griffin G. L., Wilner G. N.: *Blood* 71, 1475 (1988).
83. Lishko V. K., Podolnikova N. P., Yakubenko V. P., Yakovlev S., Medved L., Yadav S. P., Ugarova T. P.: *J. Biol. Chem.* 279, 44897 (2004).
84. Palumbo J. S., Kombrinck K. W., Drew A. F., Grimes T. S., Kiser J. H., Degen J. L., Bugge T. H.: *Blood* 96, 3302 (2000).
85. Guadiz G., Sporn L. A., Simpson-Haidaris P. J.: *Blood* 90, 2644 (1997).

R. Kotlín and J. E. Dyr (*Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague*): **Fibrinogen**

Fibrinogen, a protein from blood plasma, plays a crucial role in blood coagulation, inflammation and wound healing platelet aggregation. Attention is paid to fibrinogen because it is involved in many physiological and pathological processes, some of which may be life-threatening. This review summarizes recent findings about the fascinating macromolecules. The reader finds biochemical, physicochemical and physiological data about fibrinogen structure, biosynthesis and degradation and becomes acquainted with the fibrinogen-to-fibrin pathway.

PLODY *Lonicera caerulea*: PERSPEKTIVNÍ FUNKČNÍ POTRAVINA A ZDROJ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

JAN HEINRICH^a, IRENA ŠVARCOVÁ^b
a KATEŘINA VALENTOVÁ^b

^a WALMARK a.s., Oldřichovice 44, 739 61 Třinec, ^b Ústav
lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita
Palackého, Hněvotinská 3, 775 15 Olomouc
kata.valentova@email.cz

Došlo 20.11.07, přijato 4.2.08.

Klíčová slova: *Lonicera caerulea*, zimolez modrý, poly-
fenoly, biologická aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Botanický popis
3. Obsahové látky a jejich biologické účinky
 - 3.1. Sacharidy a proteiny
 - 3.2. Tuký
 - 3.3. Další složky
 - 3.4. Fenolové sloučeniny
 - 3.4.1. Fenolové kyseliny
 - 3.4.2. Flavonoidy
4. Tradiční užití plodů zimolezu modrého
a předpokládané účinky na lidské zdraví
5. Závěr

1. Úvod

V rozvinutých zemích, Českou republiku nevyjímaje, dochází v současnosti k výraznému nárůstu počtu lidí, u kterých dochází důsledkem jejich způsobu života k poruchám metabolismu – metabolickému syndromu, který je podkladem řady chronických (civilizačních) onemocnění. Jsou to např. kardiovaskulární a nádorová onemocnění (zejména trávicího ústrojí), diabetes mellitus, alergie, autoimunitní onemocnění, obezita aj. Vedle genetických příčin se na jejich vzniku a průběhu podílí řada dalších vlivů, např. životní styl, nevhodné složení potravy či zhoršující se životní prostředí, zejména v průmyslových a silně urbanizovaných oblastech. Složení denní diety patří mezi důležité faktory, které mohou významně ovlivnit vznik některých chronických onemocnění. Několik epidemiologických studií prokázalo, že vyvážené složení stravy a správné dietní návyky mají statisticky významný pozitivní vliv na zdravotní stav všech věkových resp. rizikových skupin populace. Byla publikována řada údajů prokazujících

cích účinky konzumace vyváženého množství ovoce a zeleniny jako prevence před vznikem mnoha onemocnění¹. V posledním desetiletí vzrostl zájem o funkční potraviny, nutraceutika a doplňky stravy. Bobulovité ovoce je jedním ze zdrojů nutričně významných fytochemikálií². Je bohatým zdrojem kyseliny askorbové a fenolových sloučenin, zvláště pak fenolových kyselin, anthokyaninů a proanthokyanidinů. Tyto sloučeniny poskytují ovoci typické zbarvení a zároveň vykazují příznivý účinek na lidský organismus. Jejich biologická aktivita může snížit riziko vzniku některých nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Byly prokázány jejich protinádorové, antimikrobiální, protizánětlivé a antimutagenní vlastnosti³. *Lonicera caerulea* L. (zimolez modrý, zimolez jedlý) je používána v lidovém léčitelství v Rusku, Číně a Japonsku, ale doposud málo je známá v Severní Americe a v Evropě⁴. V tradiční čínské medicíně se používají květy, poupata, pupeny či jiné nadzemní části *L. japonica* pro své antibakteriální, antipyretické a protizánětlivé účinky při různých infekčních onemocněních^{5–8}. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o biologicky aktivních sloučeninách v rostlinách rodu *Lonicera* se zaměřením na plody *L. caerulea*.

2. Botanický popis

Rod *Lonicera* (zimolez) se řadí do čeledi Caprifoliaceae (zimolezovité), do které dále patří např. rody *Sambucus* (bez), *Viburnum* (kalina, tušalaj) a *Linnaea* (zimozel – nejmilejší rostlina Carla Linného) (cit.⁹). Rod zimolez zahrnuje okolo 180 druhů opadavých nebo stálezelených, keřovitých, popínavých nebo půdopokryvných dřevin, přirozeně se vyskytujících zejména na severní polokouli, nejjižněji je rozšířen v Mexiku, severní Africe, na Jávě a Filipínách¹⁰.

Mnohé z druhů zimolezu jsou pěstovány jako okrasné keře a popínavé rostliny, zejména pro krásu svých květů a plodů. V současné době pouze jediný druh, *L. caerulea*, je pěstován jako ovocný keř s chutnými, modře zbarvenými plody. Ostatní druhy zimolezu mají většinou nejedlé, někdy i mírně jedovaté plody, ve zralosti zbarvené žlutě, oranžově, červeně, modře až černě. Plody zimolezu dozrávají většinou na jaře a v létě a často slouží jako potrava ptákům. Přirozený výskyt, výška keře a barva zralých plodů některých druhů zimolezů jsou uvedeny v tab. I (cit.¹⁰).

L. caerulea L. patří do sekce *Isika* Rehd., podsektce *Caeruleae* Rehd. Rozsah podsektce je již mnoho let předmětem výzkumu a četných diskuzí. Díky rozdílnému chápání definice druhu a rozdílným výzkumným metodám odlišují různí autoři v rámci subsektce až 11 druhů. V současné době převládají tendence zařazovat dosud uváděné druhy *L. altaica*, *L. caerulea*, *L. emphyllocalyx*, *L.*

Tabulka I

Přirozený výskyt, výška keře a barva zralých plodů některých druhů zimolezů¹⁰

Latinský název	Přirozený výskyt	Výška keře v m	Barva zralých plodů
<i>L. albiflora</i> Torr. & Gray	S Amerika	4 (popínavý)	oranžová
<i>L. arizonica</i> Rehd.	S Amerika	—	červená
<i>L. caerulea</i> L.	Evropa – SV Asie	2	tmavě modrá
<i>L. canadensis</i> Batr. ex Marsh.	S Amerika	1,5	oranžová-červená
<i>L. caprifolium</i> L.	Evropa – V Asie	6 (popínavý)	oranžová-červená
<i>L. chrysantha</i> Turcz. ex Ledeb.	SV Asie – Japonsko	4	tmavě červená
<i>L. ciliosa</i> (Pursh) Poir. ex DC.	S Amerika	—	červená
<i>L. conjugialis</i> Kellogg	S Amerika	1,5	červená
<i>L. dioica</i> L.	S Amerika	1,5	červená
<i>L. etrusca</i> Santi	Středozemí	4 (popínavý)	červená
<i>L. flava</i> Sims	S Amerika	2,5	červená
<i>L. fragrantissima</i> Lindl. & Paxton	Čína	2	červená
<i>L. hirsuta</i> Eat.	S Amerika	—	žlutá, červená
<i>L. hispidula</i> (Lindl.) Dougl. ex Torr. & Gray	S Amerika	—	červená
<i>L. interrupta</i> Benth.	S Amerika	—	červená
<i>L. involucrata</i> Banks ex Spreng.	S Amerika	0,9	fialová, černá
<i>L. japonica</i> Thunb.	V Asie	4 (popínavý)	černá
<i>L. korolkowii</i> Stapf	Centrální Asie, Afghánistán, Pákistán	3	světle červená
<i>L. maackii</i> (Rupr.) Herder	Japonsko, Korea, S Čína	5	tmavě červená- černá
<i>L. morrowii</i> Gray	Japonsko	3	žlutá, červená, tmavě červená
<i>L. oblongifolia</i> (Goldie) Hook.	S Amerika	1,5	červená
<i>L. periclymenum</i> L.	Evropa, S Afrika, V Asie	4	
<i>L. reticulata</i> Raf.	JV Čína	3,5	černá
<i>L. ruprechtiana</i> Regel	SV Asie, Čína	6	červená
<i>L. sempervirens</i> L.	S Amerika	—	červená
<i>L. standishii</i> Jacques	Čína	3,5	červená
<i>L. subspicata</i> Hook. & Arn.	S Amerika	2,5	žlutá, červená
<i>L. tatarica</i> L.	J Rusko, Tuzmenistán	4	žlutá, oranžová, červená
<i>L. utahensis</i> S. Wats.	S Amerika	1,5	červená
<i>L. villosa</i> (Michx.) J.A. Schultes	S Amerika	—	modrá-černá
<i>L. xylosteum</i> L.	Evropa, Sibiř, Čína	3	tmavě červená

kamtschatica, *L. pallasii*, *L. stenantha*, *L. venulosa* jako poddruhy v rámci druhu *L. caerulea*¹¹.

Zimolez modrý se původně přirozeně vyskytoval v Evropě a jihovýchodní Asii. Rostliny jsou schopny bez poškození přežívat i mrazy s teplotami okolo –46 °C. Keře kultivarů dorůstají během 10 let výšky 1,5–2 m. Listy jsou vsřícné, celistvé, kopinaté až oválné a mohou být ochmýřené nebo holé. Velikost květů je okolo 2 cm, barvy světle

žluté, trubkovitého až trychtýřovitého tvaru. Plody jsou jedlé tmavě modré bobule s protáhlým, nepravidelně válcovitým tvarem, často se slupkou pokrytou voskovým povlakem. Plody pěstovaných kultivarů mohou dorůstat délky více než 2 cm s hmotností pohybující se v rozmezí 1–2 g. Chuť plodů je rozdílná podle kultivaru od hořké (zvláště u brzy plodících kultivarů), přes velmi kyselou až kyselé neutrální po trpce-sladkou; semena jsou zanedbatel-

Obr. 1. *L. caerulea* – část rostliny s plody

né velikosti. Keře rozkvétají brzy na jaře a zralé plody se objevují již během května jako vůbec první ovoce u nás, zhruba 2 týdny před dozráváním jahod. Jedna rostlina má výnos okolo 2–3 kg (cit.¹²).

Zimolez modrý byl poprvé botanicky popsán v roce 1894 a první pokusy o pěstování proběhly v severním a východním Rusku v letech 1913–1915. Rozsáhlejší šlechtitelské práce začaly v Rusku v 50. letech minulého století. V polovině 80. let pokračovala v práci na šlechtění M. N. Plekhanová na oddělení ovocných plodin Vavilovova výzkumného institutu v St. Peterburgu¹³. Během posledních 25 let vzniklo v Rusku více než 68 kultivarů, z toho nejméně 60 je komerčně pěstováno. Mnoho z těchto kultivarů bylo od 80. let minulého století rozšířeno do Severní Ameriky¹². V České republice se zimolez modrý vyskytuje již několik desítek let, v posledních asi 15 letech je prodáván pod obchodní značkou Kamčatská borůvka® (cit.¹⁴).

3. Obsahové látky a jejich biologické účinky

Plody *L. caerulea* obsahují 14,6 % sušiny¹⁵, z čehož 14,8 % tvoří rozpustná vláknina¹⁶. Plody *L. caerulea* a jejich šťáva obsahují jako hlavní složky sacharidy, lipidy, proteiny, organické kyseliny, polyfenoly a dále pak jako minoritní složky kyselinu askorbovou (500–700 mg kg⁻¹), vitamín B, hořčík, fosfor, vápník a draslík¹⁷.

3.1. Sacharidy a proteiny

Plody *L. caerulea* obsahují okolo 7,2 % sacharidů. Mezi volnými sacharidy převažují glukosa (3,2 %) a fruktosa (2,9 %), mezi vázanými byly prokázány glukosa (0,8 %), galaktosa (0,2 %) a arabinosa (0,1 %) (cit.¹⁵).

Pozornost si zasluhuje také obsah sacharidů ve vrcholových částech stonků zimolezu modrého, kde převládá

sacharosa s téměř 90% zastoupením z celkového obsahu sacharidů a dále byly nalezeny čtyři další cukry. Zastoupení fruktosy, glukosy, sacharosy, rafinosy a stachyosy se mění v závislosti na klimatických podmínkách a ročním období. Nejvyšší obsah těchto cukrů byl naměřen v lednu, do května jejich množství klesá a následně se opět zvyšuje. Nejvíce se během roku mění množství stachyosy a rafinosy. Od dubna do listopadu je jejich množství téměř zanedbatelné, kdežto v následujícím období jejich zastoupení výrazně roste. Fruktosa a glukosa představují jen malý podíl z celkových cukrů a ani jejich obsah se během roku nemění. Akumulace rafinosy a stachyosy přímo souvisí s tolerancí rostlin vůči nízkým teplotám a vysychání^{18,19}. K sezónním změnám dochází také ve složení proteinů ve vrcholových částech stonků; za odolnost proti mrazu se zdá být odpovědný protein o 42 kDa (cit.²⁰).

3.2. Tuky

Plody zimolezu modrého obsahují 1,52 % lipidů; zastoupeny jsou zejména steroly, triacylglyceroly a fosfatidylcholin (tab. II, cit.¹⁵). Obsah mastných kyselin je necelé jedno procento (0,89 %) hmotnosti plodů; hlavními jsou palmitová (38,2 %), olejová (27,6 %), stearová (14,7 %), myristová (9,2 %), linolová (5,9 %), palmitolejová (2,8 %) a laurová kyselina (1,6 %). 0,46 % váhy plodů tvoří nezmýdelnitelný podíl (steroly, alkoholy a uhlovodíky)

Tabulka II

Lipidová a nezmýdelnitelná frakce *L. caerulea*

Látka	Relativní obsah [%]	Látka	Relativní obsah [%]
Uhlovodíky + steroly	32,0	α -Amyrin	29,6
Triacylglyceroly	27,0	β -Amyrin	24,7
Fosfatidyl cholin	21,0	Stigmasterol	14,8
Volné mastné kyseliny	7,0	Kyselina ursolová	11,5
Kyselina fosfatidová	6,0	Triterpeny	5,3
Fosfatidyl serin + min. fosfolipidy			
Digalaktosyl diglycerol	4,0	Sitosterol	4,9
Fosfatidyl ethanolamin	3,0	Kyselina oleanolová	3,3
		Δ^7 -Stigmasterol	3,3
		Kampesterol	2,0
		Brasikasterol	0,6

s převládajícím zastoupením α -amyrinu (29,6 %), β -amyrinu (24,7 %), stigmasterolu (14,8 %) a kyseliny ursolové (11,5 %) (cit.²¹). U ursolové kyseliny a jejího 19-hydroxyderivátu kyseliny pomolové byla v mikromolárních koncentracích prokázána schopnost inhibice proliferace a syntézy DNA u lidské promyelocytární leukemické buněčné linie HL-60 (cit.²²). Ursolová kyselina, β -amyrin a glykosid β -sitosterolu inhibovaly v mikromolární koncentraci růst buněčné linie odvozené od rakoviny tlustého střeva HCT 116 a nádoru dřeně nadledvin PC-12 (cit.²³).

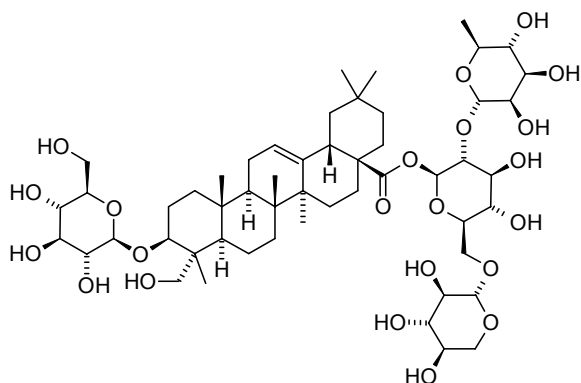
3.3. Další složky

Organické kyseliny (12,2 % sušiny) jsou reprezentovány kyselinou citronovou (3,7 %), jablečnou (18,0 %) a ostatními organickými kyselinami (2,4 %) (cit.²⁴).

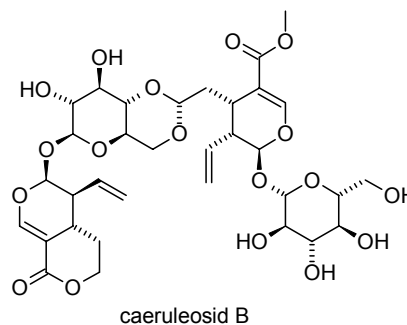
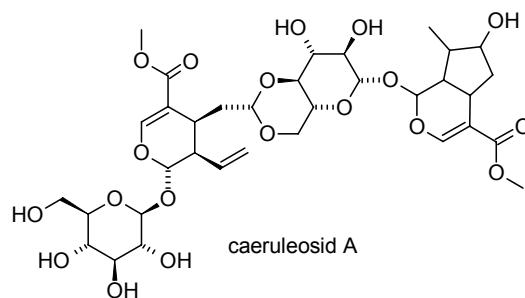
Mimo fenolové sloučeniny^{7,8,25} byly v nadzemních částech *L. japonica* nalezeny další významné látky s předpokládanými zdraví prospěšnými účinky, mezi něž patří saponiny^{5,26–28} a iridoidní glykosidy^{6,29–32}.

Z nadzemních částí *L. japonica* byl izolován triterpenoidní saponin lonicerosid C, 3-*O*- β -D-glukopyranosyl hederagenin 28-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glukopyranosyl ester (obr. 2). Lonicerosid C vykazuje protizánětlivé účinky, např. u otoku uší vyvolaného krotónovým olejem u myší²⁶. Směs triterpenoidních saponinů z *L. fulvotomentosa*, z nichž tři byly identifikovány jako fulvotomentosid A, α -hederin a sapindosid B, prokázala u myší protektivní aktivitu vůči hepatotoxickým účinkům paracetamolu²⁷ a kadmia²⁸.

Iridoidy jsou sekundární metabolity odvozené od cyklopentano[c]pyran monoterpenoidů a biogeneticky a chemotaxonomicky tvoří strukturální vazbu mezi terpeny a alkaloidy. Obecně se u těchto látek předpokládá široké spektrum zdraví prospěšných účinků: antihepatotoxické, hypoglykemické, hypolipidemické, protizánětlivé, antivirové, imunomodulační, antispasmodické, antitumorosní a projímavé³³. Iridoidní glykosidy plodů brusinek (*Vaccinium macrocarpon*, *V. oxycoccus*, *V. vitis-idaea*)



Obr. 2. Lonicerosid C, saponin z *L. japonica*



Obr. 3. Caeruleosidy A a B, bis-iridoidy v listech *L. caerulea*

a borůvek (*V. myrtillus*) přispívají k charakteristické chuti těchto plodů³⁴. V listech *L. caerulea* se vyskytují tři iridoidní glukosidy, pojmenované caeruleosidy A, B (obr. 3) a C. Tyto sloučeniny jsou tvořeny sekologaninem spojeným přes acetalovou vazbu se sacharidovou částí loganinu či swerosidu. Tyto caeruleosidy jsou první bis-iridoidy, které jsou tvořeny dvěma jednotkami iridoidů spojených acetalovými vazbami^{35,36}.

3.4. Fenolové sloučeniny

Bobulovité ovoce představuje jeden z nejdůležitějších zdrojů fenolových sloučenin jako zdraví prospěšných fytochemikálií. Také plody *L. caerulea* obsahují vysoké množství fenolových sloučenin. Obsah je závislý na stupni zralosti, genotypových odlišnostech, klimatických podmínkách před sklizní, skladovacích podmínkách po sklizni a metodách zpracování sklizeného ovoce²⁴. Na našem pracovišti byla připravena fenolová frakce z *L. caerulea* var. *kamtschatica* (0,4 % z původní hmotnosti čerstvých plodů) obsahující 20,1 % fenolových sloučenin, zahrnujících fenolové kyseliny, flavonoidy a anthokyaniny (18,5 %) (cit.¹⁵).

Fenolové látky jsou nezbytné pro metabolismus rostlin a jsou produkovány jako reakce na poškození vnějšími činiteli. Ve vysokých koncentracích mohou fenolové sloučeniny nebo jejich oxidační produkty reagovat s proteiny, sacharidy a minerály³⁷. Vliv polyfenolů na lidský organismus je obvykle dáván do souvislosti se dvěma účinky: (i) inhibicí některých enzymů, např. xanthinoxidasy či aldosaireduktasy a (ii) antioxidační aktivitou^{38–40}. Polyfe-

noly chrání jak další složky potravy (karotenoidy, vitamin C apod.) před oxidací, tak buňky střevního epitelu a enzymy trávicího ústrojí před poškozením volnými radikály.

3.4.1. Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny tvoří zhruba třetinu celkového dietního příjmu fenolových látek. V rostlinných materiálech jsou obsaženy ve volné nebo vázané formě. Jednoduché fenolové kyseliny jsou také produktem štěpení flavonoidů střevní mikroflorou⁴¹.

V nadzemních částech *L. japonica* byly nalezeny protokatechová a chlorogenová kyselina. Již dříve se u těchto látek uváděly hepatoprotektivní⁴² a protinádorové účinky⁴³. Byl prokázán cytotoxický účinek vodného extraktu *L. japonica* a kyseliny protokatechové na buňky HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Extrakt i protokatechová kyselina byly schopny aktivovat c-Jun N-terminální kinasu (cJNK). Vzhledem k nízké koncentraci protokatechové kyseliny v extraktu se předpokládá synergické působení této kyseliny s dalšími obsahovými látkami⁸.

Obsah fenolových kyselin v plodech zimolezu modrého byl nedávno srovnáván s dalšími plody rostlin ze severovýchodního Polska⁴⁴. Jednalo se o plody zimolezu modrého (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast), borůvky (*Vaccinium myrtillus*), ostružiny (*Rubus plicatus*), černého rybízu (*Ribes nigrum*) a muchovníku (*Amelanchier ovalis*). Celkový obsah fenolových sloučenin se pohyboval v rozmezí od 9910±470 u černého rybízu do více než 23 000 mg ekvivalentů (+)-katechinu na kg

sušiny (mg kg⁻¹ DM) plodů muchovníku, borůvek a ostružin. Obsah fenolových látek u zimolezu byl menší (21280±890) než bylo zjištěno v jiných studiích^{45–47}, což může být ovlivněno několika faktory, jako např. varietálními a regionálními rozdíly, stupněm zralosti, stejně jako analytickými postupy při extrakci a kvantifikaci. Celkový obsah fenolových kyselin se pohyboval v rozmezí 2850±140 (plody muchovníku) do 5420±230 mg kg⁻¹ DM (plody zimolezu). Obsah jednotlivých fenolových kyselin, a to jak volných, tak vázaných v esterech a glykosidech je uveden v tab. III (cit.⁴⁴). Na našem pracovišti jsme identifikovali ve fenolové frakci plodů *L. caerulea* var. *kamtschatica* kyselinu chlorogenovou v množství 0,42 % fenolové frakce, což odpovídá 168 mg kg⁻¹ DM, dále kávovou (0,14 %) a ferulovou (0,10 %) a celkový obsah protokatechové, gentisové, rozmarýnové a vanilové kyseliny byl 0,08 % (cit.¹⁵).

3.4.2. Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenoly, v jejichž struktuře je základním skeletem 2-fenyl-1,4-benzopyron. Rozdíly mezi flavonoidy jsou dány množstvím a pořadím hydroxylových skupin, rozsahem alkylace a glykosylace. Stupeň hydroxylace je určující pro jejich degradaci ve střevě a typ produktů vytvářených střevní mikroflorou⁴⁸.

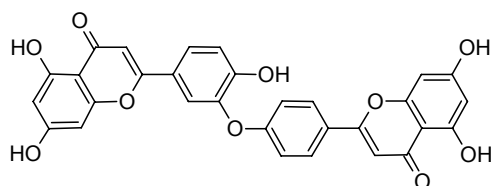
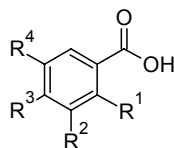
Flavonoly, flavony a flavan-3-oly

V námi analyzované fenolové frakci *L. caerulea* var. *kamtschatica* byl nalezen kvercetin (0,1 % fenolové frakce), jeho 3-glukosid (0,06 %) a 3-rutinosid (0,75 %) a malé

Tabulka III

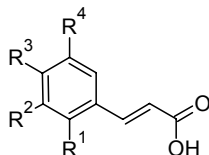
Obsah celkových fenolových kyselin, volných, uvolněných z esterů a glykosidů v plodech zimolezu modrého (mg kg⁻¹ DM)⁴⁴

Fenolická kyselina	Celkový obsah	Volné	Estery	Glykosidy
<i>Deriváty kyseliny hydroxybenzoové</i>				
Gentisová	153,5	1,5	116,8	35,2
Gallová	44,3	0,1	43,8	0,4
<i>o</i> -Pyrokatechová	28,6	–	22,5	6,1
Protokatechová	144,4	2,3	105,2	36,9
Salicylová	1234,9	9,0	824,8	401,1
Vanillová	21,1	–	10,2	10,9
<i>Deriváty kyseliny hydroxyskořicové</i>				
Kávová	598,2	22,4	536,6	39,2
<i>m</i> -Kumarová	2014,5	6,4	1402,0	606,0
<i>p</i> -Kumarová	987,1	23,5	631,7	331,9
3,4-Dimetoxyskořicová	44,2	–	29,9	14,3
Ferulová	36,9	20,7	13,1	3,1
Hydroxycávová	51,9	–	–	46,5
<i>Další fenolické kyseliny</i>				
<i>p</i> -Hydroxyfenyloctová	10,3	0,9	9,4	–
<i>p</i> -Hydroxyfenylmléčná	48,3	0,5	29,2	18,6

Obr. 4. Ochnaflavon, biflavonoid izolovaný z *L. japonica*

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Gentisová	-OH	-H	-H	-OH
Gallová	-H	-OH	-OH	-OH
<i>o</i> -Pyrokatechová	-OH	-OH	-H	-H
Protokatechová	-H	-OH	-OH	-H
Salicylová	-OH	-H	-H	-H
Vanilová	-H	-OCH ₃	-OH	-H

Obr. 5. Deriváty kyseliny hydroxybenzoové



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Kávová	-H	-OH	-OH	-H
<i>m</i> -Kumarová	-H	-OH	-H	-H
<i>p</i> -Kumarová	-H	-H	-OH	-H
Ferulová	-H	OCH ₃	-OH	-H

Obr. 6. Deriváty kyseliny hydroxyskořicové

množství epikatechinu a apigeninu (obr. 7, cit.¹⁵).

Ochnaflavon (obr. 4), biflavonoid izolovaný z nadzemních částí *L. japonica*, silně inhibuje fosfolipasu A₂ (PLA₂) u potkanů. Zvýšená aktivita PLA₂ je dávana do souvislosti se vznikem nadměrných zánětlivých reakcí, pankreatitidy či revmatoidní artritidy⁴⁹.

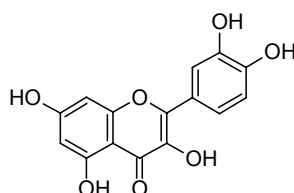
Luteolin izolovaný z *L. japonica* vykázal schopnost indukce apoptózy CH27 buněčné linie odvozené od lidského karcinomu plic, a to cestou aktivace kaspasy-3 i AIF (apoptosis-inducing factor) (cit.⁵⁰). Luteolinem indukovaná

apoptóza linie CH27 může být doprovázena také aktivací specifických enzymů, jako je superoxiddismutasa a katalasa⁵¹. Tyto enzymy jsou schopny zabránit iniciační a promoční fázi karcinogeneze a jejich hladiny jsou u mnoha nádorových onemocnění sníženy^{52,53}.

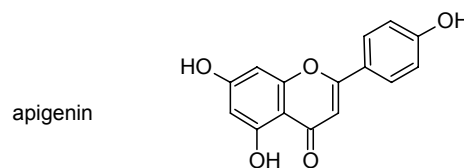
Anthokyaniny

Anthokyaniny představují důležitou skupinu ve vodě rozpustných pigmentů, poskytujících rostlinným pletivům modrou, fialovou a červenou barvu. Barevné vlastnosti jsou dány mj. spojováním do komplexů s vyšší absorbcí světelných vln a vytvářením komplexů s kovy. Ve vodných roztocích existují anthokyaniny v různých molekulárních formách, jejichž dynamická rovnováha závisí zejména na pH roztoku (obr. 8). Červený flavyliový kation převažuje při pH < 2. Při zvyšování pH dochází k rychlé ztrátě protonu za vzniku modré chinoidní struktury. Zároveň mnohem pomalejší hydratace flavyliového kationtu poskytuje bezbarvou hemiketalovou formu, která později tautomerizuje do formy chalkonové⁵⁴. Anthokyaniny se běžně vyskytují glykosylovány; aglykony (anthokyanidiny) se nacházejí v čerstvých rostlinných materiálech jen zřídka⁵⁵. Vyskytují se jako 3-glykosidy a 3,5-diglykosidy vázané s glukosou, rhamnosou, galaktosou nebo arabinosou⁵⁶.

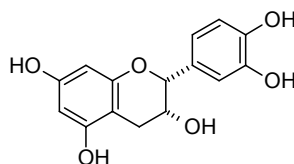
Anthokyaniny a proanthokyanidiny vykazují antibakteriální vlastnosti a schopnost inhibovat adhezi bakterií na stěnách močových cest⁵⁷. Anthokyaniny mají také protizánětlivé a antimutagenní účinky a udržují propustnost cév. Schopnost regulovat propustnost (permeabilitu) kapilár byla základem jejich definice jako vitamínu P. Chrání před hepatitidou A a B a před hepatotoxicitou paracetamolu⁵⁸. Extrakty bobulovitého ovoce bohaté na anthokyaniny jsou



kvercetin

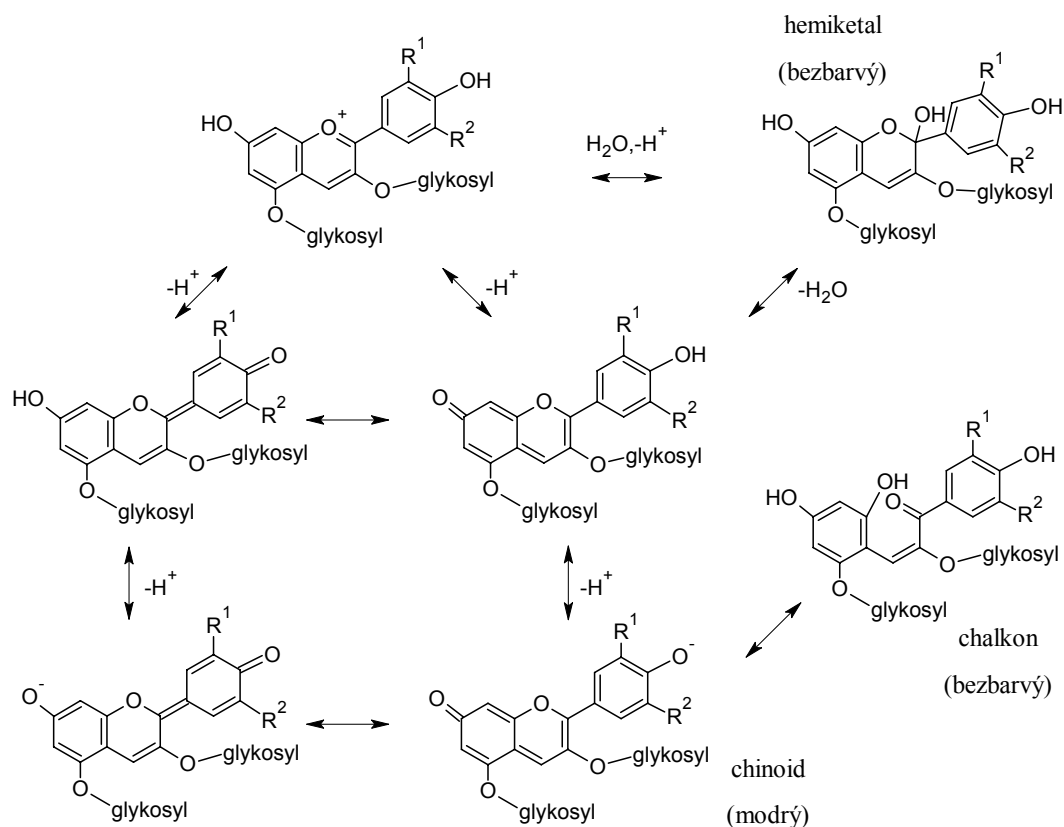


apigenin



epikatechin

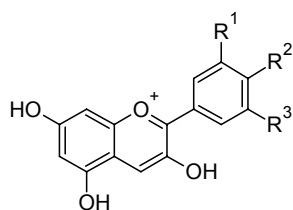
Obr. 7. Chemická struktura a) kvercetinu; b) apigeninu; c) epikatechinu

Obr. 8. Různé formy anthokyaninů ve vodných roztocích v závislosti na pH (cit. ⁵⁴)

Tabulka IV

Anthokyaniny analyzované v zimolezu modrém (% celkového množství)

Anthokyanin	Místo sběru, kultivary		
	Oregon, USA, 10 různých kultivarů ⁶²	oblast Bělehradu, Rusko, kultivar neznámý ⁶³	střední Morava, Česká Republika, var. <i>kamtschatica</i> ¹⁵
Kyanidin-3-glukosid	79–88	84,8	60,0
Kyanidin-3-rutinosid	1–11	6,4	7,3
Kyanidin-3,5-diglukosid	2,2–6,4	0	9,9
Peonidin-3-glukosid	2,8–4,5	–	5,8
Peonidin-3-rutinosid	0,3–1,3	–	0,5
Peonidin-3,5-diglukosid	–	–	8,1
Delfinidin-3-glukosid	–	–	1,2
Delfinidin-3-rutinosid	–	–	2,0
Pelargonidin-3-glukosid	0,2–1,0	–	3,3
Pelargonidin-3-rutinosid	–	–	0,1
Pelargonidin-3,5-diglukosid	–	–	0,6



	R ¹	R ²	R ³
Kyanidin	-OH	-OH	-H
Delfinidin	-OH	-OH	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H

Obr. 9. Strukturní vzorce anthokyanidinů

spojovány se zlepšením symptomů neurologických onemocnění ve stáří a zvýšením rezistence červených krvinek proti oxidačnímu stresu *in vitro*⁵⁹.

Anthokyaniny mají díky přítomnosti hydroxylové skupiny v pozici 3 kruhu C velmi dobré antioxidační účinky a jsou schopny chelátovat kovové ionty (Fe, Cu). Antioxidační aktivita může být zvýšena acylací sacharidových zbytků s aromatickými hydroxykyselinami⁶⁰. Tyto sloučeniny mají vyšší antioxidační aktivitu než vitaminy C a E nebo β -karoten⁶¹.

Tabulka IV uvádí srovnání obsahu anthokyaninů v plodech *L. caerulea* publikovaných v různých pracích. Hlavním nekondenzovaným anthokyaninem je kyanidin-3-glukosid (60–88 %), následovaný kyanidin-3-rutinosidem (1–11 %) a kyanidin-3,5-diglukosidem (0–9,9 %) (cit.^{15,62,63}). Spíše minoritní část anthokyaninů zastupují peonidin-3-glukosid (2,8–5,8 %), peonidin-3-rutinosid (0,5 až 1,3 %) a pelargonidin-3-glukosid (0,2–3,3 %) (cit.^{15,62}). Na našem pracovišti jsme nově objevili v zimolezu modrém poměrně významné množství peonidin-3,5-diglukosidu (8,1 %) a dále delfinidin-3-glukosid (1,2 %), delfinidin-3-rutinosid (2,0 %) a pelargonidin-3-rutinosid (3,3 %) (cit.¹⁵).

4. Tradiční užití plodů zimolezu modrého a předpokládané účinky na lidské zdraví

Původem pochází *L. caerulea* z oblastí Ruska, Číny a Japonska, kde probíhá také nejobsáhlejší výzkum s cílem komerční produkce jejich plodů. Nespornými výhodami zimolezu modrého jsou nejen brzké období sklizně, příjemná chuť a vůně, ale i množství prospěšných účinků na lidské zdraví, především v oblasti působení na aterosklerózu, hypertenzi, choroby gastrointestinálního traktu a bakteriálních infekcí. Biologická aktivita plodů *L. caerulea* je dána zejména vysokým obsahem vitamínu C a fenolových látek⁶⁴. Extrakt z *L. caerulea* vykazuje výrazný protizánětlivý

účinek proti uveitidě potkanů vyvolané endotoxinem. Možný mechanismus je nejspíše založen na jejich schopnosti inhibovat aktivaci NF- κ B a následnou tvorbu prozánětlivých mediátorů TNF- α , prostaglandinu E₂ a NO (cit.⁶⁵).

Anthokyaniny bobulovitého ovoce chrání cévy udržováním jejich permeability, snižují intenzitu zánětlivé odpovědi a agregaci krevních destiček^{66,67}. Bioaktivní sloučeniny *L. caerulea* vykazují *in vitro* schopnost inhibice oxidace lipoproteinů. Naše nedávná studie prokázala snížení oxidačního poškození lidských lipoproteinů vyvolaného měďnatými ionty fenolovou frakcí *L. caerulea* var. *kamtschatica* v podmínkách *in vitro*⁶⁸.

Extrakty barevného ovoce vykazují významné biologické účinky na proces karcinogeneze. Kyanidin a jeho 3-glykosid snižují oxidační poškození DNA lidských lymfocytů *ex vivo*. Kyanidin-3-rutinosid a kyanidin-3-glukosid potlačují metastázy buněk rakoviny plic A579 (cit.⁶⁹). Kyanidin a směs jeho glykosidů snižují růst buněk rakoviny tlustého střeva HCT 116 a HT 29, a to přímo úměrně k jejich dávce⁷⁰. Delfinidin, malvidin a petunidin inhibují proliferaci rakovinných buněk odvozených od různých tkání včetně tlustého střeva, prsu, krve a plic již v mikromolárních koncentracích⁷¹. Peonidin vykazuje inhibiční a pro-apoptotický účinek na rakovinné buňky *in vitro*, zvláště pak na metastázy rakoviny prsu⁷². Frakce proanthokyanidinů divoce rostoucích bobulovin vykazují antiproliferační účinky na dva modely rakoviny: androgen-senzitivní (LNCaP) a dokonce i na mnohem agresivnější androgen necitlivou buněčnou linii (DU145) (cit.⁷³).

Mnohé extrakty bobulovin vykazují účinky proti angiogenezi; inhibují expresi růstového faktoru VEGF vyvolanou peroxidem vodíku nebo TNF- α v buněčných kulturách *in vitro* a působí proti angiogenezi u experimentálních zvířat⁷⁴.

Polyfenolové frakce různých rostlin vykazují účinky podobné působení inzulínu snížením hladiny krevní glukosy po příjmu potravy⁷⁵. Hlavní účinek spočívá ve snížení aktivity α -glukosidasy/maltasy. Rozpustné proanthokyanidiny inhibují pankreatickou a žaludeční lipasu a proto mohou být vhodným prostředkem pro léčbu obezity⁷⁶.

5. Závěr

Plody *Lonicera caerulea* jsou perspektivní zdroj zdraví prospěšných látek, které vykazují antiadherenční, antioxidační a chemoprotektivní účinky. Jejich konzumace se jeví jako vhodná prevence vážných chronických chorob, např. nádorových onemocnění, diabetu a srdečně-cévních chorob. *L. caerulea* může být úspěšně pěstována v klimatických podmínkách střední Evropy a být vyhledávanou funkční potravinou obohacující naši dietu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů MSM 6198959216 a FT-TA3/024.

LITERATURA

- Coates P. M., Gragg G. M., Cevine M., Moss J., White J. D. (ed.): *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Marcel Dekker, New York 2005.
- Svarcova I., Heinrich J., Valentova K.: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 151, 163 (2007).
- Gross G. G., Hemingway R. W., Yoshida T. (ed.): *Plant polyphenols 2*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999.
- Huxley A.: *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*. Micmillan, London 1992.
- Xiang T., Tezuka Y., Wu L. J., Banskota A. H., Kadota S.: Phytochemistry 54, 795 (2000).
- Kakuda R., Imai M., Yaoita Y., Machida K., Kikuchi M.: Phytochemistry 55, 879 (2000).
- Peng L. Y., Mei S. X., Jiang B., Zhou H., Sun H. D.: Fitoterapia 71, 713 (2000).
- Yip E. C., Chan A. S., Pang H., Tam Y. K., Wong Y. H.: Cell. Biol. Toxicol. 22, 293 (2006).
- Bollinger M.: *Keře*. Ikar, Praha 1998.
- Dubois J. B., Blazich F.: *Lonicera L.*: <http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Lonicera.pdf>, staženo 14.4.2007.
- Naugžemys D., Žilinskaitė S., Denkovskij J., Patamasytė J., Literkis J., Žvingila D.: Biologija 53, 34 (2007).
- Hummer K. E.: J. Amer. Pomol. Soc. 60, 3 (2006).
- Plekhanova M. N.: Acta Hort. 538, 159 (2000).
- Anonym: <http://www.chovanec.cz/>, staženo 14.2.2007.
- Svarcova I., Heinrich J., Bednar P., Kren V., Cvak L., Ulrichova J., Simanek V., Valentova K.: 50 Years of the Phytochemical Society of Europe, Cambridge, UK, 11.–14. 4. 2007, 94.
- Jin X. H., Ohgami K., Shiratori K., Suzuki Y., Koyama Y., Yoshida K., Ilieva I., Tanaka T., Onoe K., Ohno S.: Exp. Eye. Res. 82, 860 (2006).
- Thompson M., Chaovanalikit A.: Acta Hort. 626, 65 (2003).
- Imanishi H. T., Suzuki T., Masuda K., Harada T.: Sci. Hort. 72, 255 (1998).
- Imanishi H., Kawaguchi T., Suzuki T., Masuda K., Harada T.: Cryo-Lett. 20, 235 (1999).
- Imanishi H., Takada K., Masuda K., Suzuki T., Harada T.: Acta Hort. 626, 445 (2003).
- Ulrichova J., Bednar P., Kren V., Valentova K., Heinrich J., Svarcova I., Svobodova A., Reichenbach R., Cvak L., Simanek V.: 3rd International Conference on Polyphenols and Health, Kyoto, Japan, 25.–28.11.2007, Abstract book (bez editora), str. 165.
- Wang M. F., Li J. G., Rangarajan M., Shao Y., LaVoie E. J., Huang T. C., Ho C. T.: J. Agric. Food. Chem., 46, 4869 (1998).
- Ono M., Koto M., Komatsu H., Igoshi K., Kobayashi H., Ito Y., Nohara T.: Food Sci. Technol. Res. 10, 56 (2004).
- Shahidi F., Nacz M.: *Phenolics in Food and Nutra-ceuticals*. CRC Press, Boca Raton 2003.
- Kumar N., Singh B., Bhandari P., Gupta A. P., Uniyal S. K., Kaul V. K.: Phytochemistry 66, 2740 (2005).
- Kwak W. J., Han C. K., Chang H. W., Kim H. P., Kang S. S., Son K. H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 51, 333 (2003).
- Liu Y. P., Liu J., Jia X. S., Mao Q., Madhu C., Klaassen C. D.: Acta Pharmacol. Sin. 13, 209 (1992).
- Liu Y. P., Liu J., Jia X. S., Mao Q., Klaassen C. D.: Acta Pharmacol. Sin. 13, 213 (1992).
- Kita M., Kigoshi H., Uemura D.: J. Nat. Prod. 64, 1090 (2001).
- Kumar S., Sati O. P., Semwal V. D., Nautiyal M., Sati S., Takeda Y.: Phytochemistry 53, 499 (2000).
- Machida K., Sasaki H., Iijima T., Kikuchi M.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 50, 1041 (2002).
- Prasad D., Juyal V., Singh R., Singh V., Pant G., Rawat M. S.: Fitoterapia 71, 420 (2000).
- Dinda B., Debnath S., Harigaya Y.: Chem. Pharm. Bull. 55, 159 (2007).
- Jensen H. D., Krogfelt K. A., Cornett C., Hansen S. H., Christensen S. B.: J. Agric. Food. Chem. 50, 6871 (2002).
- Machida K., Asano J., Kikuchi M.: Phytochemistry 39, 111 (1995).
- Machida K., Kikuchi M.: Phytochemistry 40, 603 (1995).
- Karakaya S.: Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 44, 453 (2004).
- Cotelle N.: Curr. Top. Med. Chem. 1, 569 (2001).
- Firakova S., Jedinak A., Maliar T., Sturdik E.: Chem. Listy 100, 980 (2006).
- Lachman J., Hamouz K., Cepl J., Pivec V., Sulc M., Dvorak P.: Chem. Listy 100, 522 (2006).
- Pietta P. G.: J. Nat. Prod. 63, 1035 (2000).
- Lin W. L., Hsieh Y. J., Chou F. P., Wang C. J., Cheng M. T., Tseng T. H.: Arch. Toxicol. 77, 42 (2003).
- Chen S. S., Gong J., Liu F. T., Mohammed U.: Immunology 100, 471 (2000).
- Zadernowski R., Nacz M., Nesterowicz J.: J. Agric. Food. Chem. 53, 2118 (2005).
- Thompson M., Chaovanalikit A.: Acta Hort. 2003, 65.
- Kähkönen M., Hopla, A., Heinonen, M.: J. Agric. Food. Chem. 49, 4076 (2001).
- Chaovanalikit A.: *The 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 19.–21.10.2004*, Abstract book (bez editora), str. 9.
- RiceEvans C. A., Miller N. J., Paganga G.: Free Rad. Biol. Med. 20, 933 (1996).
- Chang H. W., Baek S. H., Chung K. W., Son K. H., Kim H. P., Kang S. S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 843 (1994).
- Leung H. W., Wu C. H., Lin C. H., Lee H. Z.: Eur. J. Pharmacol. 508, 77 (2005).
- Leung H. W., Kuo C. L., Yang W. H., Lin C. H., Lee H. Z.: Eur. J. Pharmacol. 534, 12 (2006).

52. Kiningham K. K., StClair D. K.: *Cancer Res.* 57, 5265 (1997).
53. Mates J. M., Aledo J. C., Perez-Gomez C., del Valle A. E., Segura J. M.: *Biochem. Educ.* 28, 93 (2000).
54. McGhie T. K., Walton M. C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 702 (2007).
55. Lea A. G. H.: *HPLC in Food Analysis*. Academic Press, London 1988.
56. Copikova J., Uher M., Lapcik O., Moravcova J., Drasar P.: *Chem. Listy* 99, 802 (2005).
57. Howell A. B.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 273 (2002).
58. Ali B. H., Mousa H. M., El-Mougy S.: *Phytother. Res.* 17, 56 (2003).
59. Rechner A. R., Kuhnle G., Hu H. L., Roedig-Penman A., van den Braak M. H., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: *Free Radical Res.* 36, 1229 (2002).
60. Seeram N. P., Nair M. G.: *J. Agric. Food. Chem.* 50, 5308 (2002).
61. Kowalczyk E., Krzesinski P., Kura M., Szmigiel B., Blaszczyk J.: *Pol. J. Pharmacol.* 55, 699 (2003).
62. Chaovanalikit A., Thompson M. M., Wrolstad R. E.: *J. Agric. Food. Chem.* 52, 848 (2004).
63. Deineka V. I., Sorokopudov V. N., Deineka L. A., Shaposhnik E. I., Kol'tsov S. V.: *Chem. Nat. Compd.* 41, 162 (2005).
64. Bors B.: *Blue Honeysuckle*, http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/dom_fruit/articles/blue_honeysuckle.pdf, staženo 17.2. 2007.
65. Jin X. H., Ohgami K., Shiratori K., Suzuki Y., Koyama Y., Yoshida K., Ilieva I., Tanaka T., Onoe K., Ohno S.: *Exp. Eye Res.* 82, 860 (2006).
66. Duthie S. J., Jenkinson A. M., Crozier A., Mullen W., Pirie L., Kyle J., Yap L. S., Christen P., Duthie G. G.: *Eur. J. Nutr.* 45, 113 (2006).
67. Neto C. C.: *Mol. Nutr. Food. Res.* 51, 652 (2007).
68. Svarcova I., Valentova, K., Ulrichova, J., Simanek, V.: *XXIV Xenobiochemicke sympozium, Liptovsky Jan, 22.–24.5. 2007, Zborník príspevkov* (Boháčová V., Breier A., Zbyňovská D., ed.), str. 76.
69. Chen P. N., Chu S. C., Chiou H. L., Kuo W. H., Chiang C. L., Hsieh Y. S.: *Cancer Lett.* 235, 248 (2006).
70. Serraino I., Dugo L., Dugo P., Mondello L., Mazzon E., Dugo G., Caputi A. P., Cuzzocrea S.: *Life Sci.* 73, 1097 (2003).
71. Cooke D., Steward W. P., Gescher A. J., Marczylo T.: *Eur. J. Cancer* 41, 1931 (2005).
72. Kwon J. Y., Lee K. W., Hur H. J., Lee H. J.: *Sig. Transduction Pathways, Pt C*, 1095, 513 (2007).
73. Schmidt B. M., Erdman J. W., Lila M. A.: *Cancer Lett.* 231, 240 (2006).
74. Roy S., Khanna S., Alessio H. M., Vider J., Bagchi D., Bagchi M., Sen C. K.: *Free Radical Res.* 36, 1023 (2002).
75. Broadhurst C. L., Polansky M. M., Anderson R. A.: *J. Agric. Food. Chem.* 48, 849 (2000).
76. McDougall G. J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D.: *J. Agric. Food. Chem.* 53, 5896 (2005).

J. Heinrich^a, I. Švarcová^b and K. Valentová^b
^aWalmart Co., Trinec, Czech Republic, ^bDepartment of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic): ***Lonicera caerulea*: A Prospective Functional Food and a Source of Biologically Active Compounds**

Purpose of Review

This review deals with the botany and chemical composition of *Lonicera caerulea* L.

(honeysuckle) and the biological activity of its main constituents, focusing on potential health benefits of the berries.

Findings

L. caerulea berries are a rich source of phenolics such as phenolic acids as well as anthocyanins, proanthocyanidins and flavonoids, which show health promoting effects. The consumption of *L. caerulea* berries may prevent chronic diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases and cancer, depending on the content of phenolics in the berries.

Conclusions

The potential of *L. caerulea* berries to prevent chronic diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases and cancer seems to be related to their phenolics content.

HUMÍNOVÉ KYSELINY. PŮVOD A ŠTRUKTÚRA

MARIANNA SKOKANOVÁ
a KATARÍNA DERCOVÁ*Oddelenie biochemickej technológie, Ústav biotechnológie
a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej tech-
nológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9,
812 37 Bratislava
marianna.skokanova@stuba.sk*

Došlo 3.5.07, prepracované 16.10.07, prijaté 27.11.07.

Kľúčové slová: humínové kyseliny, humínové látky, imo-
bilizácia, pentachlórfenol, PCP, xenobiotiká

Obsah

1. Úvod
2. Zloženie a štruktúra humínových kyselín (HK)
3. Pôvod, prekursori a frakcionácia humínových látok (HL)
 - 3.1. Humifikácia
 - 3.2. Prekursori HK
 - 3.3. Frakcie HL
4. Záver

1. Úvod

Vedecký výskum humínových látok (HL) a ich využitelné vlastnosti majú dlhú tradíciu v Nemecku, ktorá začala prácou chemika Franza Carla Acharda (1753–1821). Komerčné využitie hnedého uhlia obsahujúceho humínové kyseliny (HK), ktoré sa využívalo v Nemecku v 19. storočí napr. ako farbivý materiál pod označením „Cologne brown“ z oblasti lignitových baní v okolí Cologne a „Kassler brown“, sa stáva opäť aktuálnym aj v 21. storočí, ale v širších aspektoch a možnostiach využitia. V priebehu minulého storočia boli humínové látky využívané najmä v poľnohospodárskom, medicínskom, veterinárnom a environmentálnom sektore. V priebehu posledných desaťročí sú predmetom aj intenzívneho vedeckého záujmu¹.

Humínové látky sú prírodné organické zlúčeniny, ktoré vznikajú chemickým a biologickým rozkladom organickej hmoty (zvyškov rastlín, živočíchov apod.) a syntetickou činnosťou mikroorganizmov. Zdrojom HL pre priemyselné využitie sú kaustobility – rašelina, lignit a zoxidované hnedé uhlie, tzv. oxyhumolit². Ako vhodnú surovinu na získanie humínových látok možno použiť

prírodné oxyhumolity s vysokým obsahom humínových kyselín. Prírodzene sa vyskytujú aj v niektorých ďalších materiáloch, a to v sedimentoch, zeminách a hnedom uhli. Obsah humínových látok v prírodných matriciach kolíše od stopových množstiev (piesky, íly), cez jednotky percent (3 % v bežných zeminách) až k desiatkam percent (3–10 % v hnedom uhli). Mimoriadne vysoký obsah vykazuje lignit, rašelina a oxyhumolit – až do 85 % (cit.^{3–5}). Pôdne HL sa vo všeobecnosti vyznačujú podobnými vlastnosťami v porovnaní s HL z iných prírodných zdrojov, z výsledkov elementárnych analýz boli zistené iba malé rozdiely v ich zložení a štruktúre⁶.

Humínové látky pozostávajú z humínových kyselín, fulvokyselín a humínu. V tabuľke I je uvedený obsah fulvokyselín a humínových kyselín v jednotlivých prírodných matriciach.

2. Zloženie a štruktúra HK

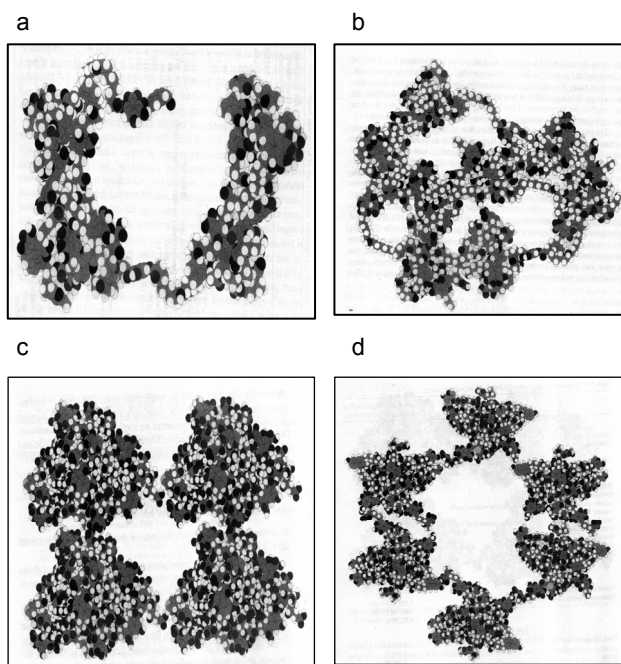
Molekulová hmotnosť HL sa pohybuje v rozmedzí od 2 do 200 kDa. Sú to látky štruktúrne veľmi zložité a doposiaľ nie úplne presne popísané. V minulosti sa objavilo viacero pokusov predpovedať ich typickú alebo priemernú štruktúru. V súčasnosti, najmä z dôvodu značného pokroku a vývoja metód a postupov používaných na riešenie ich zloženia a štruktúry, existujú početné štúdie zaoberajúce sa touto problematikou^{7–9}. Niektoré z navrhovaných predpokladaných hypotetických štruktúr a konformácií jednej z najdôležitejších frakcií HL – humínových kyselín (HK) – sú uvedené na obr. 1 a 2.

Napriek tomu, že jednotlivé varianty predpokladaných štruktúr HK mali slúžiť na objasnenie chémie humí-

Tabuľka I

Obsah humínových kyselín a fulvokyselín v prírodných matriciach¹

Prírodný zdroj	Obsah humínových a fulvokyselín [%]
Leonardit/humát	40–85
Čierna rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnedé uhlie	10–30
Hnoj	5–15
Kompost	2–5
Pôda	1–5
Kal	1–5
Čierne uhlie	0–1



Obr. 1. Predpokladané štruktúry humínových kyselín⁹: a – dimér, b – trimér, c – tetramér, d – hexamér

nových látok, treba si uvedomiť že poznanie týchto látok je skôr spojené s poznaním vlastností celku ako jednotlivých molekúl⁶.

V dôsledku chemického zloženia (aromatické jadro s alifatickými reťazcami a špecifickým obsahom rôznych funkčných skupín) sú HK schopné viazať polárne i nepolárne zlúčeniny. Zo všetkých funkčných skupín celkovo prítomných v HK sa ako najviac reaktívne javia karboxylové a aromatické, vrátane fenolických^{10,11}. Okrem týchto sú v HK prítomné aj iné skupiny, napr. enolové, chinónové, hydrochinónové, laktónové, éterové a alkoholové, dokonca v menších množstvách môžu byť zastúpené aj dusíkové, sírové a fosforové funkčné skupiny alebo mostíky⁶.

V pôdnom prostredí vytvárajú HK aj organo-minerálne komplexy^{12,13}, pričom sorpcia HK závisí jednak na type ílového minerálu, ale tiež na chemickej štruktúre HK (funkčné skupiny, stupeň humifikácie, stupeň polymerizácie, stupeň oxidácie). Za hlavný mechanizmus väzobného procesu HK považujú Eglite a Klavins¹⁴ iónovo-výmenné reakcie. Hayes a Malcolm¹⁰ zistili, že hodnoty kationovej výmennej kapacity humínových látok sa zvyšujú priamo úmerne s pH hodnotou vodného média. Simpson a spol.¹⁵ zistili pri interakciách modelovej HK na ílový minerál veľmi vysokú afinitu alifatických komponentov a tiež určitú afinitu aromatických častí HK k ílovému povrchu na rozdiel od aminových kyselín viazaných na uhlíkovodíky, ktoré vykazujú veľmi nízku afinitu k ílovému povrchu. Barančíková a spol.¹⁶ študovali závislosť sorpcie kadmia od obsahu HK v pôdnom materiáli. Bola zazname-

naná lineárna závislosť medzi mierou sorpcie tohto ťažkého kovu do pôdy a počtom karboxylových skupín v humínových kyselinách.

Údaje z elementárnych analýz vzoriek HK pochádzajúcich z rozmanitých zdrojov sa odlišujú v elementárnom zložení ako aj reaktivitou¹⁷. Pomery prvkov C/H, C/O a C/N sa rôznia v závislosti od podmienok vzniku HL. Vo všeobecnosti možno povedať, že počas procesu tvorby HK, teda v priebehu humifikácie, sa v nich zvyšuje obsah COOH a C=O skupín, pričom obsah alkoholových a fenolických OH skupín a skupín OCH₃ sa počas tohoto procesu znižuje.

Hlavný rozdiel v obsahu funkčných skupín HK a FK je, že vo FK je prakticky všetok kyslík obsiahnutý v COOH, OH a C=O skupinách, zatiaľ čo v HK väčšia časť kyslíka tvorí štruktúrnú zložku, tzv. „jadro“, čo sú napríklad éterové a esterové väzby. Ďalším rozdielom môže byť fakt, že obsah ketónových C=O skupín je vyšší v FK, kým v HK sa nachádzajú skôr chinónové C=O skupiny⁶.

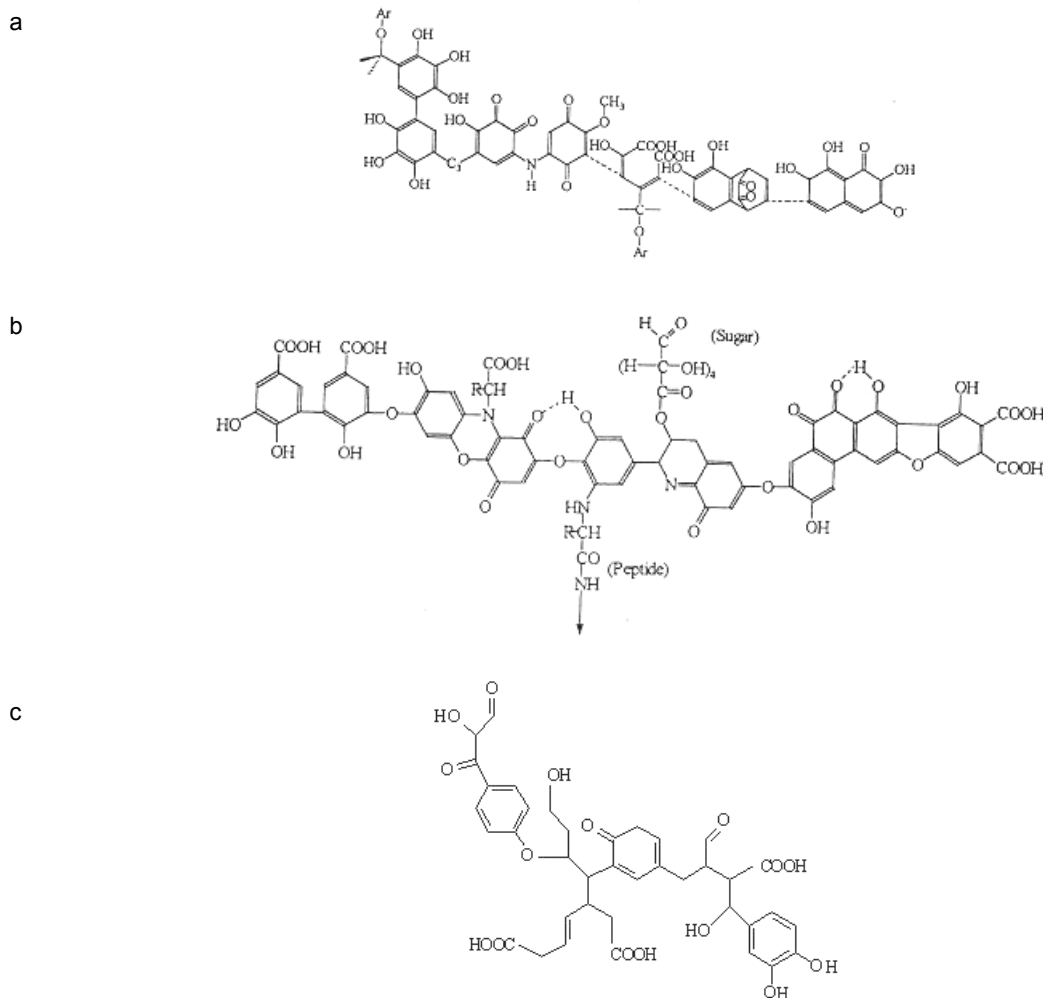
V tabuľke II sú uvedené základné charakteristiky humínových kyselín izolovaných z dvoch prírodných matric, ktoré z hľadiska obsahu HK patria k najbohatším zdrojom, a to lignit a oxyhumolit. Je možné konštatovať, že HK izolované z lignitu vykazujú vyšší obsah takmer všetkých základných prvkov (C, N a O), ako aj vyšší obsah aromatického uhlíka ako HK izolovaná z oxyhumolitu, z čoho vyplýva vyšší stupeň aromaticity (α). Môžeme teda zhrnúť, že HK izolované z lignitu obsahujú viac aromatických štruktúr v porovnaní s HK izolovanými z oxyhumolitu, ktoré sú naopak bohatšie na alifatické reťazce.

Podľa výsledkov získaných Simpsonom a spol.¹⁹ tvoria majoritnú molekulovú štruktúru HL alifatické kyseliny, étery, estery a alkoholy, ďalej aromatické fragmenty odvodené z lignínu a polysacharidy a polypeptidy s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou do 2000 Da.

Z pohľadu reaktivity humínových látok resp. humínových kyselín majú značnú schopnosť interagovať s takmer všetkými zlúčeninami a štruktúrami v ich prirodzenom okolí (organické a anorganické molekuly, minerálne ióny ako aj minerálne a mikrobiálne povrchy)²⁰.

3. Pôvod, prekursori a frakcionácia HL

Počas minulého storočia bol výskum pôvodu humínových látok veľmi populárnou oblasťou. Napriek tomu, že presný mechanizmus vzniku HL dodnes nie je úplne objasnený, boli vyformované tri hlavné teórie (obr. 3). Prvou bola teória, že HL boli odvodené z lignifikovaných pletív rastlinných zvyškov, druhá uprednostňovala mechanizmus zahrňujúci chinóny a tretia teória podporovala vznik HL z jednoduchých cukrov, pričom v tejto poslednej teórii mali prebiehať reakcie medzi redukujúcimi cukrami a aminokyselinami za vzniku hnedých dusík obsahujúcich polymérov. Tieto procesy sú všeobecne známe ako „Millardove reakcie“ (cit.⁶).



Obr. 2. Štruktúry molekúl humínových kyselín podľa rôznych autorov: a – Flaig (1960), b – Stevenson (1982), c – Stein a spol. (1997), (cit.⁶)

Tabuľka II

Základné charakteristiky humínových kyselín izolovaných z lignitu¹⁸ a oxyhumolitu

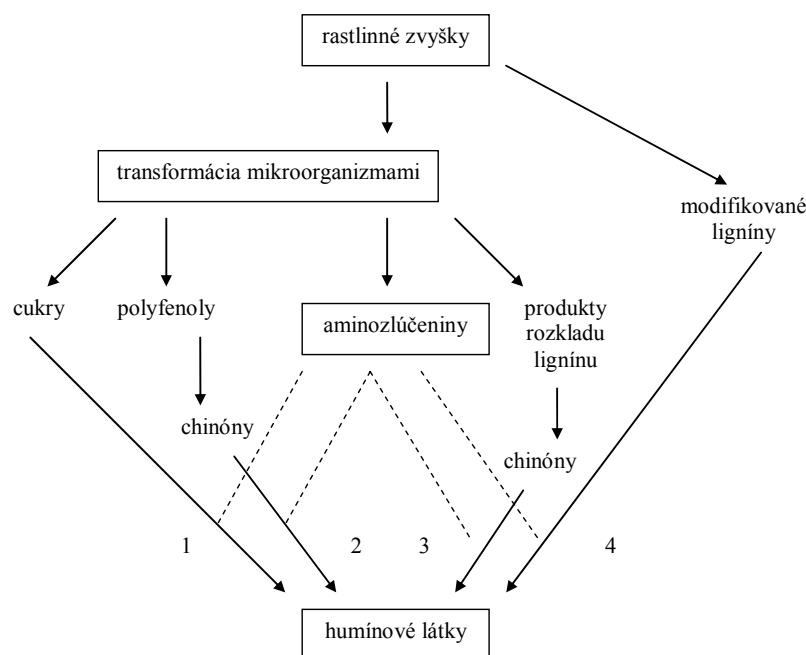
HK (zdroj)	Parameter								
	C [at. %]	H [at. %]	N [at. %]	O [at. %]	COOH [meq g ⁻¹ HK]	E ^{1%} ₆	C _{alif} [%]	C _{arom} [%]	α [%]
HK (lignit)	51,1	28,8	1,1	19,0	4,5	28,7	34,7	44,0	55,9
HK (oxyhumolit)*	43,6	38,3	0,8	17,3	–	–	45,0	39,0	46,4

* Skokanová M., nepublikované výsledky

Pôdny organický materiál je odvodený z pôdnej biomasy a striktné povedané pozostáva zo živého a tiež mŕtveho organického materiálu. Je to najdôležitejšia časť v pôde a už v dávnych dobách vzbudzovala pozornosť poľnohospodárov, pretože určuje fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti pôdy²¹. Z agronomického hľadiska sa organická hmota delí na aktívnu (labilnú) a stabilnú. Do

aktívnej časti patria rastlinné zvyšky, biomasa a nehumusové látky, ktoré nie sú pútané na minerálne zložky, a zároveň je táto časť aj zdrojom živín (N, P, S) pre rast rastlín. Stabilná zložka (humus) slúži na zásobovanie rastlín živinami a je dôležitá pre dlhodobú rovnováhu v pôde^{22,23}.

Mŕtvy organický materiál nazývaný humus (latinský názov pre pôdu alebo vegetáciu), je akceptovaný pre tieto



Obr. 3. Mechanizmy vzniku humínových látok: Aminozlúčeniny syntetizované mikroorganizmami reagujú s modifikovaným lignínom (4), chinónmi (2, 3) a redukujúcimi cukrami (1), čím sú tvorené tmavo sfarbené látky, (cit.⁶)

mítve rezíduá mnohými vedcami dodnes. Rozložiteľná čierno-sfarbená organická hmota v pôde definovaná ako humus je alkalicky extrahovateľná. Niektorí autori navrhovali, aby sa termín humus zamenil za termíny nehumínový materiál a humínový materiál⁹. Termín nehumínové materiály sa začal používať ako náprotivok k čierno-sfarbenej humínovej hmote, kde zaradujeme fulvokyseliny a farebné rozkladné materiály organického pôvodu. K nehumínovej hmote patria materiály, ktoré vznikli rozkladom pozostatkov rastlín a iných organizmov, sú to uhľohydráty, aminokyseliny, proteíny, lipidy, vosky, nukleové kyseliny, lignín a mnohé ďalšie organické zlúčeniny. Táto časť humusu obsahuje vo všeobecnosti všetky látky syntetizované rastlinami a ostatnými pôdnymi organizmami. Tieto zlúčeniny sú väčšinou ďalej degradované a rozkladané a sú hlavným zdrojom pre syntézu a vznik humínovej frakcie pôdy. Tieto procesy sa súborne nazývajú humifikácia.

3.1. Humifikácia

Proces, v ktorom vznikajú humínové látky – humifikácia, zahŕňa množstvo biochemických reakcií. Úzko súvisí s organickým a dusíkovým cyklom v environmente. Existujú dve teórie vzniku humínových látok⁹, ktoré sa líšia v tom, ako sa prvotné a základné látky využívajú v syntéze humínových látok. Jedna teória je založená na depolymerizácii biopolymérov vedúcej k vzniku humínových látok. Ďalšia teória uvažuje o polymerizácii malých molekúl, uvoľnených po kompletnom rozklade biopoly-

mérov, za vzniku humínových látok. Všetky teórie súhlasia s tým, že materiál pre vznik humínových látok je väčšinou rastlinného, ale aj živočíšneho pôvodu. Hayes a Malcom¹⁰ tvrdia, že stupeň depolymerizácie závisí od obsahu kyslíka a humifikácia by bola spomalená v anaeróbných podmienkach. Je pravda, že veľké množstvo kyslíka je potrebné na oxidačné reakcie, ale vyvstáva otázka, či nedostatok kyslíka inhibuje humifikačné procesy. Vlhké pôdy sú totiž bohaté na humínové látky, ale sú tam prevažne anaeróbne podmienky.

Tvorba humusu pozostáva z troch základných fáz²⁴:

1. V podmienkach priaznivých teplôt, vlhkosti a prevzdušnenia existuje veľmi silná činnosť aeróbných baktérií, ktoré rozkladajú organickú hmotu na jednoduché zložky (CO_2 , H_2O , NH_3 , oxidy, aj.) – dochádza k mineralizácii a humus sa veľmi rýchlo rozkladá.
2. Počas obmedzeného prístupu vzduchu – anaeróbných podmienok – dochádza k nedostatočnej oxidácii, kyslej reakcii prostredia. Navyše ak pôsobí nízka teplota a vysoká vlhkosť, dochádza k premene organickej hmoty, tzv. rašelineniu alebo uhoľnatienu. Ide o nedokonalý rozklad organických zvyškov, je to vlastne enzymatický a biochemický proces spôsobený najmä anaeróbnymi baktériami, čoho výsledkom sú humínové a ulmínové látky tmavohnedo-čiernej farby s vysokým obsahom uhlíka.
3. Samotná humifikácia je proces prevažne anaeróbný, súbor prevažne enzymatických a biochemických pochodov, pri ktorých sa z medziproduktov rozkladu tvoria tzv. humínové látky. Pomer obsahu uhlíka

k dusíku je 1:10, majú hnedú až čiernohnedú farbu a vlastnosti koloidov. Humifikácia sa uskutočňuje mineralizáciou východiskových látok, nikdy nezhumifikuje všetka organická hmota:

- článkom tvorby HL je kondenzácia štruktúrnych jednotiek, ku ktorej dochádza oksyločením fenolov cez fermenty typu fenoloxidáz vedúcim k tvorbe chinónu a vzájomnej reakcii chinónov s aminokyselinami a peptidmi,
- záverečnou fázou je polymerizácia (polykondenzácia). Tá je reverzibilným procesom a preto je nutné, aby bol produkt z prostredia odvádzaný, inak môže dôjsť k rozpadu už vytvorených kondenzátov (napr. pri nadbytku vody v pôde),
- optimálne podmienky sú periodické vlhčenie a vysychanie, striedanie aeróbných a anaeróbných procesov.

Obsah humusu je hodnotou relatívne stálou v pôdnych klimatických podmienkach v danej oblasti. Bolo preukázané, že uhlík v HK je starý 750 rokov, vo FK 420 rokov a v humínoch 2400 rokov²⁵.

3.2. Prekurzory HK

Prekurzory humínových látok sú lignín, fenoly a polyfenoly, chinóny, proteíny a aminokyseliny, uhľovodíky, lipidy, steroly a steroidy, nukleové kyseliny, rast podporujúce látky ako aj xenobiotiká.

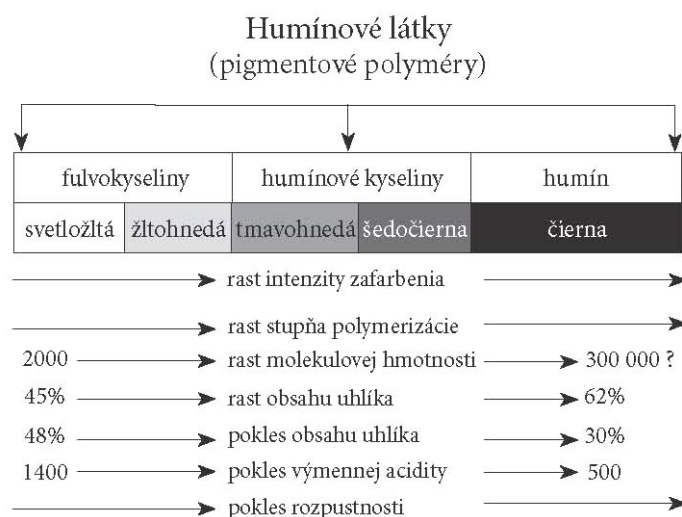
Fenoly a polyfenoly môžu byť odvodené z dvoch zdrojov, z rozkladu lignínu a zo syntetickej činnosti mikroorganizmov⁹. Biodegradácia lignínu môže viesť k produkcii polyfenolov a fenolov. U niektorých druhov húb (*Basidiomycetes*, *Ascomycetes*) bola zistená schopnosť

atakovať lignín, zlúčeninu, ktorá je vo všeobecnosti veľmi rezistentná k mikrobiálnemu rozkladu. Tieto mikroorganizmy atakujú lignín pomocou extracelulárnych enzýmov z fenoloxidázovej skupiny, ktorú môžeme rozdeliť na dva základné typy enzýmov, tyrozinázu a lakkázu. Mikrobiálne fenoly ako prekurzory humínových látok sú produkované aj mikroorganizmami. Existuje široká škála fenolických a hydroxy-aromatických kyselín, u ktorých je známe, že ich syntetizujú mikroorganizmy z nearomatických uhľovodíkových zlúčenín. Mnoho húb, aktinomycét a baktérií bolo identifikovaných ako schopných syntetizovať jednoduché fenoly a komplexné polyfenoly. Jedným z takýchto mikroorganizmov je aj baktéria *Rhodococcus erythrophylis* CCM 2595, ktorá disponuje schopnosťou degradovať fenolické zlúčeniny a bola vybraná ako modelový prokaryotický organizmus v sorpčných experimentoch humínových kyselín na povrchu týchto bakteriálnych buniek²⁰. Avšak táto schopnosť bola zatiaľ lepšie charakterizovaná u húb a aktinomycét než u baktérií²².

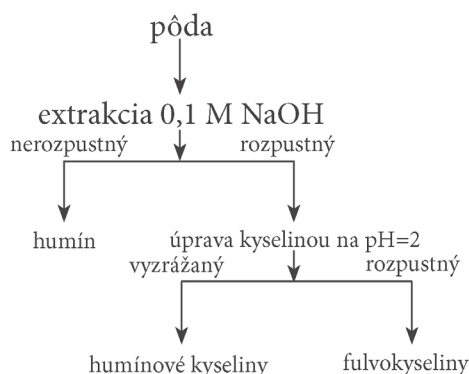
3.3. Frakcie HL

Humínové kyseliny reprezentujú spolu s fulvo kyselinami a humínom tri základné frakcie humusu (obr. 4), ktoré tvoria jeho podstatnú časť. Humínové kyseliny však patria medzi najdôležitejšie frakcie humifikovanej pôdnej organickej hmoty, pretože na rozdiel od fulvo kyselín a humínu, ktoré sa podieľajú asi 8 % na celkovom kolobehu uhlíka, podiel humínových kyselín je až 16 % (cit.²⁶).

Humínové látky predstavujú komplex organických zlúčenín rozpustných v hydroxidoch, soliach a organických rozpúšťadlách. Charakteristickou črtou humusových látok je ich heterogénnosť, podmienená prítomnosťou zložiek na rozličnom stupni humifikácie humusotvorného



Obr. 4. Najdôležitejšie vlastnosti a rozdelenie humínových látok (upravené podľa cit.³)



Obr. 5. Schéma extrakcie humínových látok z pôdy, rašeliny alebo z iných prírodných matric, upravené podľa cit.⁹

materiálu s nerovnakým chemickým zložením²³.

Humínové látky definujeme ako zmes amorfnych, polydisperzných zlúčenín žltej až hnedočiernej farby. Sú heterogénnou skupinou prírodných organických molekúl s komplikovanou polymérnou štruktúrou a tvoria neoddeliteľnú súčasť pôdnej a vodnej organickej hmoty. 60–80 % celkového organického uhlíka v pôde sa vyskytuje vo forme humínových kyselín. 50–75 % rozpustnej organickej hmoty vo vode pozostáva z fulvo a humínových kyselín²⁰. Humínové zlúčeniny sú hydrofilné, kyslé a majú veľkú molekulovú hmotnosť, dosahujúcu od niekoľko stoviek po tisíce atómových jednotiek (Au) alebo daltonov. Pochádzajú z rozkladu organických frakcií, vzniknutých reakciou nazývanou humifikácia (časť 3.1.) a väčšinou sú získavané z pôdy alebo iných prírodných zdrojov pomocou extrakcie, frakcionácie a izolačných procedúr so zásaditými a kyslými roztokmi (obr. 5).

Frakcionácia pôdnej organickej hmoty (POH) môže byť uskutočnená podľa viacerých metód, biologicky, chemicky a fyzikálne²⁷, avšak pátranie po vhodných extrakčných činidlách je stále prioritnou otázkou v oblasti humínových látok. Ideálne činidlo by malo odstrániť z materiálu prakticky všetok humínový materiál bez ovplyvnenia fyzikálnych a chemických vlastností jeho jednotlivých frakcií. Počas posledných desaťročí bolo vyvinutých a odskúšaných niekoľko užitočných procedúr s rôznou účinnosťou. Napriek testovaniu veľkého množstva extrakčných činidiel, vodný roztok NaOH stále zostáva najbežnejšie používaným a kvantitatívne najúčinnnejším činidlom na extrakciu HL z rozličných zdrojov. Najmodernejšími v súčasnosti využívanými metódami sa stávajú gély a chromatografické kolóny s aktívnym uhlím²⁸.

Humínové kyseliny (HK) tvoria najkvalitnejšiu zložku humusových látok. Sú to polyméry tmavohnedej až čiernej farby. Ich základnou jednotkou sú aromatické mikrojadrá fenolického alebo chinoidného typu, na ktoré sa prostredníctvom mostíkov typu (-O-, -NH-, -N-, -S-, -CH₂-) napájajú v bočných reťazcoch funkčné skupiny. V jadre sa môžu nachádzať benzén, furán, naftalén, antracén, pyridín a iné. Funkčné skupiny sa môžu vyskytovať v tvare: -COOH, -OH, -NH₂, -CH₃, -SO₃H, C=O, -OCH₃,

-PO₃H₂.

Fulvokyseliny (FK), ako aj ich soli (fulváty), sa v pôde najčastejšie vyskytujú v adsorbovanej forme. S oxidmi železa a hliníka vytvárajú organominerálne zlúčeniny²⁹. Majú charakteristické žlté sfarbenie (fulvus = žltý), sú menej kondenzované ako humínové kyseliny, sú rozpustné vo vode a v zriedených kyselinách. Sú charakteristické najmä pre kyslé pôdy²⁵. Vďaka svojim vlastnostiam, najmä obsahu kyslých funkčných skupín, sú známe ako najreaktívnejšia frakcia HL vo vodnom prostredí³⁰.

Humíny (H) sú humusové látky nerozpustné v alkalických roztokoch. Sú kondenzovanejšie a silnejšie dehydrované ako humínové kyseliny. Sú to karbonizované organické látky, ktoré sú pevne viazané na minerálny podiel vody a nedajú sa získať ani mnohonásobnou extrakciou alkáliami z dekalcinovanej pôdy²³. Humíny sú spolu s humusovým uhlím (HU) podľa niektorých autorov v podstate HK pevne viazané na minerálny podiel pôdy, podľa iných prameňov sa jedná o silne karbonizovanú organickú hmotu charakterizovanú ako nerozpustné HK. Vykazujú vysoký stupeň kondenzácie a polymerizácie, nehydrolyzujú a podľa Najmra stratili funkciu pravého humusu. Dusík H a HU obsahuje 20–30 % z celkového dusíka v pôde²⁵.

4. Záver

Napriek tomu, že humínové kyseliny sú predmetom záujmu výskumu viac ako sto rokov, množstvo dôležitých informácií o týchto látkach nie je stále známych a ich chemická štruktúra nie je do súčasnosti úplne vyriešená. Štruktúra prírodných humínových kyselín je vhodná pre sorpčné, iónovo-výmenné a biodegradačné procesy. Keďže ako prekurzory HK sú uvádzané aj xenobiotiká, javia sa ako potenciálne vhodné aj na detoxifikáciu kontaminantov prítomných v životnom prostredí, ktoré sa tam dostali predovšetkým ako základné zložky dlhodobo používaných pesticídov. Táto problematika ako aj interakcie HK s kontaminantmi sú predmetom druhej časti príspevku.

Zoznam skratiek

HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
FK	fulvokyseliny
OMK	organo-minerálny komplex
PCP	pentachlórfenol
POH	pôdna organická hmota
H	humín
HU	humusové uhlie

LITERATÚRA

1. <http://www.humintech.com/>, stiahnuté 26.3.2007.
2. Antoňová B., Kozler J., Novák J., Kubiček J., Horová D., Vondrová I.: ChemZi 1, 256 (2005).

3. Veselá L., Kubal M., Kozler J., Innemanová P.: Chem. Listy 99, 711 (2005).
4. Klučáková M.: *International Scientific Conference: Humic Substances in Ecosystems 5, Duszyniki Zdroj 2003*. Proceedings, str. 39.
5. Kučerík J., Pekař M., Klučáková M.: Petrol. Coal 45, 58 (2003).
6. <http://www.fch.vutbr.cz/home/kucerik/frame1.htm>, stiahnuté 20.5.2007.
7. Klučáková M., Pekař M.: J. Polym. Mater. 20, 145 (2003).
8. Klučáková M., Pekař M.: J. Polym. Mater. 20, 155 (2003).
9. Tan K. H.: *Humic Matter in Soil and the Environment: Chemical Composition of Humic Matter*. Marcel Dekker, New York 2003.
10. Hayes M. H. B., Malcolm R. L., v knihe: *Humic Substances and Chemical Contaminants*, (Clapp C. E., Hayes M. H. B., Senesi N., Bloom P.R., Jardine P. M., ed.), s. 3. Soil Science Society of America, Madison 2001.
11. Szpoganicz B., da Silva M. R., Gomes A. P. N., Fernandes A. N., de Sierra M. M. S.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), s. 353.
12. Burdon J.: Soil Science 166, 752 (2001).
13. Schulten H. R., v knihe: *Humic Substances and Chemical Contaminants*, (Clapp C. E., Hayes M. H. B., Senesi N., Bloom P.R., Jardine P. M., ed.), s. 73. Soil Science Society of America, Madison 2001.
14. Eglite I., Klavins M.: *11th International meeting of the Humic Substances Society: Humic Substances: Nature's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, s. 264.
15. Simpson A., Kingery W., Foan E., Hatcher P.: *11th International meeting of the Humic Substances Society: Humic Substances: Nature's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, s. 447.
16. Barančíková G., Brečková V., Dlugoš J.: Rostl. Výroba 43, 107 (1997).
17. MacCarthy P., v knihe: *Humic substances: Structures, Models and Functions* (Ghabbour E. A., Davies G., ed.), s. 19. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001.
18. Barančíková G., Klučáková M., Madaras M., Makovníková J., Pekař M.: Humic Substances in the Environment 3, 3 (2003).
19. Simpson A. J., Kingery W. L., Hayes M. H. B., Spraul M., Humpfer E., Dvorstsak P., Kesserbaum R. M., Godejohann M., Hofmann M.: *10th International meeting of the Humic Substances Society, Toulouse, France 2000*. Proceedings, s. 1109.
20. Feifířová D., Čejková A., Masák J., Siglová M., Jirků V.: *Third European Bioremediation Conference, Crete, Chania, Greece 2005*. Proceedings (Kalogerakis N., ed.), s. 143.
21. Tan K. H.: *Environmental Soil Science*. Marcel Dekker, New York 2000.
22. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons, New York 1994.
23. Stanovič R.: *Dizertačná práca*. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra 2004.
24. <http://wwwold.fle.czu.cz/~web/studium>, stiahnuté 25.1.2007
25. http://www.af.mendelu.cz/external/relay/agrochem/multitexty/html/agrochemie_pudy/OL_humifikovane.htm, stiahnuté 23.8.2007.
26. Passo N., Peuravouri J., Lehtonen T., Pihlaja K.: Environ. Int. 28, 173 (2002).
27. Olk D. C., Gregorich E. G., Farenhorst A., Hayes M. H. B., Paul E. A., Simpson M. J.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), s. 21.
28. Schnitzer M., Khan S. U.: *Humic Substances in the Environment*, s. 9. Marcel Dekker, New York 1972.
29. Scheffer F., Schachtschabel P.: *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1989.
30. Estevez da Silva J. C. G., Pereira C. C. C., Antunes M. C. G., Rodrigues P. M. S. M.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), s. 889.

M. Skokanová and K. Dercová (Department of Biochemical Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic): **Origin and Structure of Humic Acids**

Humic acids are a major part of naturally occurring organic humic substances. They can be isolated from several natural matrices (soil, peat, oxyhumolite, and lignite) where they occur in different amounts. Humic acids are amorphous mixtures of reactive aromatics with phenolic and carboxylic groups. They are used in agriculture, medicine, and environment protection.

TVORBA FIBRINU A JEHO DEGRADACE

ROMAN KOTLÍN a JAN E. DYR

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1,
128 20 Praha 2
kotlinr@centrum.cz

Došlo 11.10.07, přijato 5.12.07.

Klíčová slova: fibrinogen, fibrin, koagulace krve

Obsah

1. Úvod
2. Přeměna fibrinogenu na fibrin
 - 2.1. Aktivace trombinu
 - 2.2. Odštěpování fibrinopeptidů
 - 2.3. Polymerace fibrinu
 - 2.4. Kovalentní stabilizace fibrinové sítě
3. Fibrinolýza
4. Patofyziologie fibrinogenu
5. Závěr

1. Úvod

Proces přeměny fibrinogenu na fibrin je důležitým fyziologickým dějem, který se účastní procesu hemostázy. Jedná se o složitý, vysoce regulovaný biochemický děj, jehož poruchy mohou vést k závažným život ohrožujícím stavům. V tomto článku se pokusíme shrnout dosavadní znalosti o přeměně fibrinogenu na fibrin, neboť aktualizovaný přehled ohledně tohoto procesu v české odborné literatuře stále chybí.

2. Přeměna fibrinogenu na fibrin

Trombinem katalyzovaná přeměna fibrinogenu na fibrinovou síť je společná všem dosud žijícím obratlovcům¹. Proces přeměny fibrinogenu na fibrin lze rozdělit do několika kroků: aktivace trombinu, odštěpení fibrinopeptidů katalyzované trombinem, polymerace fibrinových monomerů, laterální asociace protofibril a kovalentní stabilizace fibrinového klotu.

2.1. Aktivace trombinu

Tělo si neustále udržuje rovnováhu mezi koagulací a degradací fibrinové sítě (fibrinolýzou). Ústřední úlohu

zde hraje serinová proteasa α -trombin (dále jen trombin), která v krevním řečišti cirkuluje v inaktivní formě zvané protrombin. Trombin, jako jeden z klíčových koagulačních faktorů, poprvé popsal A. Buchanan v roce 1836 (cit.²) a později v roce 1845 (cit.³). Molekula protrombinu je sestavena z jednoho řetězce o molekulové hmotnosti 65,7 kDa, tvořeného 582 aminokyselinovými zbytky⁴. Působením serinové proteasy aktivovaného faktoru Xa (EC 3.4.21.6) dojde nejprve k hydrolytickému štěpení vazby mezi arginylem³²⁰ a isoleucylem³²¹ a následně ke štěpení vazby za Arg271 (cit.⁵). Tím vznikne aktivní molekula trombinu, která je sestavena ze dvou polypeptidových řetězců – lehkého (36 aminokyselinových zbytků) a těžkého (259 aminokyselinových zbytků), které jsou kovalentně spojeny S-S vazbou mezi zbytky Cys293 a Cys439 (číslováno v sekvenci protrombinu). Trombin je schopen odštěpovat první aktivační peptid z molekuly protrombinu a tím zesiluje aktivaci dalších molekul trombinu⁶.

Aktivní místo trombinu tvoří Ser195, His57 a Asp189, které jsou nezbytné pro neutrofilní atak cílové peptidové vazby⁷. V molekule trombinu nalézáme ještě další dvě důležitá místa. Jsou to elektropozitivní povrchové oblasti I a II (označované jako exosite I a exosite II), které specificky interagují se záporně nabitými částmi molekul substrátů (např. fibrinogenu) a kofaktorů. Oblast I je tvořena zbytky⁸ Lys36, His71, Arg73, Arg75, Tyr76, Arg77 a Lys109/110. Oblast II je tvořena aminokyselinovými zbytky⁹ Arg93, Lys236, Lys240, Arg101 a Arg233. Přes oblast I se uskutečňuje vazba thrombomodulinu, fibrinogenu nebo faktoru V, přes oblast II se váže heparin, fibrinogen, faktor V nebo GPIIb α (cit.⁷). Dalším důležitým místem v molekule trombinu je Na⁺ vazebné místo, kam se váže sodný ion, který alostericky reguluje aktivitu trombinu⁹. Pokud jsou ionty Na⁺ navázány, trombin upřednostňuje prokoagulační substráty – fibrinogen, faktor V, faktor VIII nebo protein PAR1 (receptor 1 aktivovaný proteina-sou)⁹. Pokud ionty Na⁺ navázány nejsou, upřednostňuje trombin protein C jako substrát⁹. Dalšími důležitými oblastmi trombinu je γ -smyčka a 60-smyčka. 60-Smyčka je tvořena převážně prolinovými zbytky a pomocí hydrofobních interakcí podporuje vazbu substrátu v jeho N-koncové části⁷. γ -Smyčka je hydrofilní a interaguje s C-koncovými částmi substrátů⁷.

Při poranění dochází k uvolnění tkáňového faktoru z endotelu poškozené cévní stěny¹⁰. Tkáňový faktor se následně váže na serinovou proteasu faktor VII (EC 3.4.21.21), která ve spolupráci s ionty Ca²⁺ a destičkovými fosfolipidy proteolyticky aktivuje faktor X (cit.¹¹). Aktivovaný faktor Xa (EC 3.4.21.6) v kooperaci s faktorem Va, ionty Ca²⁺ a destičkovými fosfolipidy přeměňuje protrombin na trombin¹². Generace trombinu vyvolá silnou pozitivní zpětnovazebnou reakci tím, že trombin aktivuje krevní destičky a faktory V a VIII kontaktní fáze koagulace¹².

Na membráně krevních destiček či endotheliálních buněk se aktivovaný faktor VIIIa váže na serinovou proteasu faktor IXa (EC 3.4.21.22), která aktivuje faktor X (cit.¹³). Aktivace faktoru X faktorem IXa je 50–100× rychlejší než aktivace faktorem VIIa (cit.¹⁴). Vznikající trombin dále aktivuje serinovou proteasu faktor XI (EC 3.4.21.27) (cit.¹⁵), přeměňuje fibrinogen na fibrin¹⁶, aktivuje krevní destičky¹² a aktivuje faktor XIII (cit.¹⁷). Aktivovaný faktor XIa aktivuje faktor IX. Aktivovaný faktor XIIIa kovalentně stabilizuje vznikající fibrinovou síť.

Celý systém aktivace trombinu je přísně regulován. Nejdůležitějším inhibitelem trombinu je antitrombin III, který je schopen inhibovat všechny serinové proteasy koagulační kaskády¹⁸. Vazbou antitrombinu na trombin dojde k rozštěpení vazby za Arg393 antitrombinu a uvěznění trombinu v ireverzibilním komplexu⁷. Dalším inhibitelem koagulační kaskády je inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), který reverzibilně inhibuje faktor Xa a komplex VIIa-tkáňový faktor-Xa (cit.¹⁹). Vazba trombinu na trombomodulin umožňuje aktivaci serinové proteasy proteinu C (EC 3.4.21.69), jehož aktivní forma ve spolupráci s proteinem S a vitaminem K proteolyticky inaktivuje faktory Va a VIIIa (cit.²⁰).

2.2. Odštěpování fibrinopeptidů

Trombin specificky štěpí peptidovou vazbu mezi arginylem a glycylem²¹. Ve fibrinogenu přednostně štěpí vazbu mezi Aα Arg16-Gly17 a Bβ Arg14-Gly15. Hexadekapeptid odštěpený z Aα řetězce nazýváme fibrinopeptid A a tetradekapeptid odštěpený z Bβ řetězce nazýváme fibrinopeptid B. Fibrinopeptidy tvoří méně než 2 % hmoty fibrinogenu¹. Přednost štěpení právě těchto vazeb je dána konformačním uspořádáním fibrinopeptidů vystupujících z molekuly fibrinogenu do prostoru, jež skvěle zapadají do aktivního místa trombinu²¹. Ze sledování kinetiky odštěpování fibrinopeptidů bylo zjištěno, že uvolnění fibrinopeptidů B začíná až po uvolnění fibrinopeptidů A (cit.²²). Během polymerace fibrinu však narůstá rychlost odštěpování fibrinopeptidů B až sedmkrát, což svědčí o tom, že fibrinopeptidy B jsou odštěpovány preferenčně z fibrinového polymeru díky konformační změně vyvolané polymerací, která podporuje odštěpování²³.

Předpokládá se, že odštěpení fibrinopeptidů A spouští tvorbu protofibril, a že odštěpení fibrinopeptidů B souvisí s laterální agregací²⁴. Uvolněním fibrinopeptidů vzniká polymerační místo (hrbolek) A, resp. polymerační místo (hrbolek) B. Polymerační místa jsou tvořena sekvencí Gly-Pro-Arg a Gly-His-Arg, které reagují s polymeračními místy (prohlubněmi) a a b, které jsou situovány v γC a βC doméně²⁵.

2.3. Polymerace fibrinu

Polymerace fibrinu začíná po odštěpení fibrinopeptidů A interakcí mezi polymeračním hrbolek A a polyme-

rační prohlubni a (cit.²⁶). Polymerační hrboleky jsou situovány v centrální doméně, polymerační prohlubně jsou umístěny v koncových doménách. Specifické interakce mezi polymeračním hrbolek „A“ a polymerační prohlubni „a“ komplementárními vazebnými místy dávají vzniknout agregátům, v nichž jsou fibrinové monomery posunuty o polovinu délky, neboť centrální doména jedné molekuly reaguje s koncovou doménou druhé²⁶. Tim vzniká fibrinový dimer, na nějž se váží další molekuly fibrinového monomeru a vzniká dvojité stočená protofibrila. Zároveň se utvářejí i vazby mezi koncovými doménami. Hlavními aminokyselinovými zbytky podílejícími se na vazbě jsou γArg275, γTyr280, γSer300 a γAsn308 (cit.¹).

Jakmile protofibrily dosáhnou určité délky (600 až 800 nm) začnou laterálně agregovat a tvoří vlákna²⁷. Během laterální agregace se uplatňují specifické intermolekulární interakce (mezi B:b polymeračními místy), které způsobují, že se struktura vlákna opakuje po 22,5 nm, což je možné pozorovat v elektronovém mikroskopu²⁸. Laterální agregaci posiluje αC doména, která disociuje směrem od centrální domény po uvolnění fibrinopeptidů B (cit.²⁹).

Příčný nárůst vláken je limitován, neboť vlákna jsou zkroucená. Při dosažení určitého průměru vlákna je energie potřebná pro natažení přidávané protofibrily vyšší než vazebná energie a nárůst vlákna se zastaví¹. Vlákna se větví a vytvářejí síť připomínající svými vlastnostmi gel. Fibrinový gel obsahuje až 95 % kapaliny¹.

2.4. Kovalentní stabilizace fibrinové sítě

Vznikající fibrinová síť je stabilizována tvorbou kovalentních vazeb mezi jednotlivými molekulami fibrinogenu. Tvorbu kovalentních vazeb katalyzuje plasmatická transglutaminasa, aktivovaný faktor XIIIa (protein-glutamin γ-glutamyl transferasa, EC 2.3.2.13)³⁰. Faktor XIII má molekulovou hmotnost 326 kDa, je přítomen v plasmě (10 μg ml⁻¹), krevních destičkách, monocitech a jejich prekurzorech v kostní dřeni³¹.

Faktor XIII cirkuluje jako inaktivní zymogen tvořený dvěma páry různých polypeptidových řetězců označovaných A a B. Působením trombinu dojde k odštěpení aktivních peptidů a vzniku allozymogenu FXIII'. V přítomnosti vápenatých iontů disociují dvě podjednotky B z molekuly faktoru XIII' a vzniká aktivní faktor XIIIa (cit.³⁰). Přítomnost fibrinu urychluje a napomáhá aktivaci faktoru XIII (cit.³²).

Aktivovaný faktor XIIIa katalyzuje tvorbu vazeb mezi koncovými zbytky glutaminu a ε-aminoskupinou lysylu³³. Nejprve vznikají kovalentní vazby mezi γ řetězcí, poté mezi C-koncovými částmi α řetězců. Faktor XIII také kovalentně váže k fibrinu fibronektin, α2-antiplasmin či inhibitor aktivátoru plasminogenu 2 (cit.³⁴). Kovalentní „stabilizace“ fibrinové sítě zvyšuje její odolnost vůči mechanickým vlivům a trombolytickým enzymům.

3. Fibrinolýza

Fibrinový gel zajišťuje po poranění a při hojení rány pouze dočasnou zátku, která je po využití efektivně odstraněna. Štěpit fibrin je schopno mnoho proteolytických enzymů a buněk. Nejvíce specifickým mechanismem degradace fibrinové zátky je však fibrinolýza.

Hlavní složkou fibrinolytického systému je glykoprotein plasminogen. Plasminogen, neaktivní forma serinové proteasy plasminu (EC 3.4.21.7), je syntetizován v játrech³⁵, cirkuluje v krvi v koncentraci 1–5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ s poločasem dva dny³⁶. Je tvořen jedním řetězcem o hmotnosti 92 kDa, 791 aminokyselinovými zbytky a obsahuje 24 disulfidových vazeb³⁷. Aktivní místo plasminu je tvořeno zbytky His602, Asp645 a Ser740 (cit.³⁸). Ve struktuře plasminogenu nalézáme čtyři významné domény označované K1, K2, K3 a K4. Tyto domény jsou bohaté na lisyly, jsou tvořené velkými smyčkami stabilizovanými disulfidovými vazbami a zprostředkovávají vazbu na fibrin a povrchové receptory buněk³⁷. Sacharidová složka plasminogenu reguluje afinitu k buněčným receptorům a hraje významnou roli při degradaci plasminu³⁶.

V krevním řečišti kolující forma plasminogenu (označovaná jako Glu plasminogen podle *N*-terminálního aminokyselinového zbytku) je limitovanou proteolýzou štěpením vazby mezi Lys77-Lys78 přeměňována na Lys plasminogen, který rychleji a efektivněji nasedá na fibrin a je 10–20× rychleji aktivován³⁹. Tato forma se normálně nevyskytuje v cirkulaci, vzniká až před samotnou fibrinolýzou.

K aktivaci plasminogenu jsou zapotřebí aktivátory. Nejdůležitějším je glykoprotein, tkáňový aktivátor plasminu (tPA), což je serinová proteasa (EC 3.4.21.68) o hmotnosti 72 kDa, která je produkována a sekretována především endoteliálními buňkami s poločasem 5 min. Uvolňování tPA z endotelu je stimulováno např. trombinem, histaminem či adrenalinem, ale také tělesnou zátěží nebo stresem. Tkáňový aktivátor plasminu nasedá na fibrin a štěpí vazbu mezi Arg561-Val562 v plasminogenu vázaného na fibrin, vzniká plasmin, který štěpí fibrin. Plasmin štěpí vazbu Arg275-Ile276 v molekule tPA, čímž vzniká aktivnější dvouřetězcová forma a zesiluje se fibrinolýza⁴⁰.

Dalším aktivátorem plasminu je urokinasa (uPA), serinová proteasa (EC 3.4.21.73) o hmotnosti 54 kDa, která je produkována a sekretována především endoteliálními buňkami, makrofágy a některými nádorovými buňkami. Urokinasa štěpí vazbu mezi Arg561-Val562 v plasminogenu, vzniká plasmin, který štěpí fibrin. Plasmin a kallikrein štěpí vazbu Lys158-Ile159 v molekule uPA, čímž vzniká aktivnější dvouřetězcová forma. Urokinasa má mnohem nižší afinitu k fibrinu než tPA a je schopna aktivovat plasmin i v nepřítomnosti fibrinu⁴¹.

Z dalších aktivátorů plasminu lze jmenovat kallikrein, aktivovaný faktor XIa, XIIa a membránovou metaloproteinasu MT1-MMP. Tyto aktivátory plasminu však za normálních podmínek nepředstavují více než 15 % celkové aktivity plasminu⁴².

Plasmin štěpí fibrin za aminokyselinovými zbytky

lysinu a argininu na rozpustné degradační produkty, z nichž nejvýznamnější jsou D-dimery³⁶ (kovalentně spojené D domény ze dvou různých molekul fibrinového monomeru), jejichž koncentrace v plasmě slouží k diagnostice tvorby a rozpouštění trombu. Degradací produkty fibrinu jsou schopné inhibovat polymeraci fibrinového monomeru³⁶.

Uvolněním plasminu ze štěpeného fibrinu je tento inaktivován glykoproteinem α_2 -antiplasminem. α_2 -Antiplasmin cirkuluje v krvi s poločasem 2,4 dny, koncentrace v krvi je 0,9 nmol l^{-1} a hmotnost 70 kDa. Je plasminem štěpen, čímž vzniká dvouřetězcová forma, která s plasminem tvoří komplex, degradovaný v játrech⁴³.

Proces fibrinolýzy je regulován. Regulační funkci nezastává pouze α_2 -antiplasmin, ale také inhibitory aktivátorů plasminu a zeslabovače fibrinolýzy. Všudypřítomným inhibítozem je inhibitor aktivátoru plasminu 1 (PAI-1). Jedná se o jednořetězcový glykoprotein o hmotnosti 52 kDa, který je produkován endoteliálními buňkami, krevními destičkami, monocyty, hepatocyty, makrofágy a adipocyty. Jeho produkce je stimulována v závislosti na zánětlivé odpovědi cytokiny, lipoproteiny a růstovými faktory. Inhibuje tPA i uPA (cit.³⁶).

Dalším inhibítozem je inhibitor aktivátoru plasminu 2 (PAI-2). Vyskytuje se buď jako protein o hmotnosti 47 kDa nebo jako glykoprotein o hmotnosti 60 kDa. Je produkován především leukocyty a měřitelná hladina v krvi je pouze během těhotenství. Je schopen inhibovat dvouřetězcové formy tPA a uPA (cit.⁴²).

Zeslabovačem fibrinolýzy je inhibitor fibrinolýzy aktivovatelný trombinem (TAFI). Jedná se o 60 kDa vážící protein, který cirkuluje v plasmě o koncentraci 100 nmol l^{-1} , který je produkován hepatocyty a je uložen v krevních destičkách. Jeho aktivace trombinem je zesílena v přítomnosti thrombomodulinu. Proteolytickým štěpením trombinem vzniká Zn-dependentní karboxypeptidasa TAFIa se specifitou pro C-koncové arginylové a lisylové zbytky⁴⁴. V molekule plasminogenu a tPA hrají právě tyto zbytky důležitou roli v interakci s fibrinem.

V neposlední řadě hrají důležitou úlohu v regulaci fibrinolýzy receptory. Z nich nejdůležitější roli hrají plasminogenové receptory⁴⁵ (např. GP IIb/IIIa, α -enolasa), uPAR⁴⁵ (urokinasový receptor, podporuje vazbu uPA s PAI-1), integrin $\alpha_{\text{M}\beta 2}$ (cit.⁴⁶) (váže plasminogen a uPA, čímž 50× urychluje generaci plasminu), annexin-2⁴⁷ (váže plasminogen a tPA a tím 60× urychluje generaci plasminu) a protein přidružený k receptoru α_2 -makroglobulinu⁴⁸ (vychytává komplexy tPA-PAI-1).

4. Patofyziologie fibrinogenu

Choroby spojené s poruchou v molekule fibrinogenu jsou poměrně vzácné. Vrozená dysfibrinogenémie, choroba která se projevuje nefunkčností molekuly fibrinogenu vyvolanou poruchou v primární struktuře (bodová mutace, insert, delece), byla celosvětově popsána zatím jen asi v 400 rodinách⁴⁹. Toto číslo ovšem nevypovídá o reálném množství případů, neboť koagulační vyšetření se neprová-

dí standardně a genetický screening provádí pouze několik pracovišť na světě. V České republice je pouze jedno pracoviště zabývající se vyšetřováním dysfibrinogenémií, a to Ústav hematologie a krevní transfuze, které spolupracuje s hematologi z celé ČR.

Deficit fibrinogenu projevující se sníženou hladinou fibrinogenu v plasmě – hypofibrinogenémie bývá také vyvolán vrozenými mutacemi v některém z genů kódujících řetězce fibrinogenu. Získané dysfibrinogenémie bývají spojené s pozmeněným zastoupením sialových kyselin v souvislosti s jaterními chorobami⁵⁰.

Poměrně závažným onemocněním je „fibrinogen storage disease“, které se vyznačuje ukládáním fibrinogenu v játrech⁵¹, které může způsobit až selhání jater a smrt.

5. Závěr

Fibrinogen má v organismu mnoho funkcí, které jsou nezbytné pro přežití. Jako součást koagulační kaskády se účastní procesu zástavy krvácení. Zástava krvácení je jedním z nejdůležitějších ochranných mechanismů zajišťujících správné fungování organismu. V případě poranění je aktivována složitá kaskáda reakcí vedoucí k zabránění ztráty krve. Proces fibrinolýzy zajišťuje, po úspěšném zacelení rány, degradaci fibrinové sítě, která napomáhala v zástavě krvácení. Jak proces tvorby fibrinové sítě, tak i fibrinolýza dosud neodhalily všechna svá tajemství. Porozumění těmto procesům a jejich patofyziologii může zachránit mnoho životů a zajisté si zaslouží pozornost odborné veřejnosti.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GA AV ČR číslo KAN200670701.

LITERATURA

- Weisel J. W.: Adv. Protein Chem. 70, 247 (2005).
- Buchanan A.: London Med. Gaz. 18, 50 (1836).
- Buchanan A.: Proc. R. Phil. Soc. Glasgow 2, 16 (1845).
- Magnusson S. In Boyer P. D. (ed.): *The Enzymes*, vol. 3. Academic Press, New York 1971.
- Orcutt S. J., Krishnaswamy S.: J. Biol. Chem. 279, 54927 (2004).
- Fukutake K., Cho M. H., Seegers W. H.: Am. J. Physiol. 194, 280 (1958).
- Crawley J. T. B., Zanadelli S., Chion C. K. N. K., Lane D. A.: J. Thromb. Haemost. 5, 95 (2007).
- Huntington J. A.: J. Thromb. Haemost. 3, 1861 (2005).
- Pineda A. O., Carrell C. J., Bush L. A., Prasad S., Caccia S., Chen Z. W., Mathews F. S., Di Cera E.: J. Biol. Chem. 279, 31842 (2004).
- Butenas S., Mann K. G.: Blood Coagulation. Biochemistry (Moscow) 67, 3 (2002).
- Silverberg S. A., Nemerson Y., Zur M.: J. Biol. Chem. 252, 8481 (1977).
- Lawson J. H., Kalafatis M., Stram S. Mann K. G.: J. Biol. Chem. 269, 23357 (1994).
- Rosing J., van Rijn J. L. M. L., Bevers E. M., van Dieijen G., Comfurius P., Zwaal R. F.: Blood 65, 319 (1985).
- Lawson J. H., Mann K. G.: J. Biol. Chem. 266, 11317 (1991).
- Gailani D., Broze G. J. Jr.: Science 253, 909 (1991).
- Bailey K., Bettelheim F. R., Lorand L. Middlebrook W. R.: Nature 167, 233 (1951).
- Lorand L., Konishi K.: Arch. Biochem. Biophys. 105, 58 (1964).
- Olson S. T., Bjork I., Shore J. D.: Methods Enzymol. 222, 525 (1993).
- Rapaport S. I.: Thromb. Haemost. 66, 6 (1991).
- Walker F. J., Sexton P. W., Esmon C. T.: Biochim. Biophys. Acta 571, 333 (1979).
- Stubbs M. T., Bode W.: Semin. Thromb. Hemostasis 19, 344 (1993).
- Lewis S. D., Shields P. P., Shafer J. A.: J. Biol. Chem. 260, 10192 (1985).
- Hanna L. S., Scheraga H. A., Francis C. W., Marder V. J.: Biochemistry 23, 4681 (1984).
- Blombäck B.: Thromb. Res. 83, 1 (1996).
- Pechlik I., Yakovlev S., Mosesson M. W., Gilliland G. L., Medved L.: Biochemistry 45, 3588 (2006).
- Fowler W. E., Hantgan R. R., Hermans J., Erickson H. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 4872 (1985).
- Hantgan R. R., Hermans J.: J. Biol. Chem. 254, 11272 (1979).
- Weisel J. W.: J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 96, 176 (1986).
- Veklich Y. I., Gorkun O. V., Medved L. V., Nieuwenhuizen W., Weisel J. W.: J. Biol. Chem. 268, 13577 (1993).
- Lorand L.: Ann. N.Y. Acad. Sci.: 936, 291 (2001).
- Muszbek L., Ariëns R. A., Ichinose A.: J. Thromb. Haemost. 5, 181 (2007).
- Lewis S. D., Janus T. J., Lorand L., Shafer J. A.: Biochemistry 24, 6772 (1985).
- Ariëns R. A. S., Lai T.-S., Weisel J. W., Greenberg C. S., Grant P. J.: Blood 100, 743 (2002).
- Greenberg C. S., Lai T.-S., Ariëns R. A. S., Weisel J. W., Grant P. J., v: *Blood. Principles and practice of hematology*. (Hnadin R. I., Lux S. E., Stossel T. P., ed.), str. 1225. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2003.
- Raum D., Marcus D., Alper C. A., Levey R., Taylor P. D., Starzl T. E.: Science 208, 1036 (1980).
- Hajjar K. A. In Nathan D. G., Orkin S. H., Ginsburg D., Look A. T.: *Hematology of Infancy and Childhood*. W. B. Saunders Co., Philadelphia 2003.
- Forsgren M., Raden B., Israelsson M., Larsson K., Heden L. O.: FEBS Lett. 213, 254 (1987).
- Seksela O.: Biochim. Biophys. Acta 823, 35 (1985).
- Markus G., Priore R. L., Wissler F. C.: J. Biol. Chem. 254, 1211 (1979).
- Pennica D., Holmes W. E., Kohr W. J., Harkins R. N.,

- Vehar G. A., Ward C. A., Bennet W. F., Yelverton E., Seeburg P. H., Heyneker H. L., Goeddel D.V., Collen D.: *Nature* 301, 214 (1983).
41. Holmes W. E., Pennica D., Blaber M., Rey M. W., Guenzler W. A., Steffens G. J., Heyneker H. L.: *Bio-technology* 3, 923 (1985).
 42. Cesarman-Maus G., Hajjar K. A.: *Br. J. Haematol.* 129, 307 (2005).
 43. Holmes W. E., Nelles L., Lijnen H. R.: *J. Biol. Chem.* 262, 1659 (1987).
 44. Nesheim M.: *Chest* 124, 33 (2003).
 45. Hajjar K. A.: *Thromb. Haemostasis* 74, 294 (1995).
 46. Pluskota E., Soloviev D. A., Bdier K., Cines D. B., Plow E. F.: *J. Biol. Chem.* 279, 18063 (2004).
 47. Hajjar K. A., Krishnan S.: *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 128 (1999).
 48. Beiseigel U., Weber W., Ihrke G., Herz J., Stanley K. K.: *Nature* 341, 162 (1989).
 49. Hanss M., Biot F.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 936, 89 (2001), <http://www.geht.org/databaseang/fibrinogen>, staženo: 21. 8.07.
 50. Narvaiza M. J., Fernandez J., Cuesta B., Paramo J. A., Rocha E.: *Ric. Clin. Lab.* 16, 563 (1986).
 51. Abukawa D., Tazawa Y., Noro T., Nakagawa M., Iinuma K., Sugiyama K., Knisely A.: *Pediatr. Dev. Pathol.* 4, 304 (2001).

R. Kotlín and Jan E. Dyr (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic*): **Fibrin Formation and Degradation**

Fibrinogen conversion to fibrin is a physiological process leading to haemostasis. Fibrinogen is cleaved by the serine protease thrombin to the fibrin monomer, which interacts with other fibrin monomers to produce protofibrils, which in turn spontaneously interact to form fibres. Fibrin formation activates specific proteases, which cleave plasminogen to plasmin. Plasmin degrades the fibrin network and disintegrates the haemostatic plug. The processes are regulated and are not yet fully clarified. This review brings an insight into these physiological processes.

HUMÍNOVÉ KYSELINY. INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH KYSELÍN S KONTAMINANTAMI

MARIANNA SKOKANOVÁ
a KATARÍNA DERCOVÁ

*Oddelenie biochemickej technológie, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
marianna.skokanova@stuba.sk*

Došlo 3.5.07, prijaté 27.11.07.

Kľúčové slová: humínové kyseliny, humínové látky, imobilizácia, pesticídy, pentachlórfenol, PCP, remediácia, xenobiotiká

Obsah

1. Úvod
2. Možnosti využitia humínových kyselín
3. Interakcie humínových kyselín s xenobiotikami
 - 3.1. Druhy väzieb
 - 3.2. Interakcie humínových kyselín s kovmi, organickými látkami a mikroorganizmami
 - 3.2.1. Kovy
 - 3.2.2. Organické látky
 - 3.2.3. Biologická aktivita humínových kyselín a ich väzba na mikroorganizmy
 - 3.3. Úloha enzýmov ako katalyzátorov pri imobilizácii xenobiotík na humínové kyseliny
4. Záver

1. Úvod

Existuje niekoľko spôsobov dekontaminácie pôd využívajúcich chemické, fyzikálno-chemické a biologické postupy¹. Mnohé z týchto spôsobov sú však mimoriadne energeticky a ekonomicky náročné a využívajú sa hlavne na silne znečistených lokalitách. Väčšina pôdneho fondu však nevykazuje extrémne hodnoty znečistenia, ale v podstate každá lokalita obsahuje pomerne rôznorodú zmes anorganických i organických polutantov, ktoré za určitých podmienok môžu kontaminovať potravinový reťazec, resp. prenikať do podzemných vôd. Avšak je potrebné si uvedomiť, že každá z týchto dekontaminačných metód, najmä fyzikálne a fyzikálno-chemické, viac či menej negatívne ovplyvňuje prirodzenú pôdnu mikrofóru, a tým rovnováhu pôdneho prostredia a pôdnu schopnosť

samočistenia. Bolo dokázané, že dochádza k znižovaniu počtu kultivovateľných baktérií, ako aj k redukcii mikrobiálnej respirácie a utilizácii uhlíkatých substrátov. Táto časť príspevku nadväzuje na časť prvú s názvom *Pôvod a štruktúra humínových kyselín*². Humínové kyseliny (HK) sú vďaka svojim vlastnostiam využiteľné pre potenciálne zdokonalenie remediačného procesu práve s dôrazom na zachovanie živých organizmov, keďže každú metódu je potrebné aplikovať veľmi šetrne vo vzťahu k danému prostrediu a prítomným živým organizmom³.

Pôda má schopnosť eliminovať kontaminanty (kovy, organické látky) a to ich interakciou s anorganickými (ílové minerály) a organickými (humínové kyseliny) pôdnymi zložkami, čím sa znižuje ich horizontálny a vertikálny pohyb. Práve táto prirodzená tlmiača schopnosť pôdy (tzv. natural attenuation) sa v posledných rokoch využíva ako alternatívna metóda remediácie⁴. Tento spôsob odstraňovania kontaminantov väzbou na HK (imobilizáciou) v pôde je vhodný najmä na ich „hrubé“ odstránenie zo silne znečistených lokalít, čo ďalej dáva možnosť využitia biologických metód prostredníctvom mikroorganizmov schopných tieto kontaminanty rozkladať v procese bioremediačných technológií. Využitie HK pre environmentálne účely je atraktívne najmä preto, že sa jedná o látky prírodného pôvodu s dostatočnými zásobami v prírodných matriciach⁵, teda sa jedná o obnoviteľné zdroje (tab. I).

2. Možnosti využitia humínových kyselín

Priaznivý vplyv humínových kyselín v pôde je mnohostranný a spočíva v kladnom ovplyvnení všetkých pôd-

Tabuľka I

Obsah humínových kyselín a fulvokyselín v prírodných matriciach⁶

Prírodný zdroj	Obsah humínových a fulvokyselín [%]
Leonardit/humát	40–85
Čierna rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnedé uhlie	10–30
Hnoj	5–15
Kompost	2–5
Pôda	1–5
Kal	1–5
Čierne uhlie	0–1

nych vlastností pôsobiacich rozhodujúcou mierou na obsah živín v pôde aj na pôdnu úrodnosť. HK sú využiteľné vo viacerých oblastiach⁶.

1. HK fyzikálne modifikujú štruktúru pôdy:
 - zdokonaľujú štruktúru pôdy: predchádzajú vysokým stratám vody a živín v ľahkých, piesočnatých pôdach. Tým, že dochádza súčasne k ich rozkladu, pôda sa stáva úrodnejšou. V ťažkých a kompaktných pôdach zlepšujú prevzdušnenie a retenciu vody, tým aj kultivačné vlastnosti,
 - pomáhajú pôdu prekypriť a rozdrobiť a tak zvýšiť jej prevzdušnenie a zlepšiť obrábatelnosť.
2. HK chemicky menia fixačné vlastnosti pôdy:
 - neutralizujú kyslé aj zásadité pôdy – regulujú pH hodnotu pôd,
 - zlepšujú a optimalizujú príjem živín a vody rastlinami,
 - sú bohaté na organické aj minerálne látky nevyhnutné pre rast rastlín,
 - vyznačujú sa vysokou kationovo-výmennou kapacitou,
 - uvoľňujú CO_2 z pôdneho CaCO_3 a umožňujú mu zúčastňovať sa fotosyntézy,
 - redukujú dostupnosť toxických látok v pôdach.
3. HK biologicky stimulujú rastlinu a aktivitu pôdnych mikroorganizmov:
 - stimulujú rastlinné enzýmy a zvyšujú ich produkciu,
 - stimulujú rast a rozširovanie vhodných mikroorganizmov v pôdach,
 - zvyšujú prirodzenú rezistenciu rastlín voči chorobám a škodcom,
 - podporujú rozvoj chlorofylu, cukrov a aminokyselín v rastlinách a tým napomáhajú fotosyntéze,
 - zlepšujú klíčenie a životaschopnosť semien.
4. Ekonomické – HK chelatujú zlúčeniny nutrientov v pôde vo forme vhodnej pre ich utilizáciu rastlinami. Týmto spôsobom je zabezpečený optimálny prísun živín do rastliny. Pomocou prídavku HK sa teda dosahujú vyššie výťažky (až do 70 %), ako aj 30% redukcia v používaní pesticídov. HK zvyšujú aj pôdnu kapacitu zádrže vody, čím prispievajú k zníženiu spotreby vody použitej na zavlažovanie pestovaných rastlín.
5. Ekologické – HK predstavujú prospešné a účinné riešenia problémov životného prostredia, jeho ochrany a zachovania:
 - pôdy s vysokým obsahom HK zabezpečujú nízke vymývanie nitrátov a optimálnu úroveň živín. Dobře vyvinutý koreňový systém dosiahnutý vysokým obsahom HK zabraňuje úniku nitrátov a pesticídov do spodných vôd. Nízky obsah nitrátov je indikátorom a podmienkou pre tzv. organické poľnohospodárstvo. Nitráty sa dostávajú do pôdy tak, že pestovatelia používajú viac hnojív ako sú rastliny schopné prijať,
 - HK redukujú presolenie pôd, ku ktorému dochádza nadmerným používaním vo vode rozpustných priemyselných minerálnych hnojív. HK sú schopné znížiť obsah soli a tým znížiť toxicitu pôdy,

- HK predstavujú účinný prostriedok proti pôdnej erózii. Zabezpečuje sa to najmä väzbovou schopnosťou koloidov a podporovaním koreňového systému a vývoja rastliny.

3. Interakcie humínových kyselín s xenobiotikami

3.1. Druhy väzieb

Z hľadiska využiteľnosti humínových látok v oblasti ochrany životného prostredia, napr. v sanačných technológiách, je dôležitá znalosť možných väzbových interakcií týchto látok s kontaminujúcimi látkami prítomnými v prostredí. Približnú predstavu o možných väzbových interakciách môžeme odvodiť predovšetkým z dosiaľ známych informácií o štruktúre a z niektorých ďalších vlastností humínových látok. Na základe dostupných informácií teda môžeme predpokladať niekoľko typov väzbových interakcií medzi humínovými látkami a cudzorodými látkami – kontaminantami, prítomnými v pôde⁵.

Iónová väzba

Tento typ väzby vychádza z pôsobenia elektrostatických síl medzi fixnými nábojmi prítomných funkčných skupín a iónmi vyskytujúcimi sa v roztoku. Keď zoberieme do úvahy iónovú väzbu, potom sa môžeme v zjednodušenom pohľade pozeráť na humínové látky ako na ionexy, ktorým môžeme v niektorých prípadoch prisudzovať vlastnosti porovnateľné so syntetickými ionexami. Vznik elektrostatickej väzby sa dá u humínových látok predpokladať napr. v prípade alkalických kovov a amoniaku.

Koordinácia väzba

Z hľadiska imobilizácie toxických kovov predstavuje najdôležitejší typ väzbovej interakcie koordinácia väzba medzi makromolekulovými maticami humínových látok a iónmi kovov schopnými tento typ väzby vytvárať. Potenciál vzniku koordinčných väzieb je tu daný najmä značným zastúpením karboxylových, fenolických a ďalších funkčných skupín v štruktúre humínových látok. Predpokladanie priebehu komplexotvorných reakcií pre konkrétny typ humínových látok je však vzhľadom na zložitú makromolekulárnu štruktúru veľmi ťažké. Vytváranie koordinčných väzieb je teda dôležité najmä pri odstraňovaní toxických kovov nachádzajúcich sa napr. v podzemných alebo odpadových vodách. Na vzniku koordinčných väzieb sa v humínových látkach najviac podieľajú karboxylové a fenolické funkčné skupiny, kde zastúpenie týchto dvoch funkčných skupín je okrem iného ovplyvnené hodnotou pH a tým aj mierou disociácie týchto funkčných skupín. V slabo kyslej oblasti sa na vzniku koordinčných väzieb podieľajú hlavne karboxylové skupiny a k nim sa pri vzraste pH nad 7 a po disociácii protónu z fenolického hydroxylu pridávajú významne aj tieto funkčné skupiny. Všeobecne stabilita vznikajúcich komplexov so vzrastom

pH stúpa, a to najmä u tých iónov (napr. Cu^{2+}), ktoré tvoria silné karboxylát-fenolické komplexy.

Kovalentná väzba

Interakcie vedúce ku vzniku kovalentných väzieb tu môžu byť rozdelené na dve skupiny – reakcie prebiehajúce bez využitia aktivity enzýmov a reakcie s využitím biokatalýzy. Poznatok, že v makromolekulovej štruktúre humínových látok môže dochádzať k trvalej fixácii kontaminantov kovalentnou väzbou, je známy už dávno. Interakcia kovalentného typu bola preukázaná na prelome 70. a 80. rokov minulého storočia a jej príkladom tu môže byť kovalentná väzba antracénu na humínové kyseliny izolované z pôdy znečistenej zmesou polyaromatických uhľovodíkov. V metabolicky aktívnom systéme bolo zistené približne 40% zabudovanie antracénu (nesúceho izotop ^{14}C) do kovalentnej formy v štruktúre humínových kyselín. Z hľadiska sanácie pôd kontaminovaných práve polyaromatickými uhľovodíkmi je potom možnosť kovalentnej väzby na humínové látky zvlášť zaujímavá, pretože sa tu jedná o stabilnú väzbu na polymérnu štruktúru, o ktorej je preukázané, že je nemutagénna a v jej prítomnosti dokonca aj niektoré mutagénne látky znižujú svoju mutagenitu. Možnosť vzniku kovalentnej väzby medzi makromolekulárnou štruktúrou humínových látok a kontaminantu je z praktického hľadiska predpokladom na imobilizáciu kontaminantu. V tejto súvislosti je dôležité poznať, či proces vedúci ku vzniku kovalentnej väzby môžeme považovať za reverzibilný alebo ireverzibilný.

Vodíkové mostíky

Aj napriek skutočnosti, že presná štruktúra humínových látok zostáva stále nedoriešená, je možné predpokladať na základe preukázanej prítomnosti niektorých funkčných skupín (amidová, laktámová, nitrilová) možnosť vzniku vodíkových mostíkov. Tieto väzby sa aj napriek svojmu nízkemu energetickému obsahu môžu významne podieľať na väzbových schopnostiach medzi humínovými látkami a kontaminantami. Zastúpenie vodíkových mostíkov na väzbových interakciách bolo objektívne preukázané napr. pre iminoskupiny v molekulách herbicidov.

Hydrofóbne interakcie

Tento typ väzby vzniká pri kontakte nepolárnych skupín (napr. alkylových) nesených molekulami, ktoré sa nachádzajú vo vodnom roztoku, kde tieto interakcie môžu napr. vychádzať z pôsobenia van der Waalsových síl alebo presunu π -elektrónov. Hydrofóbne interakcie sú najčastejšou predpokladanou väzbovou interakciou humínových látok s hydrofóbnymi a alifatickými kontaminantami. Touto interakciou je napr. vysvetľovaná skutočnosť, že insekticíd parathion stráca za prítomnosti humínových látok časť svojej toxicity. Vysvetľuje sa ňou aj imobilizácia atrazínu a hydroxyatrazínu. Hydrofóbne interakcie sú predpokladané aj v prípade významnej skupiny s-triazínových herbicídnych látok.

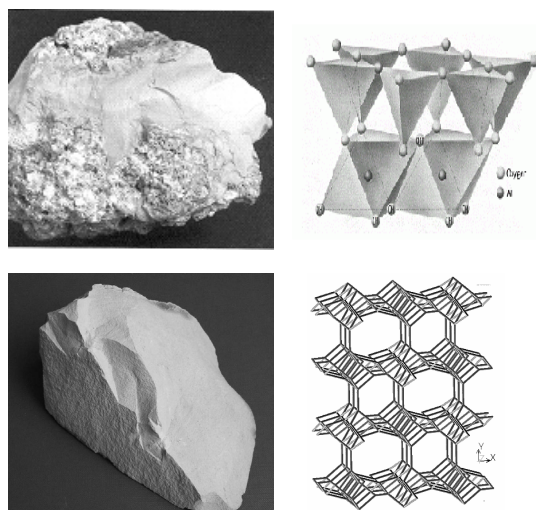
3.2 Interakcie HK s kovmi, organickými látkami a mikroorganizmami

Xenobiotiká sa dostávajú do pôdy pri modernom a extenzívnom poľnohospodárstve a priemysle najčastejšie vo forme pesticidov. Väčšina xenobiotík sa podieľa na syntéze humínových látok, či už sú to samotné pesticídy alebo aj ich degradačné produkty. Tieto zlúčeniny majú schopnosť tvoriť stabilné komplexy s pôdnymi organickými zložkami, čo má veľký význam pre ich ďalšie chemické pôsobenie v pôde. Vzrastá ich perzistencia v pôde, čo môže mať za následok rôzne vplyvy na životné prostredie⁷. Ich toxicita a chemické pôsobenie sa môže aktivovať, alebo naopak môžu stratiť svoju identitu a správanie sa ako xenobiotika. Viacerí autori^{8–10} uvádzajú organickú hmotu ako jeden z najdôležitejších parametrov pôdneho prostredia, ktoré najviac ovplyvňujú mobilitu, resp. sorpciu kontaminantov v pôde. Jednou z takýchto prírodných organických zlúčenín môžu byť aj humínové kyseliny. V tejto súvislosti uvádzajú aj ďalší autori vynikajúce sorpčné schopnosti humínových kyselín^{11–15}. Väzba xenobiotík na HK sa teda stáva jednou z majoritných reakcií, ktorou môžu byť antropogénne zlúčeniny v prírode transformované^{16,17}.

Tuhé povrchy vo viacerých zložkách prostredia môžu výrazne ovplyvňovať aktivitu pôvodných mikroorganizmov. Aktívnymi povrchmi môžu byť ílovité minerály, organická frakcia pôdy alebo sedimentu, predovšetkým humínové látky, komplexy uhľikatej hmoty, alebo aj amorfné oxidy Fe a Al alebo hydroxidy. Tuhé povrchy často spôsobujú adsorpciu, čo značí zadržiavanie látok pôvodne prítomných v roztoku povrchom tuhého materiálu. Absorpcia znamená zadržiavanie látky vnútri tuhej fázy, nie na povrchu. Termín sorpcia zahŕňa popis oboch javov. Mnohé procesy týkajúce sa sorpcie na povrchoch ílovitých minerálov a humínových materiálov majú veľkú plochu na jednotku hmoty, napr. gram ílu môže mať povrch od 20 do 80 m^2 (cit.¹⁸).

Pri eliminácii kontaminantov sorpciou na pôdne častice dochádza k zníženiu mobility a tým v podstate aj toxicity príslušného kontaminantu, nakoľko časť kontaminantu viazaná na pôdne štruktúry je v podstate inertná voči mikrobiálnemu ataku. Kontaminanty sú pevne zakomponované do pôdnej štruktúry, sú imobilizované. Avšak toto spojenie nemusí byť trvalé. Väzby medzi sorbentom a kontaminantom môžu byť narušené. Biologické a fyzikálno-chemické faktory, ako sú aktivita mikroorganizmov a kyslé dažde sú považované za primárne faktory zodpovedné za uvoľnenie viazaných reziduí¹⁹. Napriek tomu sa desorbujú do pôdneho roztoku v prírode len malé množstvo kontaminantov, ktoré môže byť následne mineralizované pomocou pôdnej mikroflóry, hydrolytickými podmienkami a inými environmentálnymi faktormi²⁰.

Štúdiom mechanizmu väzby humínových kyselín na prírodný materiál zeolit (klinoptilolit) sa zaoberali Kabelová a Novotná²¹. Proces imobilizácie podporuje prirodzenú schopnosť pôd eliminovať kontaminanty, viazať ich a tým zabrániť ich prieniku napr. do podzemných vôd. Reháková



Obr. 1. Štruktúra kaolínu a zeolitu

a spol.²² opisujú využitie zeolitov z ekologického hľadiska pri znižovaní obsahu škodlivín v pôde sorpciou polárnych i nepolárnych, anorganických i organických kontaminantov. V súčasnosti sa zvýšenie účinnosti zeolitov dosahuje jednak prípravou syntetických zeolitov^{23,24}, ale tiež naviazaním rôznych organických zlúčenín na zeolit²⁵.

Výsledky viacerých štúdií dokazujú, že dekontaminácia poľnohospodárskych pôd môže byť založená aj na aplikácii organo-minerálneho komplexu (OMK), pripraveného na báze lignitových humínových kyselín (organická zložka) a zeolitu alebo kaolínu (anorganická zložka) (obr. 1). Nakoľko oba komponenty sú prírodného pôvodu, uvedená metóda by mala byť prijateľná pre životné prostredie. Dercová a spol.²⁶ stanovili pri sorpčných experimentoch s PCP lepšiu retenčnú schopnosť takéhoto komplexu v porovnaní s čistým zeolitom. Takisto bola dokázaná priama úmernosť medzi adsorpčnou schopnosťou OMK a množstvom HK viazanej na zeolit. Imobilizačný efekt OMK vo vzťahu k pentachlórófolu (PCP) závisí od jeho koncentrácie, od koncentrácie naviazanej HK a množstva pôdneho organického uhlíka^{27,28}. Množstvo PCP viazaného na ílový materiál predstavuje len 3–19 %, zatiaľ čo v prípade čistej izolovanej HK predstavuje táto sorpcia až 78 % (cit.^{16,17}).

3.2.1. Kovy

Na odstraňovanie toxických kovov z prostredia môžu byť využité rôzne metódy. Keďže kovy ako také nie je možné rozložiť, metódy biodegradácie sú vylúčené. Avšak existujú dve skupiny vhodných metód odlišných svojou podstatou. Prvou z nich je fyto-remediácia kovov, ktorá využíva rastliny na fixáciu a akumuláciu kovov, druhú skupinu tvoria metódy využívajúce mikroorganizmy, ktoré sú schopné uskutočňovať aktívny transport, extracelulárnu tvorbu komplexov, biosorpciu, precipitáciu alebo konverziu ťažkých kovov na menej toxické formy^{29,30}.

Szabová a spol.³¹ uvádzajú využívanie ílových minerálov (kaolín, bentonit, zeolity) v snahe vytvoriť predpoklady pre zníženie koncentrácie ťažkých kovov v pôdnom roztoku a tým znížiť ich príjem rastlinami. Na imobilizáciu ťažkých kovov sa v súčasnosti využívajú už spomenuté syntetické zeolity^{23,24}. Kwiatkowska a Maciejewska³² úspešne využili sorbenty na báze humínových kyselín izolovaných z rašelin a hnedého uhlia na zníženie mobility ťažkých kovov v pôde. V prirodzenom pôdnom prostredí sú však anorganické i organické zložky pôdy vo vzájomnej interakcii a z toho dôvodu viacerí autori^{12,33} skúmajú retenčnú schopnosť organo-minerálnych komplexov účinne znižovať mobilitu ťažkých kovov v pôde.

Sorpciou a desorpciou ťažkých kovov, konkrétne kadmia, na humínové kyseliny sa zaoberali aj Barančíková a spol.³⁴. Retenčné experimenty potvrdili, že rôzne typy pôd preukazujú rôznu retenčnú schopnosť voči kadmii.

Predbežné výsledky týkajúce sa účinku OMK pri znižovaní mobilných foriem ťažkých kovov poukazuje na zníženie mobility kadmia a olova. Zníženie prístupných foriem kadmia sa odzrkadlilo aj v znížení jeho koncentrácie v zrne jačmeňa pestovaného na sledovaných pôdach³⁵. Mohan a Chander³⁶ študovali vplyv teploty a pH na sorpciu niektorých kovových kationtov (Fe(II), Fe(III), Mn(II), Zn(II)) na lignit. Adsorpcia niektorých iónov (Fe²⁺) na lignit sa s narastajúcou teplotou zvyšovala, kým u Mn²⁺ bol tento trend opačný. Oren a Chefetz²⁸ však zistili, že sorpčná schopnosť humínových látok klesá po ich naviazaní na anorganický nosič. Sorpcia kadmia na izolované humínové kyseliny bola približne 7× väčšia ako v prípade pôd, z ktorých boli tieto kyseliny izolované³⁴.

3.2.2. Organické látky

Neprístupnosť organickej molekuly môže byť výsledkom jej sorpcie na tuhé zložky prostredia, jej prítomnosť v nevodnej fáze, alebo jej uchytenie sa vnútri fyzikálneho matrixu pôdy, sedimentu alebo vodnej zložky³⁷. HK sú mimoriadne aktívne pri interakciách rôznych organických a anorganických kontaminantov, ovplyvňujú ich mobilitu, bioprístupnosť, degradáciu a fytotoxicitu³⁸. Tento fakt je možné na druhej strane využiť na sorpciu hydrofóbných polutantov, napr. na organo-minerálny nosič a tým zabrániť ich ďalšiemu šíreniu napr. do podzemných vôd. Pri vysokých koncentráciách organických látok (napr. PCP) v prostredí by táto metóda mohla slúžiť ako „predúprava“ následnej biodegradácie organických xenobiotík³⁹.

Sorpciu organických zlúčenín ovplyvňuje viacero faktorov. Patria medzi nich typ a koncentrácia látky v roztoku, typ a kvalita ílovitých minerálov, množstvo organickej hmoty v pôde alebo v sedimente, pH, teplota, typ kationu (Fe, Ca alebo vodíkové ióny), výmenná kapacita a špecifický povrch ílov. Sorpciu PCP zo spodných vôd pomocou pórovitých organo-ílov študovali aj Ake a spol.⁴⁰.

Pu a Cutright⁴¹ skúmali sorpčno-desorpčné správanie sa PCP na pôdnu organickú hmotu (POH) a ílové minerály. Dospeli k záveru, že sorpcia je funkciou ako POH (kvantita aj kvalita), tak aj ílových minerálov (typ a kvan-

tita), ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri maximálnej sorpcii a minimálnej desorpcii PCP. Avšak molekulová hmotnosť HL nehrá u hydrofóbných organických polutantov takmer žiadnu rolu vo vzťahu k ich sorpčnej kapacite⁴².

Vplyvom pH na sorpciu chlórovaných fenolov na mokrá vrstvu piesku a študovaním typov interakcií prebiehajúcich pri týchto procesoch sa zaoberali Amiri, Börnick a Worch⁴³.

3.2.3. Biologická aktivita HK a ich väzba na mikroorganizmy

Humínové kyseliny, resp. ich zdroje sú známe aj pre svoju biologickú aktivitu⁴⁴ najmä vďaka ich antioxidačným, antitoxickým, rádioprotektívnym a antimutagénym vlastnostiam⁴⁵ a používajú sa ako nešpecifické stimulatory pri pestovaní kultúrnych rastlín^{46,47}. Biologická aktivita humínových kyselín sa zisťuje napríklad pomocou merania dĺžky koreňového systému rastliny. Poľnohospodárske rastliny, na ktoré pozitívne pôsobia humínové kyseliny, sú rozdelené do štyroch skupín⁴⁸: rastliny bohaté na uhlíhydráty – veľmi pozitívne pôsobenie, obilniny – mierny vplyv, na proteíny bohaté rastliny – len minimálny vplyv a olejnaté rastliny, u ktorých sa zistil negatívny vplyv humínových kyselín na vývoj rastlín. Vzťah medzi zložením a biologickou aktivitou humátov skúmali aj Bogoslivskiy a spol.⁴⁹.

Baktéria *Rhodococcus erythrophylis* CCM 2595, ktorá disponuje schopnosťou degradovať fenolické zlúčeniny, bola vybraná ako modelový prokaryotický organizmus v sorpčných experimentoch humínových kyselín na povrch týchto bakteriálnych buniek⁵⁰ (obr. 2). Miera sorpcie humínovej kyseliny závisí od množstva sorbentu, čiže v tomto prípade od koncentrácie biomasy. Ďalším, ešte dôležitejším faktorom je vplyv pH, kde sa zistila nepriama závislosť. Lepšie výsledky sorpcie HK na biomasu boli zaznamenané pri nižšej hodnote pH. Počas biodegradácie organických xenobiotík bol skúmaný vplyv HK na mikroorganizmy a zistilo sa, že sa ľahko a rýchlo sorbujú na povrch mikroorganizmu. Sledoval sa aj vplyv prídavku fenolu (ako stresového faktora) do kultivačného média,

ktorý pravdepodobne ovplyvnil iniciáciu sorpcie HK na biomasu. V experimentoch bez prídavku fenolu bola zaznamenaná nižšia sorpcia PCP na bakteriálny povrch ako v jeho prítomnosti⁵⁰.

Vrstva sorbovanej humínovej kyseliny slúži pravdepodobne ako transportná bariéra znižujúca prechod molekúl do vnútrobunkového priestoru. Tak zrejme chráni bunku pred nepriaznivými podmienkami prostredia (nízke pH, vysoká koncentrácia toxických látok) a napomáha rastu a biologickej aktivite mikroorganizmu a biodegradácii, aj po pridaní vyššej koncentrácie toxikkej látky^{52,53}. Negatívny toxický účinok organických xenobiotík na mikroflóru sa prejavil v poklese rastu bakteriálneho kmeňa *Kocuria varians*, ktorý disponuje schopnosťou degradovať chlórphenoly. Takisto došlo k zníženiu indexu nenasýtenia mastných kyselín dvoch hlavných membránových lipidov, fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu. Bolo zistené, že účinkom chlórphenolov na bunkovú membránu dochádzalo k inhibícii Δ^9 a Δ^{12} desaturáz, čo sú enzýmy lokalizované v bunkovej membráne zodpovedné za biosyntézu nenasýtených mastných kyselín⁵⁴.

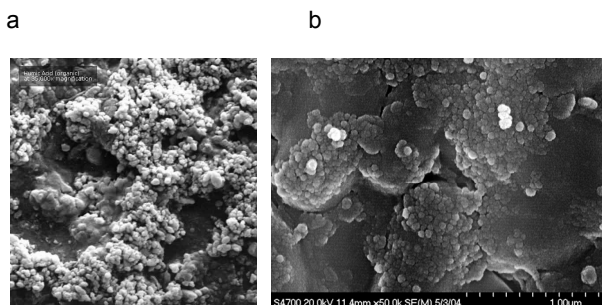
Zistilo sa, že biologická aktivita humínových kyselín závisí od pôvodu (suroviny) a od spracovania, teda postupu ich izolácie. Nie všetky humínové kyseliny sú biologicky aktívne, niektoré môžu pôsobiť dokonca inhibične⁴⁴. Humínové kyseliny sprostredkovávajú prenos živín a spolu tvoria štruktúru pôdy.

Novák a spol.⁵⁵ skúmali možnosť využitia odpadového uhlia zvýšením obsahu humínových látok oxidáciou. Bolo zistené, že biologická aktivita takto pripravených humínových látok je porovnateľná s aktivitou humínových látok extrahovaných z oxyhumolitu.

3.3. Úloha enzýmov ako katalyzátorov pri imobilizácii xenobiotík na humínové kyseliny

Proces imobilizácie vyskytujúci sa v pôdach má veľký environmentálny význam, pretože môže viesť k značnému zníženiu biopristupnosti pesticídov a tým aj ich toxických účinkov^{56,57}. Imobilizačný proces sprostredkovávajú enzýmy alebo abiotické katalyzátory. Jednou z najdôležitejších katalytických reakcií v pôde je oxidačná väzba, ktorá viaže prírodne sa vyskytujúce a tiež xenobiotické zlúčeniny, ako sú napr. pesticídy, na organickú hmotu. Táto reakcia môže byť sprostredkovaná oxidoreduktázami a môže mať detoxifikačný efekt. A tak imobilizácia pesticídov väzbou na pôdne komponenty, napr. zabudovaním do štruktúry humínových kyselín, môže byť uvažovaná ako alternatívna metóda na dekontamináciu pôd¹⁶.

Xenobiotické fenoly sú najprv enzymaticky oxidované na aryl-oxy voľné radikály alebo chinóny, čo následne umožňuje ich väzbu na humínové zlúčky. Napríklad, keď Sarkar a spol.⁵⁸ inkubovali 2,4-dichlórphenol s fulvo kyselinou, žiadna väzba nebola pozorovaná až do prídavku oxidoreduktázy, napr. hubovej tyrozinázy, chrebovej peroxidázy, alebo lakkázy z *Trametes versicolor* alebo *Rhizoctonia praticola*.



Obr. 2. Humínové kyseliny sorbované (a) na povrchu pôdnej častice (cit.⁶), (b) a na povrchu baktérie *Rhodococcus erythrophylis* (cit.⁵¹)

Avšak použitie mikrobiálnych extracelulárnych enzýmov ako katalyzátorov je sťažené skutočnosťou, že voľné enzýmy sú za drsných podmienok v pôde rýchlo inaktívované. Tento problém môže byť prekonaný imobilizáciou voľných enzýmov na tuhé nosiče. Bolo dokázané, že imobilizácia zvyšuje termostabilitu enzýmov, zabraňuje ich degradácii proteázami, a zvyšuje ich polčas rozpadu. Avšak enzýmová aktivita po imobilizácii závisí na metóde imobilizácie a podstate tuhého nosiča^{58,59}.

Použitie enzýmovej väzby na detoxifikáciu vyvoláva určité znepokojenie nad konečným osudom viazaných pesticídov. Dostupné dáta však indikujú, že ak sú už raz xenobiotiká inkorporované do pôdy, uvoľňujú sa veľmi pomalou rýchlosťou a v minimálnom rozsahu. Postupné uvoľňovanie by nemalo spôsobovať následné nebezpečie pre zdravie, pretože postupne uvoľnené zlúčeniny môžu byť mineralizované na CO₂ alebo reimmobilizované do pôdnej matrice.

Za účelom praktickej aplikácie enzymatickej dekontaminácie je potrebný rozsiahly výskum pre analyzovanie akumulácie, biopristupnosti a toxicity viazaných reziduí pesticídov za pôdnych podmienok. Výskum by mal byť sústredený na vývoj nových metód pre maximalizáciu väzbového procesu, napr. s použitím imobilizovaných enzýmov, abiotických katalyzátorov, alebo kopolymérnych činidiel. Všetky doterajšie výsledky naznačujú, že enzymatická alebo abiotická inkorporácia xenobiotík do humusu poskytuje účinnú metódu pre detoxifikáciu nebezpečných polutantov¹⁶.

Hydrofóbne látky, globálne kontaminanty životného prostredia, sú nebezpečné najmä vtedy, ak sa v pôde vyskytujú dlhodobejšie, čím sa úmerne zvyšuje ich perzistencia. Dochádza k výraznému zníženiu ich biodostupnosti pre potenciálnych mikrobiálnych degradérov, čím sa zhoršujú možnosti redukovania týchto látok prirodzenou biologickou cestou. V takomto prípade je možné na zníženie ich hydrofóbnosti použiť povrchovo aktívne látky, ktoré avšak môžu negatívne ovplyvňovať degradačnú aktivitu prítomných mikroorganizmov a v konečnom dôsledku sa aj tieto látky, tzv. biosurfaktanty, pokiaľ nie sú biodegradovateľné, stávajú kontaminantami.

Napriek pochybnostiam niektorých autorov⁶⁰, Fava a spol.^{61,62} úspešne využili vyššie opísané pozitívne vlastnosti humínových látok ako prirodzene sa vyskytujúcich povrchovo aktívnych látok na podporu aktivity pôdnych mikroorganizmov v prostredí kontaminovanom vysokými koncentráciami polyaromatických uhľovodíkov (PAH) a polychlórovaných bifenylov (PCB). V experimentoch dokázali, že prídavok HL výrazne ovplyvnil aktivitu prítomnej mikroflóry a tiež biodegradáciu PCB. V prítomnosti HL bola preukázaná vyššia odolnosť mikroorganizmov voči PCB v porovnaní so vzorkami bez prídavku HL. Tým bola dosiahnutá až o 100 % vyššia dechlorácia a biodegradácia PCB. Takisto bol študovaný vplyv HL na aeróbnou bioremediáciu pôdy kontaminovanej PAH. HL umožňovali zvýšenie biodostupnosti PAH, v dôsledku čoho bola redukcia týchto látok v prítomnosti HL rýchlejšia a intenzívnejšia, čo spôsobilo aj výrazné zníženie pôd-

nej ekotoxicity.

Chlórované fenoly, najmä pentachlórfenol, tiež patria k častým kontaminantom životného prostredia a vyznačujú sa podobnými vlastnosťami ako vyššie uvedené hydrofóbne látky. Humínové látky, resp. humínové kyseliny sú využívané aj pri laboratórnych experimentoch na bioremediáciu PCP v pôde^{26,27,35,39}. Cieľom je potvrdenie a doplnenie už existujúcich jednoznačných dôkazov, získaných na PCB a PAH, čo by znamenalo možné využitie HK v bioremediačných technológiách aj pri dekontaminácii PCP a pesticídov, ktorých sú často hlavnou zložkou.

4. Záver

Je známe, že fenolické zlúčeniny slúžia ako prekurzory humínových kyselín. Tento fakt je možné využiť pri imobilizácii a detoxifikácii pôdnych kontaminantov. Medzi ne často patria chlórphenoly známe ako základné zložky mnohých pesticídov. Štruktúra prírodných humínových kyselín je vhodná pre sorpčné, iónovo-výmenné a biodegradačné procesy. Dokonalá znalosť vlastností týchto látok je nevyhnutná pre ich širšie uplatnenie aj v remediačných technológiách.

Zoznam skratiek

HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
FK	fulvokyseliny
OMK	organo-minerálny komplex
PAH	polyaromatické uhľovodíky
PCB	polychlórované bifenyly
PCP	pentachlórfenol
POH	pôdna organická hmota

LITERATÚRA

- Hansen H. C. B., Kobza J., Schmidt R., Szakál P., Borgaard O. K., Holm P. E., Kanianska R., Bognarova S., Makovníková J., Matúšková L., Mičuda R., Styk J., v knihe: *Environmental Soil Chemistry*, str. 191. Pedagogická spoločnosť Jána Ámosa Komenského, Banská Bystrica 2001.
- Skokanová M., Dercová K.: Chem. Listy 102, 262 (2008).
- Lear G., Harbottle M. J., Sills G., Knowles C. J., Semple K. T., Thompson I. P.: Environ. Pollut. 146 (1), 139 (2007).
- Moore B. J., Headley V., Dupont R. R., Doucette W. D., Armstrong J. E.: J. Environ. Sci. Health A37, 425 (2002).
- Veselá L., Kubal M., Kozler J., Innemanová P.: Chem. Listy 99, 711 (2005).
- <http://www.humintech.com/>, stiahnuté 26.3.2007.
- Tan K. H.: *Environmental Soil Science*. Marcel Dekker, New York 2000.

8. Brüß A., Turion G., Noltner T. A., Schweikle V.: Mitteil. DBG 76, 1461 (1995).
9. Malcolm R. E., v kniže: *Developments in Plant and Soil Sciences*, str. 2. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht 1985.
10. Podlešáková E., Němeček J., Roth A.: Rostl. Výroba 45, 337 (1999).
11. Seki H., Suzuki A.: J. Coll. Inter. Sci. 171, 490 (1995).
12. Taylor M. D., Theng B. K. G.: Commun. Soil. Sci. Pl. Anal. 26, 765 (1995).
13. Klučáková M., Omelka M.: Chem. Pap. 58 (3), 170 (2004).
14. Klučáková M., Pekař M., v kniže: *Humic Substances: Natures's Most Versatile Materials* (Ghabbour E., Davies G., ed.), str. 263. Taylor and Francis, New York 2004.
15. Klučáková M.: CHEMagazín 14 (3), 8 (2004).
16. Agathos N. S., Reineke W.: *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation* (Hofman M., Anné J., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
17. Bollag J. M., v kniže: *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation* (Agathos N., Reineke W., ed.), str. 93. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
18. Simpson A., Kingery W., Foan E., Hatcher P.: 11th International meeting of the Humic Substances Society: *Humic Substances: Natures's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, str. 447.
19. Alexander M.: Environ. Sci. Technol. J. 29, 2713 (1995).
20. Dec J., Bollag J. M.: Soil Sci. Soc. Am. J. 52, 1366 (1988).
21. Kabelová Z., Novotná M.: ChemZi 1, 266 (2005).
22. Reháková M., Čuvanová S., Gaval'ová Z., Rimár J.: Chem. Listy 97, 260 (2003).
23. Oste A. L., Lexmond T. M., Riemsdijk van H.: J. Environ. Qual. 31, 813 (2002).
24. Vácha R., Podlešáková E., Němeček J., Poláček O.: Plant Soil Environ. 48, 335 (2003).
25. Huttenloech O., Roehl K. E., Czurda K.: Environ. Sci. Technol. 35, 4260 (2001).
26. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J.: Int. Biodeter. Biodegr. 58, 248 (2006).
27. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J.: Chemosphere 66, 783 (2007).
28. Oren A., Chefetz B.: Chemosphere 61, 19 (2005).
29. Dercová K., Barančíková G., Makovníková J., Sejáková Z., Žuffa J.: Chem. Listy 99, 682 (2005).
30. Makovníková J., Barančíková G., Dlapa P., Dercová K.: Chem. Listy 100, 424 (2006).
31. Szabová T., Búgel M., Leščinská M.: Acta Montan. Slovaca 4, 61 (1999).
32. Kwiatkowska J., Maciejewska A.: 11th International meeting of the Humic Substances Society: *Humic Substances: Natures's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, str. 295.
33. Arias M., Barral M. T., Mejuto J. C.: Chemosphere 48, 1081 (2002).
34. Barančíková G., Brečková V., Dluhoš J.: Rostl. Výroba 43, 107 (1997).
35. Dercová K., Barančíková G., Makovníková J., Sejáková Z., Skokanová M.: Vedecké práce VÚPOP 28, 22 (2006).
36. Mohan D., Chander S.: J. Colloid Interface Sci. 299, 76 (2006).
37. Passo N., Pouravouri J., Lehtonen T., Pihlaja K.: Environ. Int. 28, 173 (2002).
38. Clapp C. E., Hayes M. H. B., Senesi N., Bloom P. R., Jardine P. M. (ed.): *Humic Substances and Chemical Contaminants*. Soil Science Society of America, Madison 2001.
39. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J., Ružička J.: Chem. Listy 101, 799 (2007).
40. Ake C. L., Wiles M. C., Huebner H. J., McDonald T. J., Cosgriff D., Richardson M. B., Donnely K. C., Phillips T. D.: Chemosphere 51, 835 (2003).
41. Pu X., Cutright T. J.: Chemosphere 64, 972 (2006).
42. Voskamp M., Gergi A., Kopinke F.-D.: 13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 853.
43. Amiri F., Börnick H., Worch E.: Water Res. 39, 933 (2005).
44. Antošová B., Kozler J., Novák J., Kubiček J., Horová D., Vondrová I.: ChemZi 1, 256 (2005).
45. Gostishcheva M., Inisheva L. I., Fedko I.: 13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 445.
46. Pekař M., Klučáková M., Omelka L., Zedníčková P.: 13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1029.
47. Imbufe A. U., Patti A. F., Surapaneni A., Jackson W. R., Norng S.: 13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1013.
48. Khristeva L. A.: Pochvivedenie 10, 46 (1953).
49. Bogoslovskiy V. N., Levinskiy B. V., Kalabin G. A.: 13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1025.
50. Feifířová D., Čejková A., Masák J., Siglová M., Jirků V.: Third European Bioremediation Conference, Crete, Chania, Greece 2005. Proceedings (Kalogerakis N., ed.), str. 143.
51. Feifířová D., Šnajdr J., Siglová M., Čejková A., Masák J., Jirků V.: Chimia 59, 749 (2005).
52. Feifířová D., Čejková A., Masák J., Siglová M.: Sanační technologie VIII, Uherské Hradiště 2005. Zborník příspěvků (Burkhard J., Halousková O., ed.), str. 123.
53. Tchaikovskaya O., Sokolova I., Karetnikova E., Iva-

- nova E.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 925.
54. Dercová K., Čertík M., Maľová A., Sejáková Z.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 54, 251 (2004).
55. Novák J., Kozler J., Antošová B.: *ChemZi* 1, 275 (2005).
56. Alexander M.: *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego 1994.
57. Hatzinger P., Alexander M.: *Environ. Sci. Technol.* 29, 537 (1995).
58. Sarkar J., Malcom R., Bollag J. M.: *Soil Sci. Soc. Am. Inc. J.* 52, 688 (1988).
59. Ruggiero P., Sarkar J. M., Bollag J. M.: *Soil. Sci.* 147, 361 (1989).
60. Siglová M., Daňha D., Čejková A., Masák J., Jirků V., Minařík M.: *Sanační technológie VIII, Uherské Hradiště 2005*. Zborník abstraktov (Burkhard J., Halousková O., ed.), str. 127.
61. Fava F., Piccolo A.: *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2), 214 (2004).
62. Fava F., Berselli S., Conte P., Piccolo A., Marchetti L.: *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2), 214 (2002).

M. Skokanová and K. Dercová (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Interactions of Humic Acids with Contaminants**

Humic acids are the most important and a major part of naturally occurring humic substances. They form a complex amorphous heterogeneous mixture containing reactive structures such as aromatic rings and phenolic and carboxylic functional groups. Humic acids have excellent sorption properties and thus are widely used in remediation methods by immobilization of toxic contaminants.

VÝSKYT A VÝZNAM ENANTIOMERŮ V POTRAVINÁCH

SIMONA SRKALOVÁ, KVĚTA KALÍKOVÁ
a EVA TESAŘOVÁ*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Hlavova 8, 128 43 Praha 2**tesarove@natur.cuni.cz*

Došlo 17.5.07, přijato 13.11.07.

Klíčová slova: enantiomery, potraviny, hodnocení kvality

Obsah

1. Úvod
2. Enantiomery jako složky potravin – vývoj poznání
3. Význam enantiomerů v potravinách
 - 3.1. Aminokyseliny
 - 3.2. Hydroxykyseliny
 - 3.3. Karboxylové kyseliny s rozvětveným řetězcem
 - 3.4. Laktony
 - 3.5. Ketony, alkoholy a ethery
 - 3.6. Terpenoidy
 - 3.7. Flavonoidy
 - 3.8. Sloučeniny obsahující síru
 - 3.9. Vitaminy
4. Závěr

1. Úvod

Významná část přírodních látek je chirálních, vyskytují se ve formě enantiomerů, případně diastereomerů¹. Lze říci, že chiralita je základní vlastností živé hmoty. Proto je oprávněná pozornost věnována sledování stereoselektivního chování/působení sloučenin a z toho vyplývajících důsledků při aplikaci léčiv, agrochemikálií i při kontrole složek potravin. Především odlišnému chování enantiomerů léčiv je věnována pozornost již delší dobu. V posledních letech se zájem rozšiřuje i do oblasti agrochemikálií s ohledem na rozdílné účinky enantiomerů i enantioselektivní metabolismus². Záměna chirálních složek potravin nemá tak závažné důsledky jako třeba použití nevhodného enantiomeru léčiva¹, nicméně stanovení enantiomerního zastoupení může dobře posloužit v řadě aplika-

cí. Cílem tohoto přehledu je poskytnout základní informace o nejdůležitějších chirálních složkách potravin a jejich významu při hodnocení kvality potravin. Problematika enantioselektivní analýzy v biologických matricích, stejně jako články zaměřené na různé složky potravin se v Chemických listech objevují^{3–6}. Avšak tematika chirálních složek potravin zatím souhrnně pojednána nebyla.

2. Enantiomery jako složky potravin
– vývoj poznání

Dlouhou dobu nebyla významu stereochemie (enantiomernímu zastoupení) u složek potravin věnována odpovídající pozornost. Teprve v posledních desetiletích, s rozvojem stereoselektivních analytických metod, dosáhlo sledování enantiomerů významnějšího postavení i v potravinářské chemii. Enantiomery se vyznačují rozdíly nejen v prostorovém uspořádání, ale v důsledku toho také v chuti, vůni, výživové hodnotě, a tím ovlivňují celkovou kvalitu potravin². Enantioselektivní analýza může být využita při kontrole technologického zpracování, identifikaci příměsí, kontrole fermentačních procesů, stáří, hodnocení mikrobiální kontaminace a skladovacích podmínek, určování zeměpisného původu a při studiu a kontrole příchutí a aditiv v potravinách a nápojích^{2,7}.

Shodou okolností byla chiralita poprvé pozorována právě v nápoji. L. Pasteur si všiml, že krystalky soli kyseliny vinné vytvořené kolem hrdla lahve od vína se lišily od těch, které se objevily na dně lahve. Obě rozdílné krystalické struktury byly později identifikovány jako enantiomery, tj. sloučeniny, které jsou si navzájem zrcadlovými obrazy*.

Obecně se předpokládá, že přírodní makromolekuly jsou „homochirální“ (molekuly, které obsahují stereogenní centra se stejnou konfigurací)¹. Aminokyseliny, ze kterých se skládají peptidy a bílkoviny, se v organismech vyskytují převážně v L-formě. Příčinou „homochiralit“ může být fakt, že L-aminokyseliny jsou stabilnější než D-formy⁹. Pro sacharidy, které jsou např. složkou nukleových kyselin, jsou typické D-isomery². Přírodní výskyt D-aminokyselin nebo L-sacharidů je vzácný nebo je výsledkem neobvyklých transformací.

Potraviny obsahují přírodní sloučeniny - některé sloučeniny jsou přítomné pouze jako čisté enantiomery, jiné se zde vyskytují ve specifickém enantiomerním poměru nebo jako diastereomery.

* O podrobném popisu a názvosloví enantiomerů pojednává článek O. Červinky⁸. Uvedené názvosloví jsme se snažily dodržovat. Avšak vzhledem k obecně nejednotnému označování enantiomerů v literatuře, a následné možnosti nesprávné interpretace faktů získaných z literatury, ponecháváme označení převzatá z citovaných článků.

3. Význam enantiomerů v potravinách

Chuť a vůně jsou tvořeny komplexní směsí stovek sloučenin, z nichž některé jsou přítomné pouze ve stopových množstvích¹⁰. V potravinách a nápojích bylo identifikováno množství těkavých látek, jejichž značná část je známá svou chiralitou. Řada chirálních složek je přirozeného původu, zatímco jiné vznikají během výrobního procesu (fermentace, sušení, pražení, alkalického zpracování atd.)⁷. Chuťové a čichové vnímání je způsobeno interakcí molekuly s receptorem, který je tvořen chirálními látkami (např. proteiny). Receptor má tedy možnost enantioselektivního rozpoznávání daného rozdílnou interakcí s enantiomery¹¹. Např. D-sacharidy jsou kalorické a karioenní. L-Sacharidy by neměly být kalorické, ani způsobovat zubní kaz, což by mohlo být využito při uplatnění L-sacharidů jako náhražky sacharosu. Obě enantiomerní formy sacharidů mají sladkou chuť¹². Chirální chuťové a vonné složky v přírodních produktech jsou obecně charakterizovány specifickou distribucí enantiomerů; sloučeniny nejsou vždy přítomné ve formě jednoho čistého enantiomeru, ale vyskytují se ve specifickém enantiomerním poměru. Tento poměr se může lišit podle druhu a stupně zrání, ale i podle zeměpisného původu⁷. Vyhodnocením specifického enantiomerního zastoupení sloučenin, které nejsou citlivé k racemizaci, mohou být rozlišeny přírodní a umělé (obvykle racemické) složky přidané do potravin.

Detekce přítomnosti jiných enantiomerů může mít velký význam pro stanovení kvality daného produktu. Např. proteiny v potravinách mohou racemizovat následkem nevhodného technologického zpracování, jako je nadměrný ohřev, ozáření nebo úprava za extrémních hodnot pH. Eventuelně mohou být do produktu přidány umělé, racemické přísady, čímž dochází k jeho znehodnocení. Během minulých let proto vzrostl zájem o prověřování enantiomerní čistoty složek potravin. Napomohl tomu i fakt, že enantiomery mohou mít rozdílné výživové hodnoty, chuť, vůni, a zejména biologickou aktivitu⁷. Škála chirálních složek potravin, o jejichž sledování je z tohoto pohledu zájem, se tudíž stále rozšiřuje. Patří sem především aminokyseliny, karboxylové kyseliny a jejich deriváty, ketony, aldehydy, cukry, ethery, laktony a řada dalších.

3.1. Aminokyseliny

Enantiomery aminokyselin obecně, včetně těch přítomných v potravinách, jsou jednoznačně nejlépe prozkoumanou skupinou chirálních sloučenin. Je to dáno nejen četností výskytu, ale i relativně dobře zvládnutou, tudíž dnes už jednoduchou, možností stanovení enantiomerů aminokyselin. Lze říci, že většina stávajících enantioselektivních separačních systémů umožňuje dobré rozdělení a následnou kvantifikaci enantiomerů aminokyselin. Problematika separace je však nad rámec tohoto článku. Zájemce o podrobnější informace týkající se metod používaných pro enantioselektivní separaci lze odkázat na řadu článků^{13–16}, kapitol v knihách² i monografií¹⁷.

Enantiomery aminokyselin se často liší chutí. Napří-

klad většina hydrofóbních L-aminokyselin je hořkých, zatímco příslušné D-formy mají velmi sladkou chuť (např. D-asparagin)².

D-Aminokyseliny mohou sloužit jako vhodné ukazatele podmínek zpracování. Jsou obsaženy v potravinách a nápojích vystavených vysokoteplotní úpravě, fermentačním procesům a extrémním hodnotám pH. Všechny aminokyseliny přítomné v peptidech a proteinech racemizují, avšak rozdílnou rychlostí, což je dáno odlišnými konstantami racemizace. Rychlost racemizace je dále ovlivňována vnějšími faktory, jakými jsou právě teplota, pH, ale i koncentrace aj.¹⁰. Bylo prokázáno, že L-aminokyseliny vázané v proteinech podléhají racemizaci desetkrát rychleji než volné aminokyseliny. Racemizace aminokyselin během zpracovávání za vysokých teplot nebo v alkalickém prostředí může být zodpovědná za tvorbu DD-, DL- a LD-peptidových vazeb. Taková variabilita vazeb následně snižuje schopnost proteolytických enzymů tyto proteiny trávit, a tím dochází ke snižování nutriční hodnoty daných potravin¹⁸. Zpracování proteinů může zahrnovat žádoucí změny v chuti, struktuře a rozpustnosti proteinů; stejně tak mohou být vyvolány i změny nežádoucí, jako je zesíťování nebo hnědnutí, a v neposlední řadě racemizací procesy. Faktory, které ovlivňují racemizaci aminokyselin v proteinech během jejich zpracování, byly už dříve studovány. Na aminokyselinách a proteinech v mléce byl prováděn výzkum, který měl za cíl určit, zda-li je racemizace vyvolána během obvykle používaných průmyslových procesů, jako je pasterizace a zpracování za vysokých teplot. Výsledky ukázaly, že krátkodobé vystavení relativně vysokým teplotám v průběhu zpracování racemizaci nevyvolalo¹⁹.

Pražení kávových a kakaových bobů představuje další příklad vysokoteplotních procesů, kde lze využít racemizace aminokyselin pro hodnocení kvality finálního výrobku. Stupeň pražení bývá popisován hodnotou organického úbytku při pražení, která je zjišťována jako hmotnostní úbytek. Z důvodu obtížnosti měření této hodnoty se stupeň pražení obvykle stanovuje jako úbytek či nárůst některých složek⁷. Vzájemný vztah mezi stupněm pražení, parametry procesu a racemizací aminokyselin byl popsán matematickou funkcí. Tak lze zjistit hodnotu organického úbytku při pražení z poměru D/L enantiomerů a celkového množství aminokyselin. Tato metoda může být použita také u jiných procesů zpracování a jiných potravinových produktů, např. u pečených výrobků. Stupeň racemizace aminokyselin tak může být významným ukazatelem podmínek zpracování a kvality potravin²⁰.

Při výrobě mléčných výrobků, piva, vína, pečiva a dalších potravin a nápojů jsou používány určité kmeny mikroorganismů. Selektivní mikroorganismy svou činností mohou zlepšovat či naopak zhoršovat chuť, vůni, strukturu, výživovou hodnotu a skladovatelnost potravin¹⁰. Všechny bakterie produkující mléčnou kyselinu mají v peptidoglykanu buněčné stěny kromě jiných D-aminokyselin také D-asparagovou kyselinu, zatímco jiné bakterie tuto aminokyselinu neobsahují. D-Aminokyseliny jsou v bakteriích tvořeny z L-analogů za katalýzy racemas

a epimeras⁷. Čerstvě nadojené mléko je většinou kontaminováno mikroorganismy přítomnými v batoru, zejména anaerobními bakteriemi rodu *Bacteroides*, *Ruminococcus* a *Butyrivibrio*²¹. Nízké, avšak významné hladiny D-aminokyselin nalezených v mléce jsou výsledkem trávení a autolýzy batorových bakterií. Zastoupení D-aminokyselin bylo sledováno ve vzorcích mléka skladovaných několik týdnů při teplotě 4 °C. D-Alanin byl jedinou volnou aminokyselinou, u které proběhly znatelné změny v enantiomerním poměru D/L. Patrně šlo o důsledek činnosti psychrotrofních bakterií. Přítomnost D-alaninu v množství větším než 4 % proto může fungovat jako indikátor kontaminace mléka a je používán při sledování trvanlivosti produktu²².

Hladina D-alaninu v sušeném mléce bývá někdy vyšší (13–16 %), což signalizuje přítomnost bohaté mikroflóry uvolňující alanin racemasu. Racemasa má maximální aktivitu při teplotě 65 °C a během technologického procesu produkuje D-alanin²³.

D-Aminokyseliny by neměly být přítomné v kvalitních nekvašených, nijak nezpracovaných potravinách. Racemizace aminokyselin je obecně ukazatelem buď přítomnosti příměsí, a nebo jiného znehodnocení potravin. Konkrétně přítomnost pouze D-alaninu, D-glutamové kyseliny a D-asparagové kyseliny znamená mikrobiální kontaminaci⁷.

Enantioselektivní analýza aminokyselin je novým prostředkem pro hodnocení kvality dalších nekvašených potravinových výrobků, jakými jsou třeba ovocné džusy a med⁷. V ovocných nápojích lze přídavek levné, uměle připravené aminokyseliny použít k zamaskování zředování produktu vodou snadno rozpoznat z přítomnosti syntetické, tedy racemické směsi aminokyselin¹². Sedm aminokyselin, konkrétně DL-arginin, DL-prolin, DL-asparagin, DL-serin, DL-alanin, DL-glutamová kyselina a DL-asparagová kyselina, je zodpovědných za 90 % veškerého obsahu aminokyselin nalezených v pomerančových džusech²⁴. D-Arginin, D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina byly však detegovány v pomerančových džusech rovněž jako přirozeně se vyskytující D-enantiomery z rostlinných zdrojů, půdy nebo mikroorganismů²⁵. Významné hladiny D-aminokyselin byly nalezeny také v medu. Určení enantiomerního poměru vybraných aminokyselin může být použito při zjišťování doby skladování a podmínek, za kterých byl med vyráběn. Enantioselektivní analýza aminokyselin však také může poskytnout informace o bylinném a zeměpisném původu medu²⁶. Nejvýznamnější aminokyselina v medu je L-prolin, jehož obsah činí 50 až 85 % z celkového množství volných aminokyselin. Zpracováním medu za vysokých teplot se jednak snižuje celkové množství aminokyselin, a zároveň se zvyšuje relativní zastoupení D-aminokyselin¹⁰.

Výskyt D-aminokyselin v kvašených potravinách je přirozený. Důvodem je jednak přítomnost D-aminokyselin v buněčné stěně bakterií, odkud se mohou uvolňovat do okolí, a dále pak působení bakteriálních racemas či epimeras, které přeměňují L-aminokyseliny na jejich D-analogy²⁷. V sýru, jogurtu, víně, octu atd. jsou ve větším

množství opět zastoupené D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina. Narozdíl od výše uvedených nekvašených produktů je však zde jejich přítomnost žádoucí. Významné je zastoupení těchto aminokyselin ve zrajících sýrech; jejich množství roste v průběhu zrání. Zrající sýry jsou vyráběny ze syrového mléka, do kterého je přidáno syřidlo a bakteriální kultury. Stejně D-aminokyseliny převládají také v jogurtech. Množství těchto enantiomerů je v korelaci s bakteriálním nárůstem *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. Zvláště obsah D-alaninu, který je produkovan pouze bakterií *L. bulgaricus*, je používán jako platný rychlý ukazatel pro měření koncentrace *L. bulgaricus* v jogurtu²⁸.

D-Aminokyseliny mohou vznikat v potravinách nejen činností mikroorganismů, ale také v kyselém prostředí z L-analogů za přítomnosti glukosy, fruktosy nebo sacharosy²⁹.

Hlavní zdroje D-aminokyselin pro člověka jsou potraviny a nápoje. Dále získává člověk D-aminokyseliny degradací buněčných stěn mikroorganismů ve střevě a *de novo* syntézou³⁰. Pouze 10–20 % přijatých D-aminokyselin je vyloučeno, zbylých 80–90 % je zachyceno ve střevech a přeměněno na α -oxokyseliny za působení oxidasy D-aminokyselin, která je přítomná zejména v játrech, ledvinách a mozku³¹. Toxicita D-aminokyselin pro lidský organismus nebyla dosud jasně prokázána, také jejich metabolická dráha není dodnes zcela známa¹⁹. Nahromadění D-aminokyselin v organismu, způsobené nízkou aktivitou oxidasy, však může vyvolat řadu poškození, např. inhibici enzymové syntézy nebo potlačení růstu³². Metabolismus těchto enantiomerů může být ovlivněn i dalšími faktory, jako např. rychlostí transportu, činností střevních enzymů a bakterií, absorpcí a ledvinovým oběhem⁷. Při intravenózním podání čisté racemické směsi aminokyselin dospělým osobám i dětem se neprojeví žádné toxické účinky, přestože podaná dávka obsahovala vyšší koncentraci aminokyselin, než je množství přijímané v běžné potravě²¹.

L-Valin, L-leucin a L-isoleucin (L-enantiomery rozvětvených aminokyselin) jsou součástí mnoha potravinových doplňků užívaných lidmi s nadměrnou fyzickou zátěží (např. sportovci). Tyto aminokyseliny pomáhají snižovat únavu v důsledku zvyšování hladiny serotoninu. Proto je nesmírně důležité kontrolovat enantiomerní čistotu těchto výrobků, aby nedocházelo k výživovým ztrátám z důvodu vzniku nemetabolisovatelných a biologicky nevyužitelných forem těchto aminokyselin³³.

Volná kyselina glutamová se přirozeně vyskytuje ve větším množství v bramborách, rajčatech, hrášku a jedlých houbách. Její sodná sůl se běžně používá jako potravinové aditivum zlepšující chuť. Pro tento účel má však význam pouze L-enantiomer, označovaný jako E 621 (cit.¹⁰).

Čajové aroma a chuť ovlivňují kromě řady dalších těkavých složek také chirální aminokyseliny. Mezi aminokyselinami běžně se vyskytujícími v čaji má unikátní postavení theanin (5-N-ethylglutamin). Tato aminokyselina se vyskytuje pouze volná, nevázaná v proteinech a je majoritní volnou aminokyselinou v čaji. Aminokyselina L-theanin se kromě čaje vyskytuje pouze v jednom dalším přírodním zdroji, v houbě *Xerocomus badius*¹⁰. L-Enan-

tiomer theaninu tvoří téměř 2 % sušiny z čaje³⁴. Theanin zlepšuje kvalitu a charakteristickou chuť zeleného čaje. Oba čisté enantiomery theaninu, stejně jako racemická směs, mají sladkou chuť¹⁰. Při analýze několika druhů čaje bylo zjištěno, že celkové množství theaninu a podíl D-isomeru se mění podle druhu analyzovaného čaje^{35*}. Sledováním procesů racemizace mohou být získány informace o výrobě, skladování a přepravě čajových produktů.

3.2. Hydroxykyseliny

Bakterie *Streptococcus thermophilus* vytváří pouze (S)-formu mléčné (2-hydroxypropanové) kyseliny, *Lactobacillus bulgaricus* produkuje naopak (R)-enantiomer. Proto je možné sledovat růst těchto mikroorganismů měřením poměru R/S mléčné kyseliny. Korelace mezi počtem mikroorganismů a poměrem enantiomerů poskytuje spolehlivý a rychlý prostředek při kontrole dodržování pravidel Evropské Unie pro výrobu potravinových produktů⁷.

Mléčná kyselina je hlavní organickou kyselinou přítomnou v sáke a víně. Přirozeně se vyskytující mikroorganismy produkující mléčnou kyselinu jsou tradičně využívány při výrobě sáky; přídavek (S)-mléčné kyseliny má zajistit zjednodušení procesu zrání. (S)-Mléčná kyselina zabraňuje růstu neúčinných (nežádoucích) mikroorganismů v sáce. Kvasinky (druh *Saccharomyces cerevisiae*) během procesu zrání sáky produkují (R)-mléčnou kyselinu, nikoliv však její (S)-isomer. Množství (S)-mléčné kyseliny tedy během zrání v důsledku produkce (R)-isomeru klesá³⁶.

Jablečná (hydroxybutandiová) kyselina se v přírodě vyskytuje pouze ve své (S)-formě. Příměs racemické kyseliny v různých ovocných džusech je proto snadno detegována.

Podle požadavků na kvalitu nápojů mohou ovocné nápoje obsahovat syntetickou příměs, zatímco ovocné džusy musí být ryze přírodní¹⁰.

Dalším příkladem využití chirální látky ke kontrole kvality potravin je (S)-vinná (2,3-dihydroxybutandiová) kyselina, která je rozšířená v rostlinách, zejména v hroznech vinné révy, zatímco (R)-vinná kyselina není v přírodě běžná³⁷. I v tomto případě lze využít enantioselektivní analýzu k ověření pravosti přírodní vinné šťávy.

3.3. Karboxylové kyseliny s rozvětveným řetězcem

Rozvětvené karboxylové kyseliny a jejich estery jsou známé přírodní aromatické sloučeniny přítomné v ovoci a sýrech. Přítomnost racemických směsí těchto látek v potravinách může znamenat jejich užití jako umělých aditiv, což není vždy povoleno.

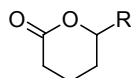
2-Methylbutanová kyselina a její methyl- a ethyl-

estery byly nalezeny v opticky čisté (S)-formě v jablkách, kterým propůjčují příjemně ovocně sladké aroma. Rovněž všechny přírodní jablečné produkty obsahují opticky čistou (S)-2-methylbutanovou kyselinu. Přídavek umělé racemické sloučeniny je snadno rozpoznatelný, (R)-enantiomer této kyseliny má pronikavý sýrově nasládlý zápach⁷.

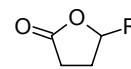
3-Methylpentanová, 4-methyloktanová, 4-ethyl-oktanová a 4-methylnonanová kyselina byly detegovány v sýrech. Ve všech případech měly (S)-enantiomery dvojnásobně nižší práh zápachu než (R)-enantiomery³⁸. Je zřejmé, že stáří resp. kvalitu sýrů je možné určovat podle zastoupení (R)-forem příslušných kyselin, a to jak pouhým čichem, tak instrumentální analytickou metodou.

3.4. Laktony

Laktony jsou látky ovlivňující chuť potravin. Vyskytují se např. v ovoci, mléčných výrobcích, nápojích. Důležité jsou zejména δ - a γ -laktony⁷. δ -Laktony jsou obsaženy především v živočišných produktech (mase, tuku, mléce) a kvašených potravinách. γ -Laktony jsou naopak aromatickými komponentami v ovoci, zelenině a dalších produktech rostlinného původu. Molekuly těchto laktonů obsahují pět resp. šest uhlíkových atomů se vyskytují ve dvou enantiomerních formách. Činností kvasinek mohou vzniknout opticky aktivní γ - a δ -laktony přeměnou 4- a 5-oxo-kyselin.



γ -lakton (I)



δ -lakton (II)

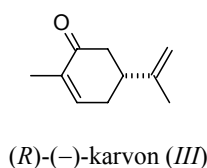
Enzymatickými procesy vznikají tyto laktony v charakteristickém enantiomerním poměru. Během zrání se však může měnit enzymová aktivita, metabolismus, a tedy i zastoupení chirálních komponent. Tyto změny pak ovlivňují chuť, vůni i strukturu ovoce a zeleniny¹⁰. Specifické a charakteristické enantiomerní poměry laktonů byly nalezeny v meruňkách, broskvích, malinách, jahodách, švestkách, mangu, rynglích, mučence, a také v ovocných džusech, vínech a lihovinách. Opticky čisté γ -laktony mají sladkou bylinnou chuť různé intenzity. Obecně je (R)-konfigurace laktonů aromatictější než (S)-forma. (R)- γ -Laktony byly detegovány ve vysoké optické čistotě; (R)- γ -dekalakton a (R)- γ -dodekalakton jsou převládajícími složkami v jahodách. Významný nadbytek (R)- γ -dekalaktonu byl nalezen rovněž v malinovém džusu, zatímco v malinách převládají (S)- δ -laktony. V kokosovém ořechu byla zjištěna převládající (R)-forma δ -oktalaktonu a δ -dekalaktonu, přičemž množství těchto (R)- δ -laktonů klesá s rostoucí délkou uhlíkového řetězce v molekule⁷. Opačný trend byl

* Při zpracování a výrobě čaje se využívá procesu fermentace. Podle toho jsou rozlišovány 3 druhy čajů: zelený (nefermentovaný) čaj, oolong (polofermentovaný) čaj a černý (fermentovaný) čaj.

zaznamenán v mléčných výrobcích. Poměr *R/S* mléčných δ -laktonů je používán jako parametr při určování původu tuků³⁹. Specifické enantiomerní poměry γ - a δ -laktonů nejsou ovlivněny teplotními procesy⁷, proto lze enantioselektivní analýzou stanovit specifický enantiomerní poměr těchto sloučenin v různých přírodních zdrojích, který umožňuje detegovat přídavek syntetických laktonů.

3.5. Ketony, alkoholy a ethery

Mnohé ketony, alkoholy a ethery jsou chirální aromatické sloučeniny běžně přítomné v potravinách. Karvon (2-methyl-5-(1-methylethenyl)-2-cyklohexen-1-on) se vyskytuje v rozdílném enantiomerním složení v mátě, kopru, kmínu, pomerančích a grapefruitech. (*S*)-(+)-karvon má kmínovou vůni, ale (*R*)-(–)-karvon voní po mátě⁷.



Opticky čistý (*S*)-heptan-2-ol byl detegován v ovoci a listech černého rybízu⁷. Naopak v kukuřici a kokosovém ořechu je přítomna převážně (*R*)-forma heptan-2-olu (cit.¹⁰). Výsledky studie zabývající se přítomností (*R*)- a (*S*)-butan-2-olu v destilátech ukázaly, že v těchto nápojích významně převládá (*R*)-enantiomer⁴⁰. Ten je v alkoholických nápojích pravděpodobně tvořen činností bakterií v zápaře, neboť kvasinky produkují pouze (*S*)-butan-2-ol. Přítomnost (*R*)-enantiomeru je proto obecně považována za důsledek bakteriálního znečištění zápaře nebo vína používaných k destilaci⁷.

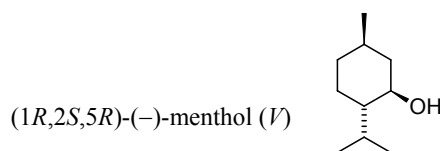
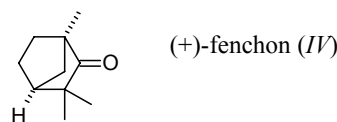
Vyšší obsahy (*R*)-1-okten-3-olu, (*S*)-pentan-2-olu a (*S*)-heptan-2-olu byly nalezeny v houbách a ovoci. Zvláště intenzivní houbovitý zápach má (*R*)-1-okten-3-ol (cit.⁷). Tento enantiomer se vyskytuje v mnoha jedlých druzích hub, např. v *Psalliota campestris* a *Psalliota bispora*¹⁰. (*S*)-Analog je méně aromatický.

1-Okten-3-ol vzniká také v máselném oleji (výrobku získaném z másla postupným odstraňováním vody a tukuprosté sušiny) jako produkt autooxidace linolové kyseliny (majoritní mastná kyselina). Zvýšení množství (*R*)-(–)-1-okten-3-olu během skladování je tedy důkazem degradace oleje⁴¹.

I další chirální alkoholy jsou významné z hlediska kontroly kvality potravin. Např. linalool je důležitou chuťovou složkou vyskytující se v proměnlivém enantiomerním složení v koriandru a dalších esenciálních olejích. V olejích ze sicilských a španělských sladkých pomerančů je hlavní složkou (*S*)-linalool, zatímco v olejích z hořkých pomerančů převládá (*R*)-forma. Stanovení poměru enantiomerů proto umožňuje detegovat znehodnocení olejů z hořkých pomerančů příměsí levnějšího oleje ze sladkých pomerančů. V kyselém prostředí však linalool podléhá

racemizaci, a proto musí být tento fakt brán v úvahu při stanovování enantiomerního poměru třeba v ovocných džusech a vínech⁷.

Enantioselektivní vyhodnocení se používá jako velmi úspěšná metoda zjišťování kvality olejů. (*S*)-Borneol (endo-(1*S*)-1,7,7-trimethylbicyklo[2,2,1]heptan-2-ol) je spolehlivým indikátorem přírodního charakteru rozmarýnového oleje. (+)-Fenchon ((1*S*)-1,3,3-trimethylbicyklo[2,2,1]heptan-2-on) je zodpovědný za typickou vůni feňukového oleje⁷. Menthol (5-methyl-2(1-methylethyl)cyklohexanol), chirální monoterpenický alkohol, je významnou složkou mnoha komerčně vyráběných produktů, jejichž součástí je mentholový olej, např. tabák, kosmetika, farmaceutické výrobky, alkoholické a nealkoholické nápoje aj.⁴¹ Tento alkohol má tři chirální centra, tudíž osm stereoisomerů, avšak známé mentholové aroma má pouze (1*R*,2*S*,5*R*)-isomer⁴².



Theaspirany (chirální spiroethery) (2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4,5]dec-6-en) byly nalezeny jako směs diastereomerů v černém čaji, vanilce, angreštu a malinách různého zeměpisného původu⁷. V angreštu a kdoulích byl zjištěn značně vyšší obsah (2*S*,5*S*)- a (2*S*,5*R*)-isomerů theaspiranu než (2*R*,5*R*)- a (2*R*,5*S*)-isomerů. V malinách se vyskytovaly tyto isomery v opačném poměru⁴³.

3.6. Terpenoidy

Monoterpeny a seskviterpeny jsou primární produkty rostlin. Tyto těkavé látky jsou významnými složkami rostlinných silic (etherických olejů)¹⁰. Příkladem chirálních terpenoidů je limonen, α -pinen a β -pinen.

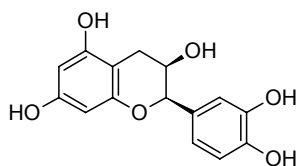
Limonen je obsažen v citronové, pomerančové, mandarinkové, grapefruitové, kmínové a koprové silici⁴². (*S*)-Enantiomer voní po citronech, zatímco (*R*)-limonen má pomerančové aroma.

α -Pinen a β -pinen mají typickou terpentýnovou vůni¹⁰. Příkladem rozdílného enantiomerního zastoupení pinenu je pryskyřice smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karsten), kde množství (1*S*)-(–) enantiomerů α -pinenu a β -pinenu významně převládá nad množstvím (1*R*)-(+)-enantiomerů⁴⁴.

3.7. Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny široce rozšířené v potravinách a nápojích. Tyto látky jsou zpravidla synteti-

zovány rostlinami; nalézají se v zelenině, ovoci, koření, léčivých rostlinách a vyskytují se buď volné (aglykon), nebo ve formě glykosidů. K flavonoidům se řadí zejména flavony, isoflavony, flavonoly, flavonony, katechiny, anthokyanidiny a chalkony. Mnoho z nich přispívá k chuti a barvě potravin. Tyto sloučeniny mají antioxidační, antimikrobiální a antivirovou aktivitu, jsou známy jejich protizánětlivé, a dokonce i protinádorové účinky. Flavonoidy mají v potravinách důležité nutriční, ale i farmaceutické funkce. Z důvodu jejich specifického výskytu v různých druzích rostlin mohou být vhodnými ukazateli kvality a bezpečnosti potravin¹². Zatímco čokoláda obsahuje pouze (+)-katechin ((2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2*H*)-benzopyran-3,5,7-triol) a (–)-epikatechin, spektrum katechinů vyskytujících se v čajích je širší⁴⁵. (–)-Epigallokatechin gallát spolu s galláty dalších katechinů tvoří více než 90 % z celkového množství katechinů v zeleném čaji⁴⁶. Světle růžový (–)-epikatechin tvoří podstatnou část fenolických sloučenin v čaji vyráběného z listů čajovníku čínské (Camellia sinensis), které jsou zodpovědné za charakteristickou chuť a vůni čaje⁴⁷. V ovoci guarana (Paullinia cupana) byly nalezeny obě enantiomerní formy katechinů, zatímco jiné druhy ovoce obsahují pouze (+)-katechin⁴⁸.



(–)-epikatechin (VT)

3.8. Sloučeniny obsahující síru

Mučenka je tropické ovoce, za jehož unikátní chuť jsou zodpovědné sloučeniny obsahující ve své struktuře síru. Směs *cis*- a *trans*-2-methyl-4-propyl-1,3-oxathianu dodává ovoci silné ovocné aroma⁷. Další sloučeninou je 3-merkaptiohexanol, který je přítomný zejména jako (*S*)-enantiomer, ačkoliv poměrné zastoupení obou isomerů se mění v širokém rozmezí. Naopak 3-methylthiohexanol je přítomen v mučence ve vysoce čisté (*S*)-formě, a proto je vhodným kritériem pro hodnocení kvality produktu⁴⁹.

3.9. Vitaminy

Vitaminy tvoří rozsáhlou skupinu strukturně různorodých látek, které obecně obsahují jedno nebo více chirálních center. Vitaminy se vyskytují přirozeně v živých organismech, ale mohou být také používány jako potravinová aditiva. Sledováním stereochemického složení vitaminů mohou být získány informace o jejich odlišné účinnosti, ale také stáří, původu, skladovacích podmínkách atd¹⁰.

Panthenonová kyselina (vitamin B5) je součástí koenzymu A, biologickou aktivitu vykazuje pouze (+)-enan-

tiomer¹⁰. Askorbová kyselina (vitamin C), známý přírodní antioxidant a neenzymový přenašeč vodíku, je nezbytná pro syntézu vaziva a odolnost organismu. Těmito vlastnostmi se vyznačuje pouze (*S*)-forma askorbové kyseliny². Biotin (vitamin H), koenzym karboxylas, se podílí na správné funkci kůže. Biologicky aktivní formou je (+)-forma, která má všechny části postranního řetězce v *cis* konfiguraci. Tokoferol (vitamin E), významný přírodní antioxidant, obsahuje ve své molekule tři chirální centra, tudíž existuje osm isomerů. Tokoferol, který má všechna chirální centra v *R* konfiguraci, vykazuje nejvyšší biologickou aktivitu a je označován jako α -tokoferol. Působí příznivě proti srdečním a cévním chorobám a v pokročilejším věku zpomaluje pokles imunity. (*R*)-isomer fylochinonu (vitamin K) je nezbytný pro srážlivost krve. Dostatek (*S*)-methylmethioninu (vitamin U) slouží jako prevence komplikací v těhotenství a při porodu. Vysoké dávky (6*S*)-isomeru folinové kyseliny v kombinaci s fluorouracilem jsou používány jako protinádorová léčiva u pacientů s pokročilým karcinomem. (6*R*)-isomer je neúčinný¹⁰.

Vitaminy patří mezi významná přírodní potravinová aditiva s antioxidačními účinky. Širší použití našly především vitaminy C a E.

4. Závěr

Znalost chiralit přírodních a uměle připravených sloučenin má pro hodnocení kvality potravin nemalý význam. Enantiomerní poměry potravinových komponent neovlivňují pouze chuť a vůni výrobku, ale také výživovou hodnotu. Vlivem nevhodného zpracování potravin může docházet k racemizaci jednotlivých složek. Ke změně poměru enantiomerů dochází také při nesprávném skladování, např. v důsledku bakteriální kontaminace, či přidávkem syntetické příměsi. Určování enantiomerního zastoupení v potravinách a nápojích má tudíž velkou vypovídající hodnotu a je důležitou součástí potravinářské analýzy.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře UK, projekt č. 305/2006 B CH, projektu Kontakt ME 895 od MŠMT a dlouhodobému výzkumnému záměru MŠMT, projekt č. MSM0021620857.

LITERATURA

1. Maier N. M., Franco P., Lindner W.: J. Chromatogr., A 906, 3 (2001).
2. Tesařová E., Armstrong D. W., v knize: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl Z., ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 1998.
3. Zahradníčková H., Hartvich P., Holoubek I.: Chem. Listy 99, 703 (2005).
4. Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
5. Doležal M.: Chem. Listy 100, 959 (2006).

6. Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
7. Marchelli R., Dossena A., Palla G.: Trends Food Sci. Technol. 7, 113 (1996).
8. Červinka O.: Chem. Listy 93, 294 (1999).
9. MacDermott A. J.: Origins Life Evol. Biosphere 25, 191 (1995).
10. Ekborg –Ott K. H., Armstrong D. W., v knize: *Chiral Separations: Applications and Technology* (Ahuja S., ed.), kap. 9. American Chemical Society, Washington 1997.
11. Pickenhagen W., v knize: *Flavor Chemistry – Trends and Developments* (Teranishi R., Buttery R. G., Shahidi F., ed.). American Chemical Society, Washington 1989.
12. Simó C., Barbas C., Cifuentes A.: Electrophoresis 24, 2431 (2003).
13. Tesařová E., Bosáková Z., Pacáková V.: J. Chromatogr., A 838, 121 (1999).
14. Berthod A., Liu Y. B., Bagwill C., Armstrong D. W.: J. Chromatogr., A 731, 123 (1996).
15. Ilisz I., Berkecz R., Peter A.: J. Sep. Sci. 29, 1305 (2006).
16. Gubitz G., Schmid M. G.: Electrophoresis 25, 3981 (2004).
17. Beesley T. E., Scott R. P. W.: *Chiral Chromatography*. John Wiley & Sons, Chichester 1998.
18. Liardon R., Lederman S.: J. Agric. Food Chem. 34, 557 (1986).
19. Tovar L. R., Schwass D. E., v knize: *Xenobiotics in Foods and Feeds* (Finley J. W., Schwass D. E., ed.). American Chemical Society, Washington 1983.
20. Nehring U. P.: *Proceedings of the Symposium on Chemical Reactions in Foods* (Velišek J., ed.). VUPP-STI, Praha 1992.
21. Brückner H., Jaek P., Langer M., Godel H.: Amino Acids 2, 271 (1992).
22. Gandolfi I.: J. Food Sci. 57, 377 (1992).
23. Marchelli R.: J. Sci. Food Agric. 59, 217 (1992).
24. Simó C., Barbas C., Cifuentes A.: J. Agric. Food Chem. 50, 5288 (2002).
25. Friedman M. J.: J. Agric. Food Chem. 47, 3457 (1999).
26. Poncini L., Wimmer F. L., Vakamoce V.: Fiji Agric. J. 45, 65 (1983).
27. Casal S., Alves A. R., Mendes E., Oliveira M. B. P., Ferreira M. A.: J. Agric. Food Chem. 51, 6495 (2003).
28. Pantó F., v knize: *Progress in Food Fermentation, Proceedings of the Euro Food Chem.* (Benedito de Barber C., ed.), sv. VII. IATA-CSIC, Valencia 1993.
29. Brückner H., Justus J., Kirschbaum J.: Amino Acids 21, 429 (2001).
30. Zagon J., Dehne L. I., Bögl K. W.: Nutr. Res. 14, 445 (1994).
31. D'Aniello A., D'Onofrio G., Pischetola M., D'Aniello G., Vetere A., Petrucelli L., Fisher G. H.: J. Biol. Chem. 268, 16949 (1993).
32. D'Aniello A., Di Fiore M., Fisher G.: Trends Compar. Biochem. Physiol. 4, 1 (1998).
33. Boniglia C., Carratu B., Sanzini E.: J. Food Sci. 67, 1352 (2002).
34. Lekh R. J., Djong-Chi C., Tsutomu O., Yukiko N., Hidehiko Y.: Trends Food Sci. Technol. 10, 199 (1999).
35. Ekborg-Ott K. H., Armstrong D. W., Taylor A. D.: J. Agric. Food Chem. 50, 473 (2002).
36. Kodama S., Yamamoto A., Matsunaga A., Matsui K., Nakagomi K., Hayakawa K.: J. Agric. Food Chem. 50, 767 (2002).
37. Kodama S., Yamamoto A., Matsunaga A., Hayakawa K.: J. Chromatogr., A 932, 139 (2001).
38. Karl V., Gutser J., Dietrich A., Maas B., Mosandl A.: Chirality 6, 427 (1994).
39. Nago H., Matsumoto M.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 57, 427 (1993).
40. Manitto P., Chialva F., Speranza G., Rinaldo C.: J. Agric. Food Chem. 42, 886 (1994).
41. Mosandl A.: J. Chromatogr. 624, 267 (1992).
42. Mosandl A.: Food Rev. Int. 4, 1 (1988).
43. Schmidt G., Full G., Winterhalter P., Schreier P.: J. Agric. Food Chem. 40, 1188 (1992).
44. Silvestrini E., Michelozzi M., Skroppa T., Brancaloni E., Ciccio P.: J. Chromatogr., A 1034, 183 (2004).
45. http://www.zdrava-rodina.cz/med/med899/med899_29.html, staženo 2.4.2007.
46. Zimeri J., Tonh Ch.: J. Food Sci. 64, 753 (1999).
47. Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).
48. Kofink M.: Lebensmittelchemie 59, 111 (2005).
49. Weber B.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 199, 48 (1994).

S. Srkalová, K. Kalíková, and E. Tesařová
(Department of Physical and Macromolecular Chemistry,
Faculty of Science, Charles University, Prague): **The
Presence and Importance of Enantiomers in Food**

The chirality of natural and synthetic compounds is a significant factor in evaluation of food quality. Individual enantiomers or enantiomeric ratios in food components do not influence only flavour and aroma but also affect their nutritional values. As a consequence of foodstuff processing, chiral components can racemize. The enantiomer distribution can change also during storage due to, e.g., bacterial contamination or adulteration with synthetic additives. Determination of enantiomeric ratios in food and beverages can therefore provide valuable information for food quality control.

VÝVOJ METODY IZOLACE KAROTENOIDNÍCH BARVIV Z KVASINEK RODU *Rhodotorula*

TEREZA KRULIKOVSKÁ, PETRA PATÁKOVÁ
a MIROSLAV LUKČO

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
Tereza.Krulikovska@vscht.cz

Došlo 21.1.08, přepracováno 3.3.08, přijato 28.4.08.

Klíčová slova: *Rhodotorula*, karotenoidy, narušení buněk, extrakce

Úvod

Karotenoidy představují skupinu strukturně odlišných přírodních barviv, majících celou řadu rozličných vlastností (specifické zbarvení, antioxidační vlastnosti, prekursor mnoha hormonů, interakce s volnými radikály). Díky těmto vlastnostem našly uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích (potravinářství, zemědělství, kosmetický a farmaceutický průmysl). Průmyslově je v současné době vy-

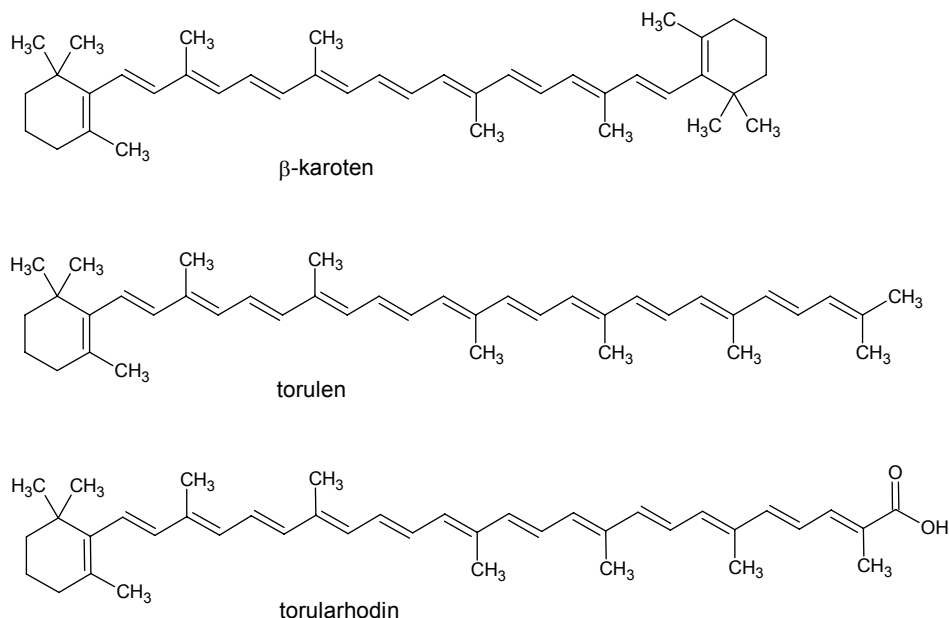
ráběno pouze několik karotenoidů, upřednostňována je jejich mikrobiální produkce oproti syntetickým výrobám či izolaci z rostlinného materiálu. Mezi významné mikrobiální producenty těchto látek řadíme řasy, kvasinky, plísňe i bakterie^{1–4}.

Karotenoidní barviva se u mikrobiálních buněk nalézají v intracelulárním prostoru, jsou rozpustné v tucích, a tudíž nikdy nedifundují do živného prostředí. Pro jejich úspěšnou izolaci je nezbytná dezintegrace buněčných stěn a jejich následná extrakce do organického rozpouštědla³.

Tato práce je zaměřena na porovnání metod izolace karotenoidních barviv z buněk kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*. Tyto kvasinky patří mezi významné producenty torulenu, torularhodinu a β -karotenu. Strukturní vzorce těchto karotenoidů jsou uvedeny na obr. 1 (cit.⁵).

Ačkoliv byla publikována řada metod pro rozrušení buněčných obalů a izolaci karotenoidních barviv, jen několik z nich bylo možno aplikovat na kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*. Jakákoli manipulace se vzorky byla navíc komplikována faktem, že karotenoidy jsou vysoce foto- a termolabilní a rozkládají se působením vzdušného kyslíku. V tab. I je uveden stručný přehled metod využívaných k narušení buněk a jejich aplikace, uváděné v literatuře.

V této práci byly použity pouze techniky využívající k rozrušení kvasinkových buněk organických rozpouštědel či nízkých teplot.



Obr. 1. Strukturní vzorce karotenoidních barviv produkovaných kvasinkami *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabulka I

Přehled metod rozrušení buněk a jejich aplikace uváděné v literatuře

Zásah narušující integritu buněk	Aplikace	Lit.
<i>Organická rozpouštědla</i>		
Aceton	<i>Gordonia jacobacea</i>	6
Methanol	<i>Brevibacterium licens</i>	7
DMSO	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1
Kombinace DMSO, aceton, petrolether ⁸	<i>Rhodotorula glutinis</i>	8
<i>Sušení při 50 °C</i>		
Sušení při 50 °C a extrakce do DMSO ⁹	<i>Phaffia rhodozyma</i>	9
<i>Vortex</i>		
Vortex a skleněné kuličky ^{10, 11}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10, 11
<i>Desintegrátory</i>		
Desintegrátor se skleněnými kuličkami ⁹	<i>Candida bondinii</i>	9
Ultrazvukový dezintegrátor ¹²	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	12
Dezintegrace ultrazvukem s chlazením v ledu ¹³	<i>Clostridium</i> , <i>Acetobacterium</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Thermohydrogenium</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
<i>Další metody</i>		
Bioneb	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14, 15
<i>Enzymy</i>		
Enzymy	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	16

Experimentální část

Kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* (DBM 19) byla získána ze sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, kvasinka *Rhodotorula glutinis* (CCY 20-2-26) pochází ze sbírky mikroorganismů Slovenské akademie věd.

Pro vlastní kultivaci bylo použito médium s následujícím složením: glukosa 25 g l⁻¹, kvasničný extrakt 10 g l⁻¹, K₂HPO₄ 2 g l⁻¹, KH₂PO₄ 2 g l⁻¹, MgSO₄ · 7 H₂O 0,1 g l⁻¹; pH 6.

Kvasinky byly kultivovány v třepaných baňkách při teplotě 28 °C po dobu minimálně dvou dnů. Buněčná suspenze (10 ml u metod 1–5, 100 ml u metod 6 a 7) byla odstředěna (11 000 g) a dvakrát promyta destilovanou vodou. Takto získaná buněčná suspenze byla dále zpracována podle použité izolační metody:

Metoda 1. Aceton^{6,8}

- přidáno 5 ml acetonu,
- mícháno na vortexu 30 s,

- následně 15 s zchlazení v ledu,
- míchání na vortexu a následné zchlazení v ledu opakováno 10×,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- analýza organické fáze.

Metoda 2. Aceton se zmrazením a rozmrazením¹³

- přidáno 5 ml acetonu,
- zmrazeno při teplotě –80 °C,
- po zmrznutí rozmrazeno ponořením do teplé vody,
- mícháno na vortexu 30 s,
- následně 15 s zchlazení v ledu,
- míchání na vortexu a následné zchlazení v ledu opakováno 10×,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- analýza organické fáze.

Metoda 3. Aceton, míchání na vortexu dezintegračními kuličkami¹⁷

- přidáno: 5 ml acetonu, dezintegrační kuličky,

- mícháno na vortexu 30 s,
- následně 15 s zchlazení v ledu,
- míchání na vortexu a následné zchlazení v ledu opakováno 10×,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- analýza organické fáze.

Metoda 4. Aceton, míchání na vortexu se skleněnými kuličkami^{10,11}

- přidáno: 5 ml acetonu, 5 ks skleněných kuliček (průměr 3 mm),
- mícháno na vortexu 30 s,
- následně 15 s zchlazení v ledu,
- míchání na vortexu a následné zchlazení v ledu opakováno 10×,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- analýza organické fáze.

Metoda 5. Sušení při teplotě 50 °C a následná extrakce do DMSO⁹

- převedeno do alobalového nebo porcelánového kelímku,
- sušení do konstantní hmotnosti při 50 °C,
- 1 g sušiny použit pro extrakci DMSO,
- analýza organické fáze.

Metoda 6. DMSO¹

- přidáno 3 ml DMSO a 5 ks skleněných kuliček (průměr 3 mm),
- kultivace na třepačce: 49 °C, 160 rpm, 1 h,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- postup s DMSO ještě 2× zopakován,
- k odstředěné buněčné suspenzi přidáno 3 ml acetonu,
- míchání na vortexu 2 min,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- postup s acetonem opakován do úplného odbarvení buněk,
- spojení DMSO a acetonových frakcí v děliči,
- promytí 13 ml H₂O,
- extrakce barviv do petroletheru (vždy 5 ml, opakováno do odbarvení),
- spojené frakce petroletheru odpařeny na vakuové odparce,
- rozpuštění v 3 ml petroletheru,
- analýza organické fáze.

Metoda 7. Dezintegrace kapalným dusíkem a následná extrakce do acetonu^{14,18}

- pomocí destilované vody převedeno do třecí misky s tloučkem,
- zalití tekutým dusíkem a rozetření suspenze tloučkem (5×),

- pomocí 2 ml acetonu převedeno do kyvety,
- míchání na vortexu 2 min,
- odstředění (11 000 g, 5 °C),
- postup s acetonem ještě 2x zopakován,
- analýza organické fáze.

Mírou účinnosti dané metody byla zvolena koncentrace karotenoidních barviv stanovená spektrofotometricky při vlnové délce 455 nm (Spektrofotometer SPEKOL 1300, Analytik JENA AG, Německo). Koncentrace karotenoidů byla stanovena minimálně v pěti paralelách.

Kvantitativní analýza barviv byla provedena metodou HPLC: HPST Agilent 1100, kolona: reversní C-18 (WATREX 250 × 4 mm Nucleosil120 5-C18) UV/Vis detektor, autosampler, mobilní fáze methanol pro HPLC, průtok 1 ml min⁻¹, na koloně byla udržována konstantní teplota 25 °C. Standard: β-karoten (Sigma Aldrich). Identifikace torulenu a torularhodinu byla provedena pomocí HPLC-MS za stejných podmínek.

Výsledky a diskuse

Celkem bylo porovnáváno sedm metod (viz Experimentální část), z toho tři metody se ukázaly jako nevhodné už v průběhu izolace barviv, a proto koncentrace karotenoidů nebyla u těchto metod ani zjišťována. Jednalo se o metody dezintegrace působením acetonu spolu s dezintegračními kuličkami (metoda 3), o metodu založenou na sušení buněčné suspenze při 50 °C s následnou extrakcí do DMSO (metoda 5) a o dezintegraci kapalným dusíkem (metoda 7). U první zmíněné metody (metoda 3) úlomky buněk, které se nepodařilo oddělit od organické fáze, rušily spektrofotometrické stanovení. U druhé metody (metoda 5) byl problém s odebráním usušené biomasy, protože se biomasa vždy připekla ke stěnám sušícího kelímku. U třetí metody (metoda 7) docházelo k velkým ztrátám způsobeným zachycením karotenoidů na tloučku a přeléváním vzorku, proto se od jejího dalšího používání upustilo.

Porovnání vybraných úspěšných metod dezintegrace buněk je uvedeno v tabulce II. Mírou účinnosti metody byla zvolena koncentrace karotenoidních barviv stanovená spektrofotometricky při 455 nm. Výhodou této metody oproti např. HPLC stanovení je, že výsledky jsou k dispozici okamžitě.

Ačkoli by se mohlo předpokládat, že metody využívající pro rozrušení buněk působení acetonu (metoda 1), kombinující účinek acetonu s působením teploty (metoda 2), nebo s dezintegračními (metoda 3) či skleněnými kuličkami (metoda 4) poskytnou stejné výsledky, nebylo tomu tak. Nejvyšší koncentrace karotenoidů byla zjištěna u vzorků, kde pro rozrušení buněk bylo použito pouze acetonu. Tyto výsledky byly ovšem stanoveny s velmi malou opakovatelností, která byla pravděpodobně způsobena tím, že vzorky nebyly v průběhu stanovení homogenní. Prudké zmrazování a rozmrazování buněčné suspenze v prostředí acetonu (metoda 2) rozrušení buněk nepomohlo

Tabulka II

Spektrofotometrické stanovení karotenoidních barviv po izolaci pomocí vybraných metod

Metoda	Aceton	Aceton, zmrazení a rozmrazení	Aceton, skleněné kuličky	DMSO
Číslo metody	1	2	4	6
Koncentrace karotenoidních barviv, mg l ⁻¹	0,271±0,165	0,058±0,021	0,096±0,018	6,749±0,264
Variační koeficient, %	61,0	37,3	18,4	3,9

Pozn.: Stanovení byla prováděna nejméně v pěti paralelách

Tabulka III

Korelační koeficienty mezi metodou spektrofotometrickou a HPLC-UV/VIS u kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*

Kvasinky	Korelační koeficient	P
<i>R. glutinis</i>	0,922	0,00896
<i>R. mucilaginosa</i>	0,896	0,0156

a koncentrace barviv byla nižší než v předešlém případě. Hodnota variačního koeficientu byla sice mnohem nižší než u metody s acetonem (metoda 1), ale přesto stále ještě dosti vysoká. Tato hodnota variačního koeficientu (tabulka II) dokazuje, že podmínky, za kterých docházelo k rozrušení buněk, nebyly stejné pro všechna paralelní stanovení. Dokonce při použití této metody pro rozrušení buněk byla stanovena nejnižší koncentrace karotenoidů. Skleněné kuličky (metoda 4) měly o něco lepší účinek na rozrušení buněk, výsledky byly stanoveny také s větší opakovatelností, ale přesto byla koncentrace barviv ve vzorku velmi nízká a neodpovídala koncentracím uváděným v literatuře.

Nejvyšší koncentrace karotenoidních barviv byla stanovena u vzorku po dezintegraci DMSO (metoda 6), sou-

Tabulka IV

Porovnání výsledků s údaji v literatuře

Kvasinky	Koncentrace β-karotenu stanovená HPLC		
	[mg l ⁻¹]	[μg g ⁻¹]	Lit.
<i>R. glutinis</i>	5,72 6,71	51 66	tato práce
<i>R. glutinis</i>		70	Perrier a spol. ²⁰ (1995)
<i>R. glutinis</i>	7,4 7,5 8,1 6,7 10,0 8,5 1,5 9,2 14,0 22,0		Bhosale a Gadre ¹⁹ (2001)
<i>R. glutinis</i>	39,0 44,0		Bhosale a Gadre ²¹ (2001)
<i>R. glutinis</i>		113	Davoli a spol. ²² (2004)
<i>R. mucilaginosa</i>	5,82 7,74	56 71	tato práce
<i>R. mucilaginosa</i>		100	Perrier a spol. ²⁰ (1995)

časně byla tato koncentrace naměřena s nejmenším rozptylem dat pro paralelní stanovení. Tato koncentrace karotenu také odpovídá hodnotám uváděným v literatuře¹⁹.

Na základě těchto výsledků a jejich konfrontace s literárními údaji bylo rozhodnuto, že nejvhodnější metodou pro dezintegrace buněk kvasinky *Rhodotorula* je metoda s DMSO s následnou extrakcí karotenoidních barviv do acetonu (metoda 6).

V průběhu dalších experimentů byla vybraná metoda použita k dezintegraci buněčné suspenze kvasinek *Rhodotorula* a izolaci karotenoidních barviv, jejichž koncentrace byla stanovena metodou HPLC. Určením korelačních koeficientů mezi metodou spektrofotometrickou a HPLC (tab. III) bylo zjištěno, že spektrofotometrická metoda poskytuje výsledky srovnatelné s metodou HPLC.

Výsledky stanovení β -karotenu metodou HPLC a jejich porovnání s publikovanými daty jsou uvedeny v tabulce IV. Z tabulky je patrné, že námi zjištěné koncentrace odpovídají výsledkům jiných autorů.

Závěr

Závěrem lze shrnout, že nejvhodnější metodou pro rozrušení buněk kvasinky *Rhodotorula* je metoda s DMSO s následnou extrakcí barviv do acetonu (metoda 6). Spektrofotometrická metoda poskytuje srovnatelné výsledky s metodou HPLC, přesto ji doporučujeme pouze pro stanovení hrubého obsahu karotenoidních barviv. Pro kvantifikaci obsahu jednotlivých karotenoidů je nutno použít metodu HPLC, námi vybrané podmínky stanovení poskytují výsledky srovnatelné s publikovanými daty.

LITERATURA

- Buzzini P., Martini A., Gaetani M., Turchetti B., Pagnoni U. M., Dávili P.: *Enzyme. Microb. Technol.* 36, 687 (2005).
- Breierová E., Márová I., Čertík M.: *Chem. Listy* 99, 109 (2005).
- Drábková M., Kočí R., Kubešová J., Passoth V., Márová I.: *Chem. Listy* 99, 278 (2005).
- Márová I., Hrdličková J., Kočí R., Drábková M., Kubešová J., Vidláková T., Babák L.: *Chem. Listy* 99, 322 (2005).
- Bhosale P., Gadre R. V.: *Bioresour. Technol.* 76, 153 (2001a).
- de Miguel T., Siero C., Villa T. G.: *J. Agric. Chem.* 49, 1200 (2001).
- Guyomarch F., Binet A., Dufosse L.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 64 (2000).
- Park P. K., Kim E. Y., Chu K. H.: *Sep. Purif. Technol.* 53, 148 (2007).
- Calo P., Velazquez J. B., Siero C., Blanco P., Longo E., Villa T.: *J. Agric. Chem.* 43, 1396 (1995).
- Lee J. H., Choi I. Y., Kil I. S., Kim S. Y., Yang E. S., Park J.-W.: *Biochim. Biophys. Acta* 1526, 191 (2001).
- Izava S., Inoue Y., Kimura A.: *FEBS Lett.* 368, 73 (1995).
- Davydova M. N., Sabirova R. Z.: *Biochemistry (Moscow)* 67, 822 (2002).
- Brioukhanov A. L., Thauer R. K., Netrusov A. I.: *Microbiology* 71, 281 (2002).
- Fuchsová J.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2005.
- Fialová A.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2000.
- Kaiser P., Surmann P., Valentin G., Fuhrmann H.: *J. Microbiol. Methods* 70, 142 (2007).
- Michailova L., Hristozova T., Roshkova Z., Dmitrev V., Radoevska S., Kujumdzieva A.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 191 (1998).
- <http://www1.qiagen.com/literature/brochures/Category.aspx?ID=4406>, staženo 20.9.2007.
- Bhosale P., Gadre R. V.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 327 (2001).
- Perrier V., Dubreucq E., Galzy P.: *Arch. Microbiol.* 164, 173 (1995).
- Bhosale P., Gadre R. V.: *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 12 (2001).
- Davoli P., Mierau V., Weber R. W. S.: *Appl. Biochem. Microbiol.* 40, 392 (2004).

T. Kruliková, P. Patáková, and M. Lukčo
(Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague): **Method of Isolation of Carotenoid Dyes from *Rhodotorula* Yeasts**

The work was aimed at finding an appropriate method of isolation of carotenoid dyes from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa* yeasts. Seven isolation methods involving only chemical cell disruption were examined. The methods were evaluated spectrophotometrically (at 455 nm). The best method utilizes DMSO for cell disruption followed by organic solvent extraction. This method gives results comparable with those found in literature.

KRÁSA A ROZMANITOST STRUKTUR PŘÍRODNÍCH ANTIBIOTIK

FRANTIŠEK HAMPL^a, JITKA MORAVCOVÁ^b,
JANA ČOPÍKOVÁ^c, LUBOMÍR OPLETAL^d,
OLDŘICH LAPČÍK^b a PAVEL DRAŠAR^b

^a Ústav organické chemie, ^b Ústav chemie přírodních látek,

^c Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6, ^d Katedra farmaceutické
botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Krá-
lové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové
pavel.drasar@vscht.cz

Došlo 13.7.08, přijato 9.10.08.

Klíčová slova: přírodní látky, antibiotika, infekce, mikro-
organismy, houby

Obsah

1. Úvod
2. β -Laktamy
3. Aminoglykosidy
4. Makrolidy
5. Tetracykliny
6. Ansamyciny
7. Polypeptidy
8. Glykopeptidy
9. Glykosidy
10. Jiná antibiotika
11. Závěr

1. Úvod

Tento článek je dalším z řady přehledů, ve kterých popisujeme rozmanitost přírodních látek^{1–7}. Významným zdrojem informací v této oblasti je obsažná databáze „Antibase 2007“, která popisuje⁸ celkem 33 557 přírodních sloučenin. Její elektronická verze je dostupná ve formátu pro ISIS/Base (MDL), ChemFinder (CambridgeSoft) a SciDex (LCI Publisher). Relevantní data lze najít i v monografiích a přehledech^{9–12} i speciálním čísle časopisu Chemical Reviews¹³.

Prvním popsáním přírodním antibiotikem bylo modré barvivo izolované přesně před 120 lety německým vědcem Eduardem von Freudenreichem z kultury *Bacillus pyocyaneus*^{14,15}. Pionýrských bádání na tomto poli se zúčastnili

i Rudolf Emmerich a Oscar Low. Za objevitele antibiotik je však historicky považován skotský lékař Alexander Fleming, od jehož publikace popisující antibakteriální účinky plísně *Penicilium notatum* uplyne příští rok 80 let. Použitelné množství penicilinu izoloval pak tým, který vedl anglický lékař Howard W. Florey. Za objev penicilinu dostali A. Fleming, H. W. Florey a německý biochemik Ernest Chain v roce 1945 Nobelovu cenu. H. W. Florey později objevil ještě další antibiotikum – cefalosporin. V roce 1943 americký biochemik ruského původu Selman A. Waksman oznámil, že objevil nové antibiotikum izolované z plísně *Streptomyces*, které dostalo název streptomycin. Za objev streptomycinu, neomycinu a dalších antibiotik se stal v roce 1952 rovněž nositelem Nobelovy ceny. Termín „antibiotika“ pochází právě od něho a označují se tak látky produkované houbami a mikroorganismy, které vykazují antibakteriální účinky¹⁶. V současnosti se k antibiotikům často řadí kontroverzně i syntetická antibakteriální chemoterapeutika¹⁷. Počet dodnes izolovaných a charakterizovaných antibiotik se pohybuje v řádu tisíců, třebaže využití v medicíně nalezl jen malý zlomek z tohoto počtu látek, především kvůli vysoké toxicitě většiny z nich. V řadě případů farmaceutický průmysl rozvinul i syntetické obměny těchto přírodních materiálů a úpravami jejich lékových forem zlepšil terapeutickou využitelnost těchto substancí^{18–20}. Některá antibiotika se vyrábějí i plně syntetickou cestou²¹. Hledání nových účinných antibiotik ovšem nikdy nekončí, neboť bakterie vynikají vysokou rezistencí, která zahrnuje základní tři mechanismy: a) destrukci antibiotika enzymovým systémem bakterie, b) funkční změnu místa účinku tak, že je pro antibiotikum méně dostupné a c) snižování koncentrace antibiotika v bakteriálních buňkách pod toxickou koncentraci tím, že je vytěšňováno přes membránu pomocí efluxních pump.

Existují experimentální metody, kterými se zjišťuje případný vývoj nežádoucí rezistence, jsou to však metody s velmi omezenou platností. To, že si mikroorganismy na dané antibiotikum nevytvorí rezistenci, lze poznat až teprve potom, když se pohybuje v běžném přírodním biologickém cyklu alespoň 10 let. Jak se vyvíjela záležitost zkřížené rezistence na antibiotika u tzv. nemocničních kmenů *Staphylococcus aureus*, je humánní klinické mikrobiologii dostatečně dobře známo. Nelze pochybovat, že rezistence k antibiotikům má genetický původ. V podstatě lze říci, že některé bakteriální druhy jsou rezistentní primárně: např. gramnegativní střevní tyčinky jsou rezistentní vůči penicilinu, makrolidům a linkosamidům, zástupci rodu *Klebsiella* k ampicilinu, *Pseudomonas aeruginosa* je rezistentní na klotrimoxazol, zástupci rodu *Streptococcus* na aminoglykosidová antibiotika, rod *Enterococcus* na cefalosporiny. V současné době je však na celém světě problém s bakteriální rezistencí získanou. Její vznik je

možný realizací jedné ze tří cest: 1) genovou mutací chromosomu, 2) přenosem plazmidu obsahující gen rezistence při konjugaci bakterií, 3) přenosem plazmidu pomocí bakteriofágu.

Všechny tři způsoby jsou více než reálné. Průkaz přenosu rezistence z jednoho bakteriálního druhu do dalšího byl experimentálně prováděn už v 60. letech, a to s úspěchem.

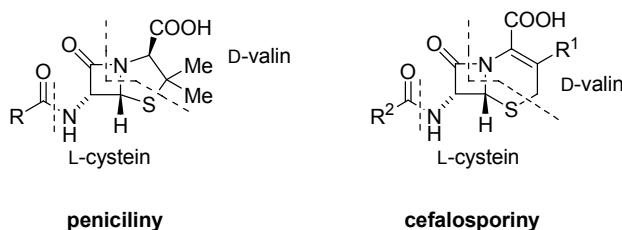
Antibiotika účinkují různými mechanismy. V tomto přehledu uvádíme v jednotlivých případech pouze principy účinku; pro podrobnosti odkazujeme např. na cit.²²

Předkládaný článek nemůže být vyčerpávajícím přehledem. Cílem tohoto přehledu je upozornit na různé typy významně účinných přírodních antibiotik, na jejich strukturní poezii a bezbřehou rozmanitost. Při klasifikaci antibiotik se zhruba přidržíme obvyklého schématu, založeného na jejich strukturní podobnosti.

2. β -Laktamy

β -Laktamová antibiotika (zejména peniciliny) jsou nejznámějšími a nejdéle používanými antibiotiky. Jejich charakteristickým strukturním rysem je čtyřčlenný β -laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem, např. 1,3-thiazolidinem (peniciliny), dihydro-1,3-thiazinem (cefalosporiny a cefamyciny) a 1,3-thiazolinem (penemy). β -Laktamová antibiotika se někdy označují též jako antibiotika peptidová vzhledem k jejich biogenezi - ve struktuře penicilinů a řadě cefalosporinů lze snadno identifikovat L-cystein a D-valin (obr. 1). Účinnost této skupiny antibiotik je dána přítomností reaktivního β -laktamového seskupení, kterým se tyto látky kovalentně váží na enzym DD-transpeptidasu. Důsledkem je inhibice tvorby peptidoglykanu mureinu, který zpevňuje bakteriální stěnu, a vlivem osmotického tlaku pak dochází k destrukci buněčné stěny bakterie²².

Peniciliny obecně účinkují především proti grampozitivním bakteriím (polosyntetické také proti gramnegativním) a používají se v terapii široké škály infekčních chorob od streptokokových infekcí přes syfilis až po lymeskou boreliózu. Z přírodních penicilinů, kterých bylo dosud objeveno více než 10, je třeba zmínit především penicilin G (benzylpenicilin, penicilin II), produkt kultur *Penicil-*



Obr. 1. Obecná struktura penicilinů a cefalosporinů

lium sp., *Aspergillus sp.*, *Trichophyton sp.* a klasicky *P. notatum*. Jeho 4-hydroxybenzylderivát byl izolován z kultur *Penicillium sp.* Význam penicilinu G spočívá především v tom, že je prekurzorem celé řady semisyntetických penicilinů. Fermentačně připravený penicilin G se nejprve hydrolyzuje na kyselinu 6-aminopenicilanovou (6-APA), jejíž acylací se získá požadovaný penicilin (Schéma 1).

Z dalších přírodních penicilinů jmenujme alespoň penicilin O (almecillin, penicillin AT) produkovaný různými kulturami rodu *Penicillium sp.*, ke kterým byla přidána (allylsulfanyl)octová kyselina. Penicilin K (heptylpenicilin, penicilin IV) byl izolován také z kultur *Penicillium sp.* O dva uhlíky kratší, avšak stejně aktivní pentylpenicilin (amylpenicilin, gigantic acid, Flavacidin, Flavacin), se nachází v izolátu z kultur *Aspergillus giganteus* a *Penicillium sp.* Kultury *Penicillium sp.* a *Aspergillus sp.* produkují penicilin F (penicilin I, 2-pentenylpenicilin, Flavacidin). Penicilin KPN izolovaný z kultur *Paecilomyces carneus*, *P. persicus* a *Penicillium carneus* je účinný proti stafylokokům *Staphylococcus aureus* a *Sarcina lutea*. Penicilin N, řazený často mezi cefalosporiny, obsahuje vázanou D-aminoadipovou kyselinu (Adicillin, Synnematin B, cefalosporin N, Salmotin), jehož producentem je *Streptomyces sp.*, *Actinomadura cinereorectus* (zřejmě jde o *Streptomyces cinereorectus*) a *Cephalosporium salmosynnematum* a je aktivní proti *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus vulgaris*. Podobně aktivní je i jeho diastereoisomer isopenicilin N, v jehož struktuře je L-aminoadipová kyselina. Isopenicilin N produkují kultury *Penicillium chrysogenum* a *Streptomyces*

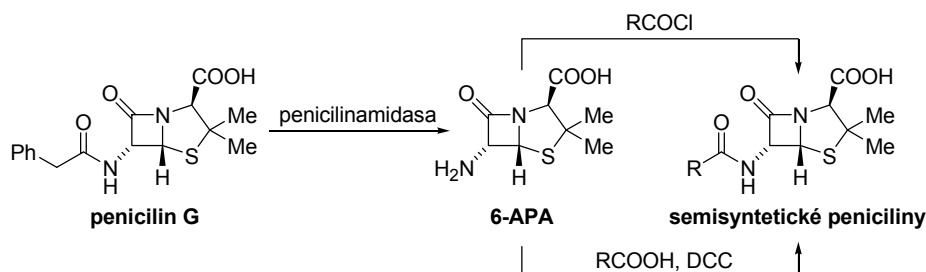
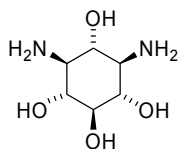


Schéma 1. Transformace penicilinu G na semisyntetické peniciliny

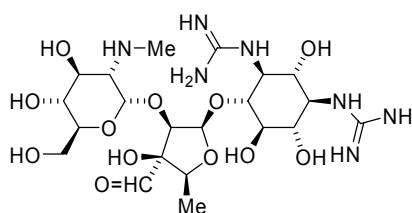
kteřé jsou rezistentní na jiná antimikrobiální chemoterapeutika.

Patrně nejznámějším antibiotikem této skupiny aminoglykosidů je streptomycin (streptomycin A) vyskytující se např. v *Streptomyces griseus*, *S. bikiniensis*, *S. mashi-uensis*, *S. galbus*, *S. olivaceus* a *S. erythrochromogenes-narutoensis*. Přestože byl streptomycin objeven již v r. 1943 Waksmanem, dodnes patří spolu s dalším antibiotikem rifampicinem (viz dále) a se syntetickými antimykobakteriálními látkami²³ (isoniazid, ethambutol, pyrazinamid) k léčivům první linie nasazovaným proti TBC. Kromě streptomycinu A je známo ještě dalších 12 streptomycinů. Neomycin (Framycetin) ze *Streptomyces fradiae* byl rovněž objeven Waksmanem. Je účinný proti gramnegativ-

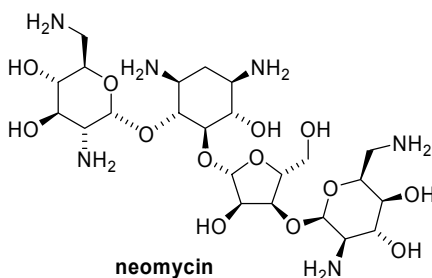
ním bakteriím a používá se převážně topicky. Skupina neomycinů čítá přibližně 20 látek. K neomycinům se řadí i paromomyciny, skupina asi 10 antibiotik, z nichž nejznámější je samotný paromomycin (Catenulin) získávaný ze *Streptomyces rimosus* subsp. *Paramomycinus* a používaný v terapii střevních infekcí a leishmaniózy. Gentamicin (gentamycin A, garamycin) je zástupcem skupiny asi 60 příbuzných látek, mezi kterými jsou i halogenaminocukry (např. 5-deoxy-5-fluorogentamicin C1 z *Micromonospora purpurea* ATCC 31119, jehož název zřejmě není správný, neboť poloha mezi hydroxylovanými uhlíky na samotném streptaminu je skutečně číslována C-5, ale v komplexu gentamicinu C1 je správněji C-2). Gentamicin se používá k léčení infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi,



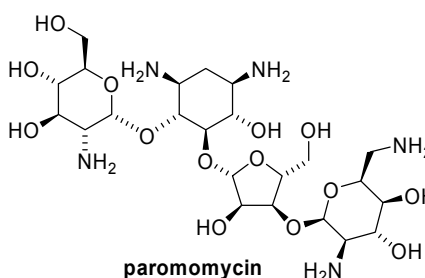
D-streptamin



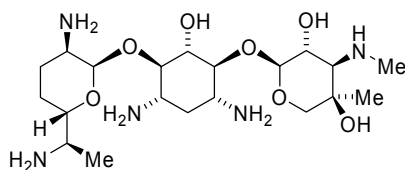
streptomycin A



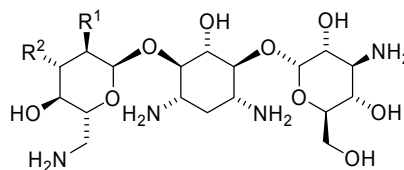
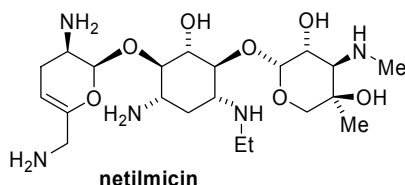
neomycin



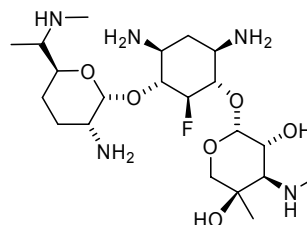
paromomycin



gentamicin

kanamycin R¹ = OH, R² = OH
tobramycin R¹ = NH₂, R² = OH

netilmicin



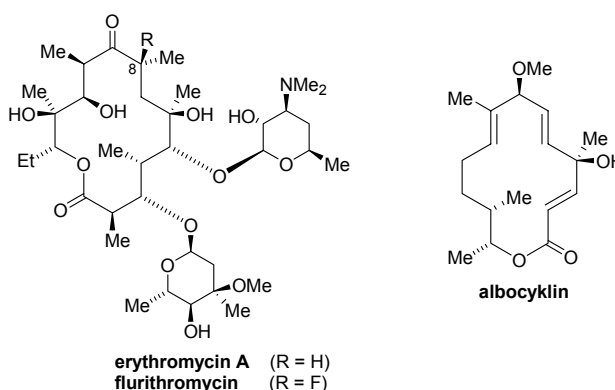
"5-deoxy-5-fluor-gentamicin C1"

rodů *Klebsiella* sp., *Proteus*, *Serratia* a zejména *Pseudomonas aeruginosa*. Účinkuje však též proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus* sp. Kanamycin (kanamycin A, Kanacin, Resistomycin-Bayer) je produkován *Streptomyces kanamyceticus* a *S. takahuraensis*. Samotný kanamycin je z terapeutického hlediska bez významu, neboť je poměrně toxický. Z přírodních kanamycinů, kterých bylo dosud z různých zdrojů izolováno a identifikováno asi 30, se používá tobramycin (tobramycetin, Nebcin) ze *S. tenebrarius* sp. nov. a *Streptoalloteichus hindustanus*. Netilmicin (Netromycin) má podobné spektrum účinků jako předchozí aminoglykosidy. Získává se fermentačně z 1-*N*-ethyl- α -deoxy-D-streptaminu účinkem *Micromonospora inyoensis*²⁴.

4. Makrolidy

Makrolidy představují početnou skupinu antibiotik, Laatsch⁸ uvádí na 350 přírodních makrolidů, jejichž základním skeletem je makrocyclický lakton. Počet atomů v makrocyclickém bývá nejčastěji 14 (např. erythromyciny), 15 nebo 16 (např. bafilomyciny). Existují ale i makrolidy s podstatně vyšším počtem atomů v laktonovém cyklu. Makrolidy inhibují syntézu proteinů reverzibilní vazbou na 50 S podjednotky ribosomů citlivých mikroorganismů.

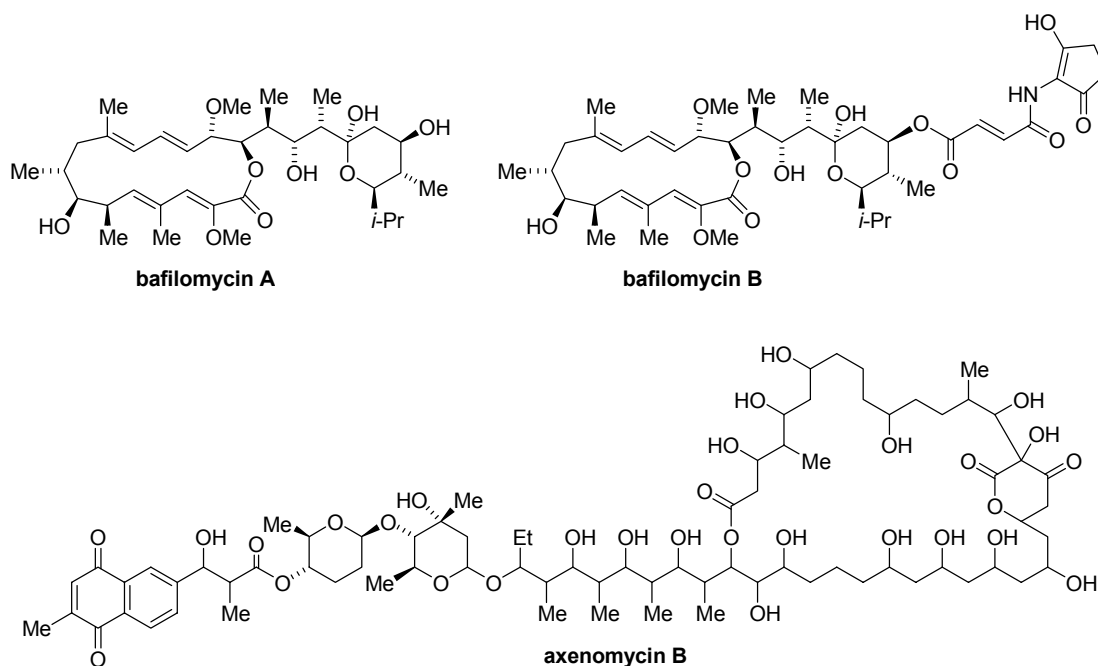
K nejznámějším makrolidům patří skupina erythromycinů, které mají podobné spektrum účinků jako peniciliny; často se proto používají u pacientů, kteří trpí alergií na penicilin. Léčí se jimi infekce dýchacích cest včetně infekcí způsobených atypickými mikroorganismy, jako jsou *Mycoplasma* sp. či *Legionella* sp. Používají se rovněž v terapii syfilis, kapavky (gonorrhoea) a lymeské boreliózy.

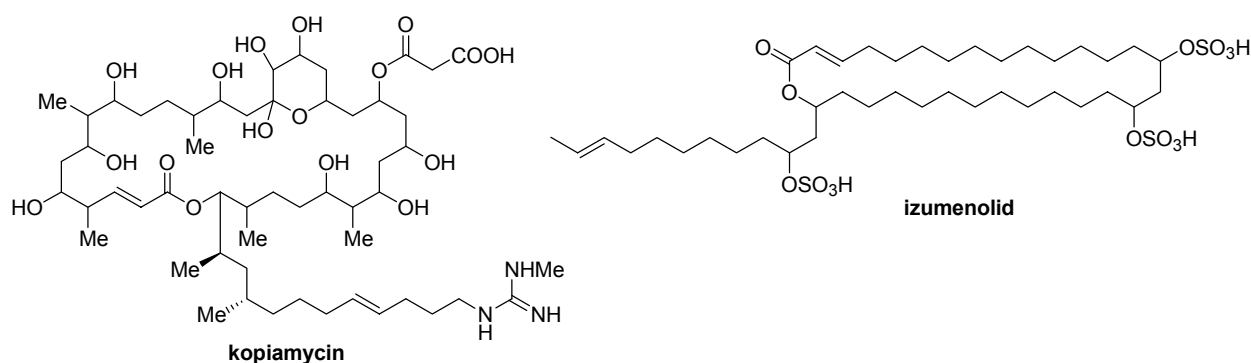


zy. Erythromycin (erythromycin A, Erythrocin) a flurithromycin byly izolovány ze *Streptomyces erythraeus*. Relativně jednoduchý makrolid albocyclin (Ingramycin), který ve své molekule nemá vázány žádné sacharidové jednotky, se nachází ve *Streptomyces bruneogriseus*, *S. roseocinereus* a *S. roseochromogenes*. Je aktivní nejenom proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a dalším mikroorganismům, ale působí i insekticidně²⁵.

Streptomyces griseus a jeho odrůdy jsou zdrojem bafilomycinů, kterých bylo dosud z přírodních zdrojů izolováno a identifikováno více než 10. Všechny bafilomyciny jsou inhibitory vakuolární H^+ -ATPasy (tzv. protonové pumpy). Typickým zástupcem je bafilomycin A1 s účinky antibakteriálními, antifungálními, antineoplastickými a imunosupresivními. Bafilomycin B (setamycin) je zmiňován jako látka s potenciálními antiosteoporotickými účinky.

Axenomycin B, makrolakton ze *Streptomyces lisan-dri*, působí proti *Candida albicans* a *Saccharomyces cere-*





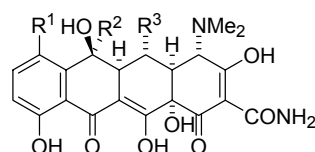
*visiae*²⁶ a překvapivě má i anthelmintické vlastnosti.

Streptomyces hygroscopicus var. *crystallogenes*, *S. violaceoniger* Tue 905 produkují kopiamyciny, makrolaktony s kruhem o 31 atomech. Kopiamycin (nifitricin) vykazuje antifungální aktivitu. Dále účinkuje proti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* a dalším mikroorganismům. Zajímavou strukturu má izumenolid z *Micromonospora chalcone* subsp. *izumensis* SC 11133 (ATCC 31395), který je účinný proti *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* a *Pseudomonas aeruginosa*. Díky ionizovatelným sulfátovým skupinám vhodně orientovaným na nepolárním makrocyklu se izumenolid chová jako bolaamfifil²⁷, a ovlivňuje tak vlastnosti buněčné membrány patogenu.

Podle definice uvedené na začátku tohoto oddílu lze formálně za makrolidy považovat i některá polyenová antibiotika, z nichž nejznámější je amfotericin B produkovaný *Streptomyces nodosus*. Jako řada dalších polyenů má antifungální účinky; používá se při léčení systémových infekcí způsobených patogenními houbami a kvasinkami. Předpokládá se, že polyeny tvoří komplexy s membránovými steroly za vzniku transmembránových kanálů způsobujících únik K^+ iontů z buňky patogenu. Dalším příkladem polyenu je makrocyclický keton HA-1-92 nalezený v *Streptomyces* CDRIL-312; v tomto případě se však již nejedná o makrolid.

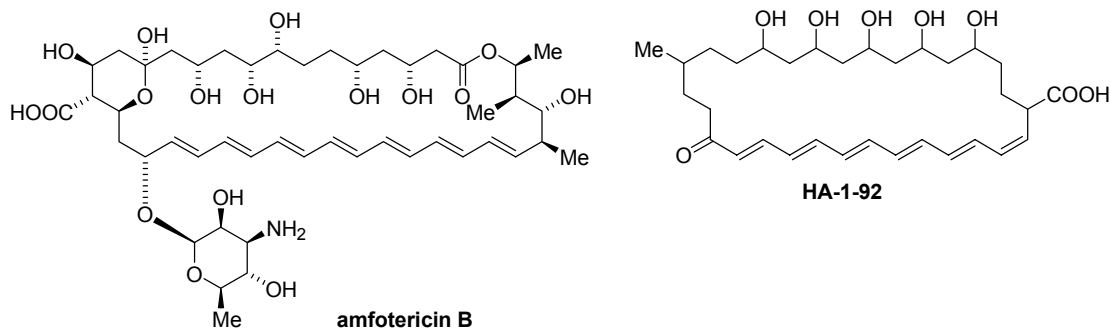
5. Tetracykliny

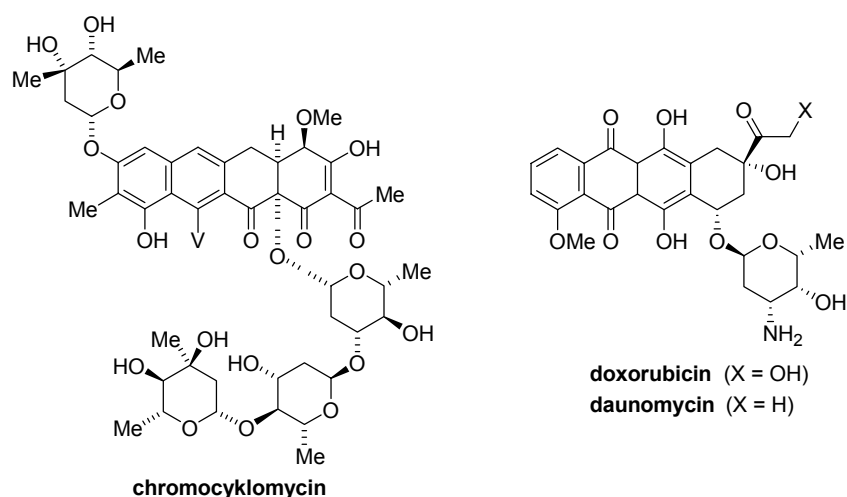
Tetracykliny jsou deriváty naftacenu. Jsou to antibio-



R ¹	R ²	R ³	Název
Cl	Me	H	chlortetracyklin
Cl	H	H	demeclocyklin
H	Me	OH	oxytetracyklin
H	Me	H	tetracyklin

tika se širokým spektrem účinku, zahrnujícím i infekce chlamydiemi, mykoplazmaty a riketsiemi. Tetracykliny, podobně jako mnohé z výše zmíněných typů antibiotik, inhibují syntézu mukopeptidas vazbou na ribosomální podjednotky 30S, a tím způsobují zeslabování vnitřních vrstev buněčné stěny bakterie. Bohužel tetracykliny vykazují i řadu závažných vedlejších účinků. Jejich podávání v období růstu, a to i v prenatalním stadiu, může způsobit deformace kostí a trvalé zbarvení zubů. Jejich absorpci významně snižuje současné podání antacid a mléčných výrobků. Prvním objeveným antibiotikem z této skupiny byl chlortetracyklin (Aureomycin) izolovaný ze *Streptomyces aureofaciens*. Je aktivní proti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a dalším. Podobné spektrum účinků mají i další tetracykliny, jako např. demeclocylin (demethylchlortetracyklin, Demebronc, Declomycin) ze *S. aureofaciens* či *S. viridofaciens*, oxytetracyklin (hydroxytetracyklin, Terramycin) ze *S. rimosus* či doxycylin (Vibramycin) ze *S. rimosus* cr 1244/u.v.



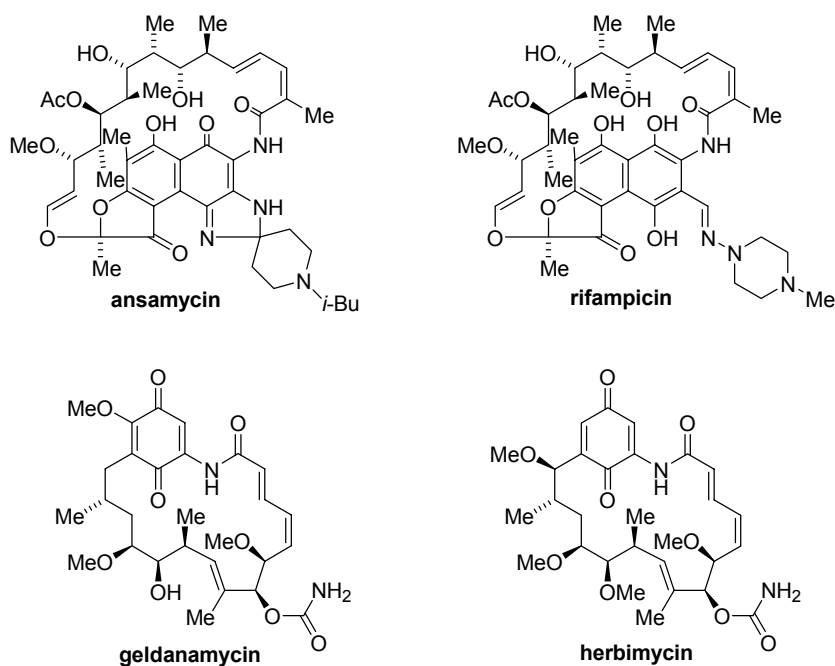


(FERM-p 2581). Velmi populární je tetracyklin (Achromycin) izolovaný ze *S. alboflavus*, *S. viridifaciens*, *S. aureofaciens* a *S. fuscofaciens*.

Aby to nebylo s touto strukturou tetracyklinů tak jednoduché, jak se píše v učebnicích, existují tetracykliny i složitější, konjugované, jako např. chromocyklomycin z kultur *Streptomyces*, (*S. argillaceus*) používaný jako cytostatikum. Ke skupině tetracyklinů se často řadí i anthracyklinová antibiotika, izolovaná ze *Streptomyces peucetius*. Anthracykliny se používají při léčení různých nádorových onemocnění. Významnými zástupci jsou např. doxorubicin a daunomycin (daunorubicin). U tetracyklinových cytostatik se předpokládá, že podstatou jejich účinku je jejich interkalace do DNA.

6. Ansamycyny

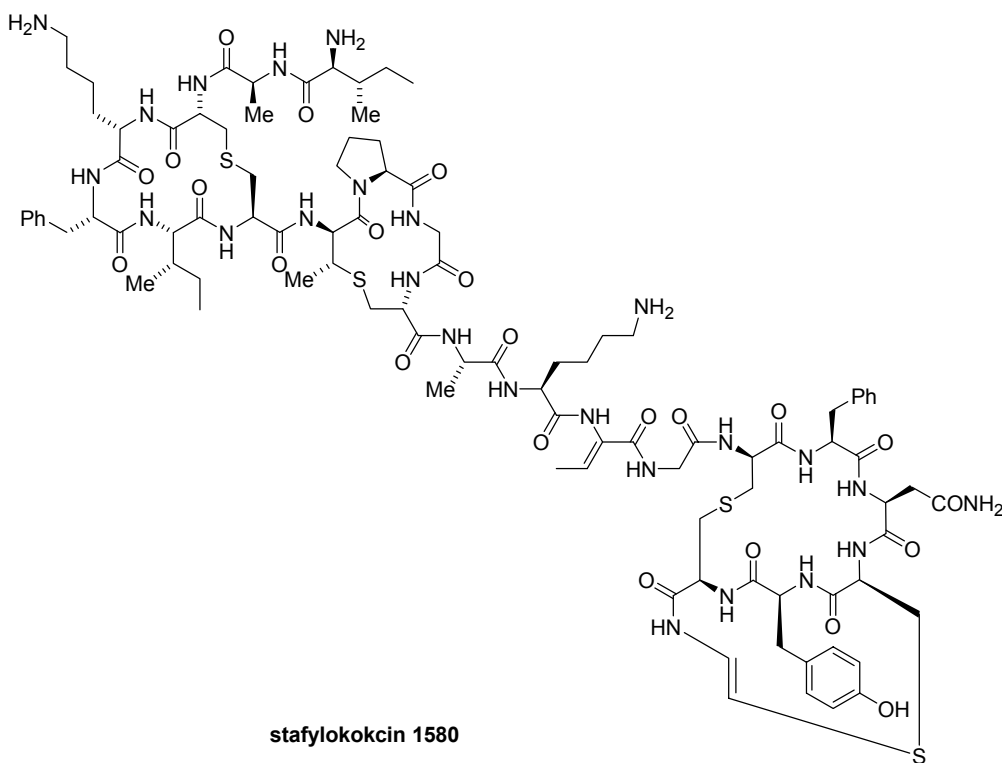
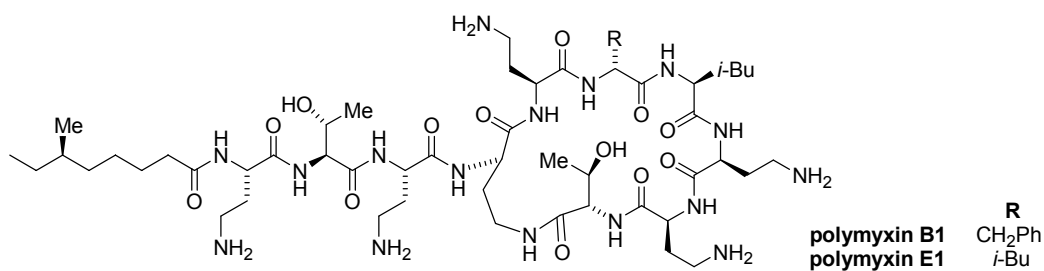
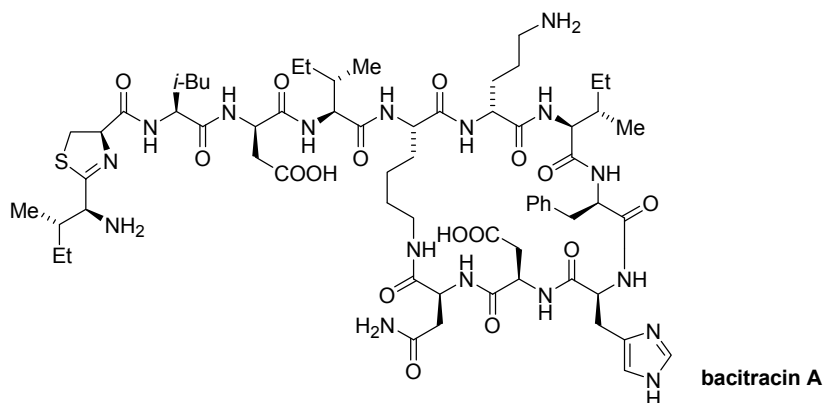
Ansamyciny je skupina antibiotik objevená v *Amycolaptopsis mediterranei*. Kromě ansamycinu sem patří známější rifampicin (rifampin, Rifadin, Rimactane), který je jedním z léčiv první linie proti TBC. Rifampicin se váže k β podjednotce DNA-dependentní RNA polymerasy, a tak inhibuje transkripci genetické informace do RNA a následně i syntézu proteinů u gram pozitivních bakterií a mykobakterií. Zajímavé je, že způsobuje červenooranžovou barvu potu, slz a moči. Geldanamycin a herbimycin, dvě ze šesti antibiotik vyskytujících se ve *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus* a *S. hygroscopicus* subsp. *duarumyceticus*, se testují jako potenciální protinádorová léčiva.



7. Polypeptidy

K antibiotikům patří i některé nízkomolekulární oligopeptidy a proteiny. V jejich strukturách často nacházíme neobvyklé aminokyseliny, jak co se týče konstituce, tak i konfigurace (aminokyseliny řady D); součástí molekul těchto antibiotik bývají i strukturní jednotky, které nejsou

aminokyselinami. Většinou jde o tzv. neribosomální peptidy, což jsou sekundární metabolity peptidů. Nevznikají tedy přímo proteosyntézou probíhající v ribosomech za účasti *m*-RNA. Díky atypickým strukturám bývají peptidová antibiotika poměrně rezistentní vůči účinkům proteolytických enzymů. Všechny níže uvedené polypeptidy ovlivňují různými mechanismy bakteriální cytoplasmatickou



membránu. Používají se především topicky (zevně) a z vnitřních aplikací se uvádí zejména terapie infekcí močového měchýře.

Ze skupiny asi 20 bacitracinů uvádíme bacitracin A z *Bacillus subtilis* a *B. licheniformis*, který má výraznou aktivitu proti *Staphylococcus aureus*. Jeho zinečnatá sůl je součástí známého přípravku Framykoin. Další významnou skupinou polypeptidových antibiotik jsou kolistiny a polymyxiny; oba názvy se často používají jako synonyma. Jako příklad uvádíme polymyxin B1 a polymyxin E1 (colistin A, Colimycin) z *Bacillus polymyxa* ex *Plautia stali*, *B. colistinus* či *B. polymyxa* subsp. *Colistinus*; látka má široké spektrum použití, mj. proti *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus vulgaris*. Stafylokokcin 1580 (Epidermin), vyskytující se v *Staphylococcus epidermidis* je aktivní proti grampozitivním bakteriím a *Micrococcus luteus*.

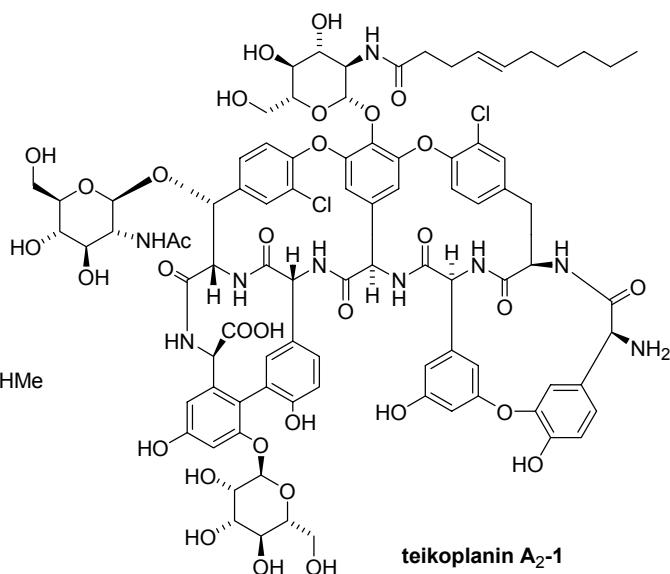
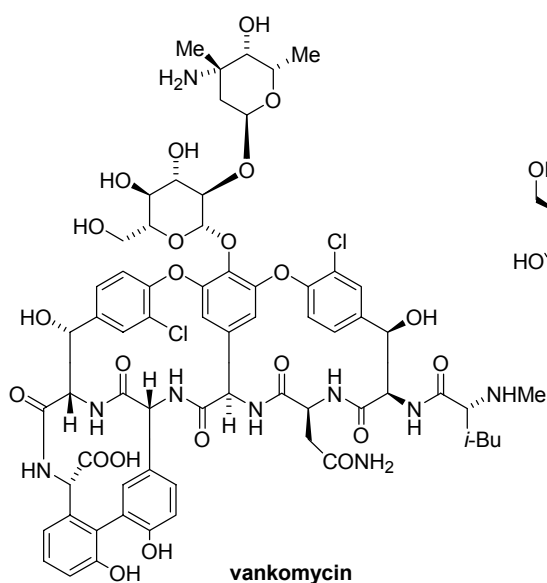
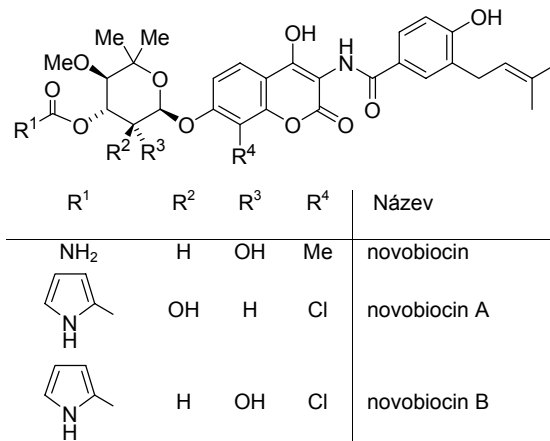
8. Glykopeptidy

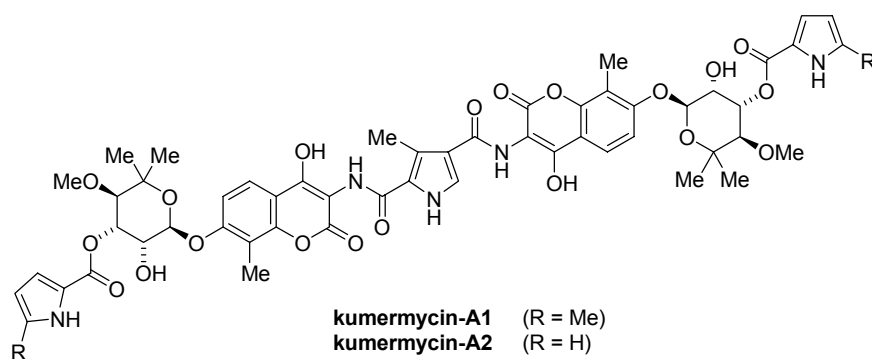
Glykopeptidy lze charakterizovat jako antibiotika, která ve své struktuře obsahují glykosylované neribosomální peptidy (viz předchozí oddíl). Nejznámějším a nejdéle používaným glykopeptidem je vankomycin (Vancocin), jeden ze skupiny 7 přírodních derivátů z kultur *Amycolatopsis orientalis*. Vankomyciny jsou v současnosti vytlačovány teikoplaniny, někdy označovanými i jako teichomyciny, z *Actinoplanes teichomyceticus*. Je známo zhruba 15 teikoplaninů lišících se strukturou lipofilního acylu vázaného k dusíku D-glukosaminu; jako příklad zde uvádíme teikoplanin A₂-1 (Targocid). Glykopeptidová antibiotika inhibují tvorbu bakteriální buněčné stěny inhibicí syntézy peptidoglykanů. Glykopeptidy jsou poměrně toxické, a proto se používají jako „drugs of the last resort“ při potlačování závažných a život ohrožujících infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi včetně

MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecalis* apod.

9. Glykosidy

Tato skupina se najisto překrývá s některými individui ostatních skupin, leč čtenáře jistě nepřekvapí fakt, že rozdělení přírodních látek do skupin podle citění organického chemika není vždy snadné. Z antibiotik, v jejichž molekule se nachází glykosidová vazba, uvádíme na prvním místě tzv. aminokumariny. Tato antibiotika – podobně jako fluorované chinolony²³ – účinkují jako inhibitory DNA gyrazy (topoisomerasy II). Novobiocin (Albamycin, Albacycline) izolovaný ze *Streptomyces niveus* je účinným agens proti stafylokokovým infekcím, a to dokonce i v případech MRSA; v současnosti se používá pouze ve veterinární medicíně. Novobiocin A (2562A, 2562-I, chlorobiocin) a novobiocin B (2562-II, 2562-B), jeho diastereomer s opačnou konfigurací na C-4 L-noviosy, oba izolo-

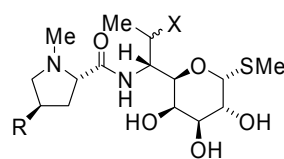




vané ze *Streptomyces griseovariabilis* 2562, mají podobné spektrum účinků jako novobiocin. Kumermycin-A1 (Notomycin, Coumamycin) a kumermycin-A2, jakési „zdvojené novobiciny“, produkty *Streptomyces rishirensis*, *S. spinicoumurensis*, *S. spinichromogenes*, *Streptovorticillium* sp. a *S. sugordomyceticus*, jsou účinné proti *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* a dokonce i proti mykobakteriím. K jejich výhodám patří relativně nízká toxicita a možnost perorálního podání.

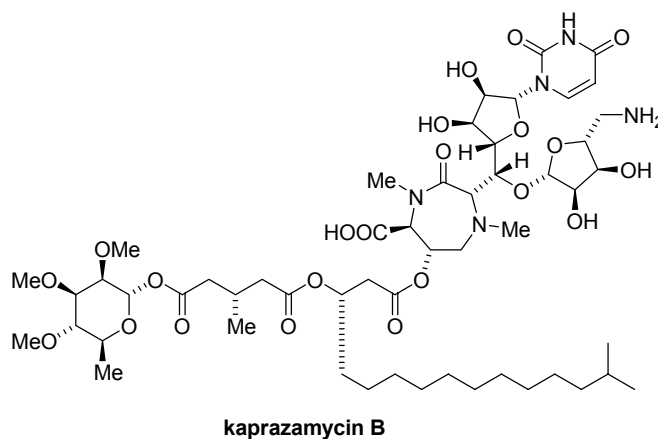
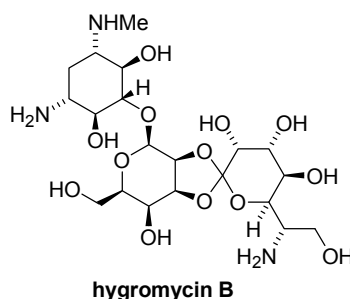
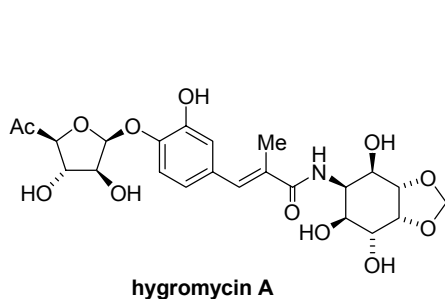
Hygromycin-A (KA 3093) ze *Streptomyces noboritoensis* a-3093 (FERM-p 5285) a hygromycin B ze *Streptomyces hygroscopicus* vykazují antibakteriální, antifungální a anthelmintickou aktivitu. Předpokládá se, že u zmíněných parazitů inhibují proteosyntézu.

Struktura kaprazamycinu B je zajímavá tím, že můstek spojující obě polární části, L-fukosu a 5'-glykosylovaný uridin, nese nepolární alifatický řetězec. Je pro-



dukován kulturami *Streptomyces* a účinkuje proti *Mycobacterium tuberculosis*.

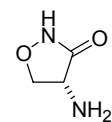
Methylthioglykosidy linkomycin A (lincomycin, Lincomycin) a linkomycin B (U-21699, 4'-ethylincomycin) ze *Streptomyces lincolnensis* se liší pouze substitucí na pyrrolidinovém jádru. Působí proti většině gram pozitivních mikroorganismů a rovněž proti aktinomycetám a některým prvokům rodu *Plasmodium* sp. Vzhledem k jejich poměrně



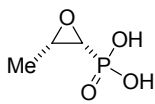
vysoké toxicitě a vedlejším účinkům se používají pouze u pacientů alergických na penicilin a v případě léčby infekcí bakteriemi rezistentními vůči běžnějším antibiotikům. Linkomyciny a od nich odvozený klindamycin jsou někdy řazeny samostatně mezi tzv. linkosamidy.

10. Jiná antibiotika

Cykloserin (D-Cykloserin, Orientomycin) ze *Streptomyces garyphalus* či *S. orchidaceus* a fosfomycin (fosfonomycin) produkovaný různými kmeny *Streptomyces sp.* jsou důkazem, že antibiotika mohou mít i velice jednoduchou strukturu. Obě látky inhibují syntézu peptidoglykanu mureinu, a tím oslabují buněčnou stěnu bakterií. Třebaže spektrum účinků cykloserinu je poměrně široké, je díky své antimykobakteriální aktivitě využíván především k léčbě TBC. Fosfomycin se často používá k léčbě infekcí močových cest. Vzhledem k tomu, že se vůči němu snadno vytváří rezistence, používá se obvykle v jediné dávce.

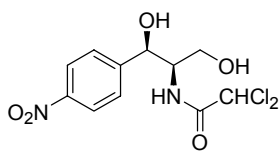


cykloserin

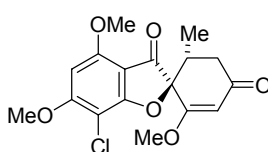


fosfomycin

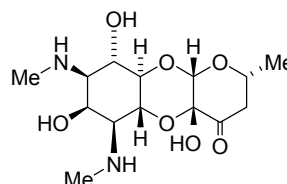
Chloramfenikol (Chloromycetin) původně izolovaný ze *Streptomyces venezuelae* byl prvním synteticky vyrobeným antibiotikem. Po řadu let se používal jako levné a přitom vysoce účinné širokospektrální antibiotikum proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, spirochetám a riketsiím. Chloramfenikol blokuje proteosyntézu inhibicí peptidyl-transferasy v bakteriálních ribosomech. Pro řadu jeho vedlejších účinků, jako je např. aplastická anémie



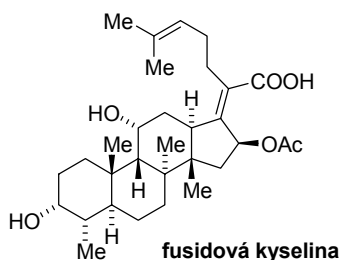
chloramfenikol



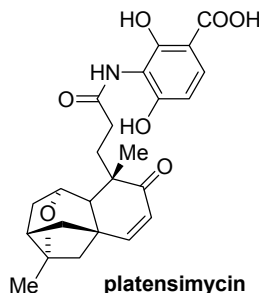
griseofulvin



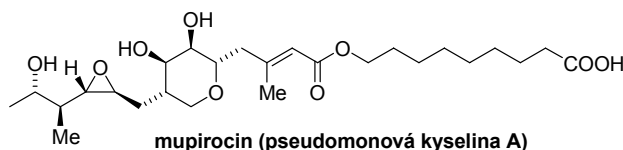
spektinomycin



fusidová kyselina



platensimycin



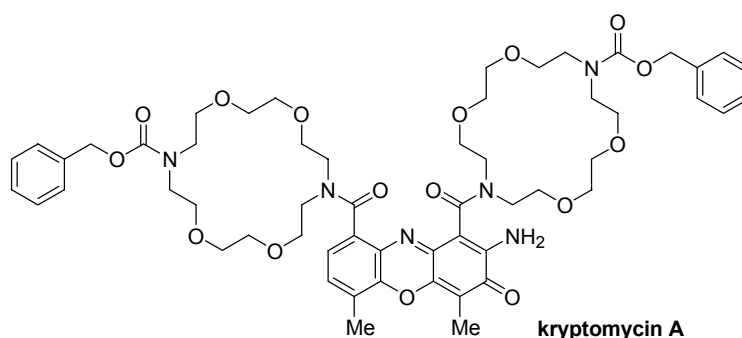
mupirocin (pseudomonová kyselina A)

a poškozování kostní dřeně, se však s výjimkou zemí třetího světa již v současnosti prakticky neužívá. Je rezervován pouze pro velmi závažné případy infekcí, kdy jiná, méně toxická antibiotika, neúčinkují. Chloramfenikol je někdy řazen do samostatné skupiny amfenikolů.

Griseofulvin z *Penicillium griseofulvum* je významné antifungální léčivo. Inhibuje mitózu ovlivněním funkce mikrotubulů během tohoto procesu. Tento mechanismus účinku vybízí rovněž k testování možnosti jeho využití při léčbě rakoviny. Spektinomycin (Actinospectacin, Trobicin) ze *Streptomyces spectabilis* inhibuje syntézu bakteriálních proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30 S. Používá se k léčbě kapavky u pacientů alergických na penicilin.

Mupirocin (pseudomonová kyselina, Bactroban) je směsí několika strukturně příbuzných nonanových kyselin z *Pseudomonas fluorescens*, mezi nimiž převažuje pseudomonová kyselina A (cca 90 %). Všechny pseudomonové kyseliny inhibují proteosyntézu u patogenů. Mupirocin se používá topicky proti grampozitivním bakteriím; je účinný i proti *Staphylococcus aureus* rezistentnímu proti methicilinu (MRSA).

Fusidová kyselina (Fusidic acid, Fusidinic acid, Fusidin) je jedním ze zhruba 15 steroidních antibiotik z *Fusidium coccineum*, *Calcarisporium antibioticum*, *Isaria kogana* či *Mucor ramannianus*. Tyto látky inhibují syntézu bakteriálních proteinů. Fusidová kyselina se používá především topicky. Ačkoliv je účinná pouze proti grampozitivním bakteriím (např. typu *Staphylococcus*); je významná její aktivita proti MRSA.



Platensimycin s bezesporu zajímavou strukturou základního hydridu, izolovaný teprve nedávno ze *Streptomyces platensis*, je dosud ve stadiu preklinických studií. Ukazuje se, že je účinný proti grampozitivním bakteriím včetně MRSA.

Perličkou na závěr je kryptomycin A izolovaný ze *Streptomyces rutgersensis*. Kryptomycin A má fungicidní účinky, působí např. proti *Candida albicans*. Lze jen obdivovat, že takový nádherný bis(azacrown) je vytvořen přírodou.

11. Závěr

Zavedení antibiotik do terapie bakteriálních infekcí lze považovat za jeden z největších úspěchů medicíny ve 20. století, který způsobil, že úmrtnost na infekční onemocnění poklesla ze 797 případů v roce 1900 na 36 v roce 1980 (vztaženo na 100 tis. onemocnění). Ovšem počáteční nadšené a často neuvážené podávání antibiotik způsobilo v delším časovém horizontu vzestup četnosti výskytu rezistentních bakteriálních kmenů. Bitva proti patogenním bakteriím tak nikdy neskončí. V současné době je výzkum směřován právě na hledání nových struktur antibiotik na straně jedné a porozumění molekulárnímu mechanismu rezistence na straně druhé. To je ale jiná povídka.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumných záměrů č. MSM6046137305 a MSM6046137301 a grantu NAZV ČR č. 71284/2007.

LITERATURA

- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2006).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
- Řeháková Z., Karlíčková J., Jahodář L.: Chem. Listy 102, 116 (2008).
- Skokanová M., Dercová K.: Chem. Listy 102, 262 (2008).
- Zaoral M.: Chem. Listy 102, 40 (2008).
- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 895 (2007).
- Laatsch H.: *Antibase 2007: The Natural Product Identifier*. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Turner W. B., Aldridge D. C.: *Fungal Metabolites*. Academic Press, London 1997.
- Thomson R. H.: *Naturally Occurring Quinones*, Vol. I. Butterworth, London 1957; Vol. II: Academic Press, London 1971; Vol. III: Springer, Heidelberg 1987; Vol. IV, Springer, Heidelberg 1996.
- ACD/Dictionary, součást ACD/ChemSketch, ver. 11. Advanced Chemistry Development, Toronto 2007.
- Bycroft B. W. (ed.): *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*. CRC Press Inc., London 1987.
- Chem. Rev. 105, (2) 391 (2005).
- Von Freudenreich E., Jensen O.: Centralblatt Bakteriolog. Parasit. Infekt., 2 Abteilung 3, 545 (1897).
- Jordan E. O.: J. Exp. Med. 4, 627 (1899).
- Hejzlar M., Hylmar B., Teplý M., v knize: *Antibiotika*, str. 15. SNTL, Praha 1980.
- Lincová D., Farghali H. (ed.), v knize: *Základní a aplikovaná farmakologie*, str. 429. Galén, Karolinum, Praha 2005.
- Rabišková M., Häring A., Minczingerová K., Havlásek M., Musilová P.: Chem. Listy 101, 70 (2007).
- Zajoncová L., Šebela M.: Chem. Listy 101, 36 (2007).
- Doležal M., Opletalová V., Kešetovičová D.: Chem. Listy 101, 936 (2007).
- Parker P. M.: *The 2007-2012 World Outlook for Synthetic Organic Antibiotics Excluding Preparations*. ICON Group International, Inc., San Diego 2006.
- Katzung B. G. (ed.): *Basic & Clinical Pharmacology, section VIII. Chemotherapeutic Drugs*. McGraw-Hill, New York 2004.
- Hampl F., Rádl S., Paleček J.: *Farmakochemie*, 2. vyd., kap. 16. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha 2007.
- Kleemann A., Engel J.: *Pharmaceutical Substances, Syntheses, Patents, Applications*. 4. vyd. Thieme, Stuttgart 2001.
- Oh S. R., Lee H. K., Choi S. K., Kim J. I. L.: Han'guk Nonghwa Hakhoechi 37, 234 (1994); Chem. Abstr. 122, 314576 (1995).
- Arcamone F., Barbieri W., Franceschi G., Penco S., Vigevari A.: J. Am. Chem. Soc. 95, 2008 (1973).
- Fuhrhop J. H., Fritsch D.: Acc. Chem. Res. 19, 130 (1986).

**F. Hampl^a, J. Moravcová^b, J. Čopíková^c,
L. Opletal^d, O. Lapčík^b, and P. Drašar^b** (^a*Department of
Organic Chemistry, ^bDepartment of Chemistry of Natural
Compounds, ^cDepartment of Carbohydrate Chemistry and
Technology, Institute of Chemical Technology, Prague;
^dDepartment of Pharmaceutical Botany and Ecology,
Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec
Králové*): **Beauty and Diversity of Natural Antibiotics**

The aim of the brief survey of natural antibiotics is to show the importance of this group of renewable materials. The examples of these secondary metabolites which are frequently utilized in human and veterinary medicine demonstrate their structural diversity.

SOUČASNÝ POHLED NA KOENZYM Q

HANA RAUCHOVÁ a MARTINA VOKURKOVÁ

Fyziologický ústav Akademie věd ČR, v.v.i. a Centrum výzkumu chorob srdce a cév, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
rauchova@biomed.cas.cz, martina@biomed.cas.cz

Došlo 5.6.08, přijato 17.7.08.

Klíčová slova: koenzym Q, mitochondrie, bioenergetika, antioxidant, prooxidant, potravinový doplněk

Obsah

1. Úvod
2. Funkce CoQ v mitochondriích
 - 2.1. Součást dýchacího řetězce
 - 2.2. Aktivátor rozpahujícího proteinu
 - 2.3. Regulátor pórů přechodné permeability
3. Další funkce CoQ v buňce
 - 3.1. Součást redoxních řetězců v plasmatické membráně a lysosomech
 - 3.2. Regulátor fyzikálně-chemických vlastností membrán
 - 3.3. Antioxidační působení CoQ
 - 3.4. Prooxidační působení CoQ
4. Výskyt a biosyntéza CoQ
 - 4.1. Příjem CoQ běžnou dietou
 - 4.2. Vstřebávání CoQ organismem
5. Klinické využití CoQ
 - 5.1. Vývoj a syntéza nových forem přípravků CoQ
 - 5.2. Vývoj nového přípravku, MitoQ
 - 5.3. Klinické studie
 - 5.4. Toxicita a vedlejší účinky podání CoQ
 - 5.5. Možné interakce CoQ s léky
6. Závěr

1. Úvod

Spolu s nezdravým způsobem života v rozvinutých zemích světa stoupá počet vitaminových přípravků i potravinových doplňků, které jsou nám doporučovány ke konzumaci, abychom si pojistili krásu, štíhlou linii či pevné zdraví, a potravinářským a farmaceutickým firmám zajistili jejich dostatečnou produkci s náležitým finančním obrátem. Jedním z takovýchto módních potravinových doplňků se stal koenzym Q (CoQ), známý též jako ubiquinon (obr. 1). Jeho užívání je nabízeno jako energetický prostředek nepostradatelný pro odstranění únavy, urychlení rekonvalescence či zlepšení výkonu při fyzické zátěži. Je též

doporučován kardiakům a pacientům s vysokým krevním tlakem i jako látka, která pomáhá při léčbě paradentózy nebo může přispět k odstranění neplodnosti mužů. Další oblastí uplatnění se stala kosmetika, kde je přidáván do krémů jako osvědčený prostředek na odstranění vrásek. Následující stručný přehled je věnován převážně novým informacím, které se objevily v oblasti základního i aplikovaného výzkumu CoQ, a uvádí některé z recentních studií o jeho využití v lékařství.

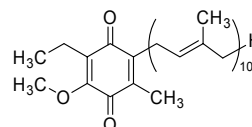
CoQ, lipofilní benzochinon (u člověka a většiny savců s 10 isoprenylovými podjednotkami v postranním řetězci), je známý od konce 50. let, kdy byl izolován z mitochondrií hovězího srdce a identifikován jako součást dýchacího řetězce¹. S tím souvisí jeho nejdéle známá funkce elektronového přenašeče spojená se syntézou vysokoenergetického substrátu adenosin-5'-trifosfátu (ATP) v dýchacím řetězci². Zjistilo se však, že vnitřní mitochondriální membrána není jediným místem, kde se CoQ nachází. Byl rovněž objeven v ostatních membránách buňky (vnější mitochondriální membráně, Golgiho aparátu, mikrosomech, lysosomech, jádře, plasmatické membráně) i v buněčné cytoplasmě³. S tím je spojeno postupné odhalování jeho dalších buněčných funkcí a předpokládá se, že v blízké budoucnosti budou identifikovány i funkce nové⁴. V mitochondriích zastává CoQ následující funkce:

- je redoxním přenašečem elektronů v dýchacím řetězci²,
- tvoří nezbytný faktor pro aktivaci rozpahujícího proteinu⁵,
- reguluje póry přechodné permeability⁶.

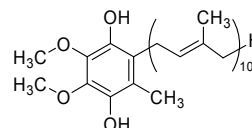
CoQ dále

- se účastní elektronového přenosu v extramitochondriálních redoxních řetězcích v plasmatické membráně a lysosomech^{7,8},
- reguluje fyzikálně-chemické vlastnosti buněčných membrán^{9,10},

a



b



Obr. 1. Strukturní vzorec a) oxidovaného (ubichinonu) a b) redukováného (ubichinolu) koenzymu Q₁₀

- představuje jediný lipofilní antioxidant, který si organismus umí sám syntetizovat¹¹,
- působí rovněž jako prooxidant¹².

2. Funkce CoQ v mitochondriích

2.1. Součást dýchacího řetězce

CoQ tvoří jedinou neproteinovou součást dýchacího řetězce umístěného na vnitřní mitochondriální membráně a je ve stechiometrickém nadbytku k dalším jeho komponentám¹³. Dýchací řetězec se skládá ze čtyř hlavních multiproteinových komplexů, které jsou označovány jako komplex I (NADH-CoQ reduktasa), komplex II (sukcinát-CoQ reduktasa), komplex III (CoQH₂-cytochrom *c* reduktasa) a komplex IV (cytochrom *c* oxidasa). Tyto čtyři komplexy jsou doplněny ATP syntasou (komplex V), reverzibilní protonovou pumpou, která využívá elektrochemický protonový gradient na syntézu ATP. Přesné uspořádání jednotlivých komplexů není dosud definitivně potvrzeno a o jejich fungování (model supermolekulární organizace komponent vs. model náhodné difuze) se vedou neustálé diskuze^{14,15}. Současné poznatky založené převážně na elektroforéze nativních proteinů směřují k hypotéze modelu supermolekulární organizace jednotlivých komponent dýchacího řetězce (respirasomů), protože hlavní enzymové komponenty u mitochondrií (i bakterií) tvoří agregáty, které jsou často poměrně stabilní (např. k působení ultrazvuku)¹⁶. Podobné superkomplexy byly také nalezeny u vyšších rostlin, hub a kvasinek^{17–19}. Druhý popsáný model náhodné difuze založený převážně na kinetických studiích tvrdí, že komplexy jsou náhodně distribuovány v lipidové dvojvrstvě membrány a fungují díky laterální difuzi malých redoxních molekul, CoQ a cytochromu *c* (cit.²⁰). Nelze však vyloučit, že v závislosti na fyziologických podmínkách může elektronový transport v dýchacím řetězci probíhat oběma způsoby: buď formou respirasomů nebo náhodnou difuzí²¹.

Z literatury je zřejmé, že existují velké rozdíly mezi obsahem cytochromů, CoQ a pyridinových nukleotidů v různých organismech i v různých orgánech u stejného druhu². Sledovali jsme obsah a distribuci CoQ v játrech a kosterním svalu krysy a zjistili jsme, že více než 60 % extrahovaného CoQ je v mitochondriální frakci kosterního svalu (3,67 nmol mg⁻¹ proteinu), zatímco u jater bylo v mitochondriální frakci pouze 30 % (1,70 nmol mg⁻¹ proteinu). Nález je ve shodě s relativně vysokým aerobním metabolismem kosterního svalu (a tedy vysokým počtem mitochondrií) ve srovnání s jaterní tkání²².

Vnitřní mitochondriální membrána rovněž obsahuje v menším množství některé další proteiny, např. glycerol-3-fosfát dehydrogenasu (mGPDH), cholin dehydrogenasu, elektrony přenášející flavoprotein dehydrogenasu, dihydroorotát dehydrogenasu či u rostlin a hub alternativní NADH dehydrogenasy². V našich pokusech jsme se věnovali mGPDH, flavoprotein-dependentnímu hydrofobnímu transmembránovému enzymu, který má katalytické centrum na

vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány. Tento enzym tvoří sice jednu z nejjednodušších větví dýchacího řetězce, ale stále zůstává málo probádanou oblastí. Zajímavostí je, že množství tohoto enzymu se liší v různých tkáních a nejvyšší aktivity dosahuje v mitochondriích létacího svalu hmyzu a hnědé tukové tkáně novorozenců, hibernantů nebo chladově adaptovaných zvířat. Po jednorázovém i dlouhodobém podání hormonů štítné žlázy je aktivita enzymu výrazně zvýšena v játrech^{23,24}. Zjistili jsme, že mGPDH reaguje přímo s poolem CoQ²⁵. Přítomnost homogenního poolu CoQ mezi mGPDH a komplexem III potvrdily sigmoidní tvary inhibičních křivek enzymu v přítomnosti inhibitorů komplexu III (antimycinu A a myxothiazolu). V dalších studiích jsme zjistili, že aktivita mGPDH je specificky zvýšena po přidání homologu s krátkým postranním řetězcem, CoQ₃ či analogu idebenonu^{25,26}. Zdá se, že tato aktivace úzce souvisí s odstraněním inhibičního vlivu volných mastných kyselin na tento enzym, což může být způsobeno obsazením CoQ-redukčního místa na mGPDH²⁷. Domníváme se, že by se mohlo jednat o regulaci mGPDH mastnými kyselinami v těsné spolupráci s CoQ.

2.2. Aktivátor rozpřahujícího proteinu

Podobné fungování (spolu s CoQ, mastnými kyselinami a nukleotidy) bylo již popsáno pro funkci rozpřahujícího proteinu v mitochondriích hnědé tukové tkáně⁵. Rozpřahující protein (UCP1), který představuje asi 10 % z proteinů vnitřní mitochondriální membrány hnědé tukové tkáně, řídí energetickou účinnost syntézy ATP, a tím i tvorbu tepla novorozenců, hibernantů a chladově adaptovaných živočichů. Echta a spol.²⁸ popsali obdobný regulační mechanismus i pro další dva rozpřahující proteiny (UCP2 a UCP3), které se nalézají v dalších tkáních a které nejsou specializovány na tvorbu tepla. Přesná fyziologická funkce těchto rozpřahujících proteinů není dosud definovaná, ale uvažuje se např. o regulaci metabolismu mastných kyselin, sekrece inzulinu nebo produkce volných radikálových sloučenin²⁹.

2.3. Regulátor pórů přechodné permeability

Pro energetickou produkci i metabolickou regulaci jsou esenciální mitochondriální póry přechodné permeability, což jsou multiproteinové komplexy, které ovlivňují průchodnost mitochondriální membrány. Významná je jejich úloha ve vztahu k buněčné smrti. Otevření pórů (např. po akumulaci vápníku nebo kyslíkových radikálů) umožní bobtnání mitochondrií, prasknutí vnější membrány, přerušení tvorby ATP a uvolnění cytochromu *c*. Faktory a mechanismy, které ovlivňují mitochondriální póry přechodné permeability, nejsou stále zcela jasné. Některé exogenně dodané analogy CoQ modulovaly otevření a zavření pórů³⁰. Na základě pokusů (*in vitro* i *in vivo*) s buňkami oční rohovky byla zjištěna antiapoptotická aktivita CoQ³¹.

3. Další funkce CoQ v buňce

3.1. Součást redoxních řetězců v plasmatické membráně a lysosomech

Kromě dýchacího řetězce vnitřní mitochondriální membrány tvoří CoQ součást elektronového transportního systému v buněčné plasmatické membráně⁷. Četné studie potvrdily podíl elektronového transportního systému plasmatické membrány v celé řadě životně důležitých funkcí jako je např. udržování CoQ v redukovaném stavu, kontrola buněčného růstu, diferenciace a apoptózy^{4,32}. Gille a Nohl⁸ popsali účast CoQ v redoxním řetězci lysosomů, kde usnadňuje přenos protonů přes lysosomální membránu a zajišťuje tím nízké hodnoty pH uvnitř těchto organel pro optimální funkci hydrolytických enzymů nutných pro likvidaci nepotřebných proteinů.

3.2. Regulátor fyzikálně-chemických vlastností membrán

Předmětem diskuse stále zůstává lokalizace molekuly CoQ v biologických membránách. Fluorescenční studie ukázaly, že isoprenylový řetězec je zanořen do vnitřní hydrofobní části lipidové dvojvrstvy, zatímco chinonové jádro je ve vnitřní či vnější polárnější části membrány^{10,33}. Díky této lokalizaci může CoQ regulovat fluiditu (tekutost) a propustnost membrán⁴. Tím je zajišťováno optimální prostředí pro funkci membránově vázaných receptorů, přenašečů a enzymů. Také umístění redukováných molekul CoQ v různých typech liposomů potvrdilo změny fyzikálně-chemických vlastností membránové dvojvrstvy¹⁰. Hauss a spol.³⁴ v pokusech prováděných na neutronovém difraktometru naopak navrhli umístění struktury CoQ uprostřed (paralelně s povrchem) lipidové dvojvrstvy membrány a pohyb jeho molekuly omezili pouze na velmi malé oscilace mezi acylové řetězce membránových fosfolipidů. Mezi těmito dvěma krajními polohami můžeme najít ještě další modely s různým stupněm zanoření molekuly CoQ do lipidové dvojvrstvy³⁵.

3.3. Antioxidační působení

CoQ se může vyskytovat ve třech hlavních redoxních formách: jako plně oxidovaný (CoQ, ubichinon), částečně redukovaný (CoQH[•], semichinon) a plně redukovaný (CoQH₂, ubichinol). Existují však ještě další tři formy CoQ (CoQH⁻, CoQ²⁻, CoQ⁻), které vznikají během redukce oxidovaného CoQ³⁶. Plně redukovaný CoQ je velmi účinný antioxidant. Reprezentuje jediný lipofilní antioxidant, který si organismus sám syntetizuje a který může působit buď přímo anebo nepřímo regenerováním dalších antioxidantů: lipofilního tokoferolu (vitaminu E) i hydrofilního askorbátu (vitaminu C). CoQ udržuje v redukovaném stavu tokoferol, který ve svém redukovaném stavu představuje hlavní ochranné činidlo proti peroxidaci nenasycených mastných kyselin membránových fosfolipidů. Výrazná účinnost antioxidačního působení

CoQ je odvozena od schopnosti CoQ zasáhnout do lipoperoxidační kaskády jak na jejím začátku, tak i během šíření procesu lipidové peroxidace³⁷. Antioxidační úloha CoQ je připisována např. zlepšená funkce poškozeného endotelu v periferní cirkulaci u pacientů s cukrovkou 2. typu³⁸.

3.4. Prooxidační působení

CoQ má však díky svým oxidoredukčním vlastnostem rovněž důležitou úlohu jako prooxidant při regulaci tvorby superoxidového anionu a H₂O₂³⁹. Plynulá tvorba těchto molekul má nezastupitelné místo v udržování normální buněčné funkce⁴⁰. Superoxidový anion a H₂O₂ vytváří systém druhého posla v regulaci buněčného metabolismu. Svým působením fyziologicky přispívají k regulaci systémů buněčné bioenergetiky, ke kontrole exprese a transkripce genů, k modulaci přeměny bílkovin, ke zprostředkování hormonální i signální odpovědi na faktory stimulující buněčný růst. Linnane a spol.⁴¹ se domnívají, že nesprávná antioxidační léčba může být dokonce škodlivá, protože poruší křehkou rovnováhu v regulaci vnitřního prostředí. V těchto souvislostech se Linnane a spol.³⁹ snaží objasnit popisovaný vliv CoQ na různé imunitní odpovědi (např. zvýšenou aktivitu fagocytů nebo zvýšené titry protilátek)^{42,43}. Možné vysvětlení je právě ve vztahu CoQ a H₂O₂. Podle jejich představy H₂O₂ hraje roli druhého posla při růstu buněk imunitního systému jako odpověď na působení hormonů a cytokinů, které jsou odpovědné za regulaci buněčné aktivity a růstu.

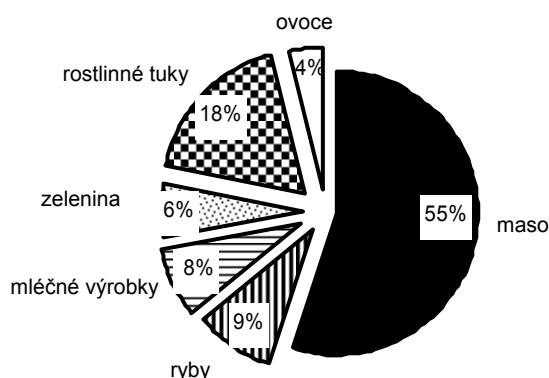
4. Výskyt a biosyntéza CoQ

Výskyt a syntéza CoQ byly postupně potvrzeny téměř ve všech rostlinných i živočišných buňkách⁴⁴. Biosyntéza CoQ *de novo* je složitý komplexní proces, který vyžaduje nejméně 10 genů⁴⁵. Mnoho cenných poznatků bylo získáno ze studií na mutantních kmech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*⁴. Velmi zjednodušeně lze říci, že syntéza chinonového jádra vychází z aromatických aminokyselin tyrozinu (nebo fenylalaninu) a syntéza isoprenoidního řetězce vede z acetyl-koenzymu A mevalonátovou drahou přes meziprodukt farnesylpyrofosfát, který je společným prekurzorem pro CoQ, cholesterol, dolichol a isoprenylované proteiny. Konečnou část syntézy představuje kondenzace chinonového jádra a isoprenylového řetězce. V organismu je poločas rozpadu CoQ zhruba 50–125 hodin a produkty rozpadu (fosforylované deriváty s krátkým řetězcem) se vylučují močí⁴⁶.

U člověka v prvních třech dekadách života množství CoQ stoupá ve všech orgánech. Jak bylo popsáno u lidí i pokusných zvířat, hladiny CoQ se snižují s věkem⁴⁷. Hlavní formou v plasmě zdravých lidí je redukovaný CoQ⁴⁸.

4.1. Příjem CoQ běžnou dietou

Určitou část CoQ lze též získat dietou. V literatuře bylo publikováno několik studií, které se zabývaly při-

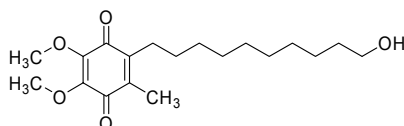


Obr. 2. Dietní příjem koenzymu Q_{10} u finské populace (upraveno podle Mattila a Kumpulainen⁵⁰)

jmem CoQ potravou. Je evidentní, že nejvíce CoQ obsahuje maso a ryby. Určité množství bylo zjištěno i v rostlinných olejích⁴⁹. Mléčné výrobky, ovoce a zelenina mají jen malé množství CoQ. Obr. 2 ukazuje průměrný příjem derivátu CoQ_{10} z různých druhů potravin u finské populace⁵⁰. Příklad derivátu CoQ_9 byl řádově nižší a byl převážně získán z cereálií. Studie se velmi dobře shodují ve stanovení denního příjmu CoQ, ačkoli potravinové zvyklosti se jistě mohou významně lišit v různých zemích. Dánští autoři uvádí rozmezí denního příjmu CoQ_{10} 3–5 mg (cit.⁵¹), Finové 3,8 (ženy) až 5,4 (muži) mg (cit.⁵⁰) a japonští badatelé 4,5 mg (cit.⁵²).

4.2. Vstřebávání přijatého CoQ organismem

Potravou přijatý CoQ se do organismu dostává ze zažívacího traktu podobným způsobem jako vitamin E nebo jiné v tucích rozpustné látky⁵³. V tenkém střevě napomáhají jeho vstřebání žluč a trávicí enzymy pankreatu. Vstřebávání CoQ ze střeva je velmi malé, je odhadováno pouze na 2–4 % (cit.⁵⁴). Obdobně jako další lipofilní látky je CoQ nejdříve inkorporován do chylomikronů (velké lipoproteinové částice), které přenášejí vstřebažené tuky ze střeva dále do cirkulace. V krvi je převážně navázán na lipoproteiny s nízkou hustotou nebo s velmi nízkou hustotou (částice LDL a VLDL). Po perorálním podání se zvýší hladina CoQ v krvi asi za 1–2 hodiny a maxima dosahuje za 6–8 hodin⁵⁵.



Obr. 3. Strukturální vzorec idebenonu

5. Klinické využití

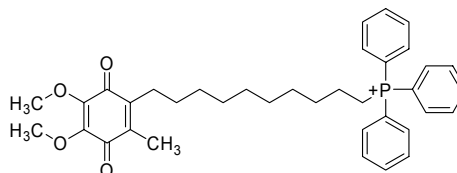
Podle klinických a experimentálních studií podávání CoQ (případně jeho syntetického derivátu idebenonu, obr. 3) vedlo v mnohých případech ke zlepšení zdravotního stavu postižených jedinců^{56,57}. Průkopníky klinických studií s CoQ se stali japonští vědci, kteří provedli své první studie již v 60. letech minulého století. Po dalším čtvrt století byl uveden mezi léčebné preparáty i syntetický derivát CoQ, idebenon, s nižší hydrofobicitou ve srovnání s přirozeným CoQ⁵⁸. Ačkoli podání CoQ či idebenonu může být prospěšné v celé řadě patologických procesů, objevila se i řada důkazů, že analogy CoQ nemohou zcela nahradit přirozený CoQ, protože se při reakcích s různými dehydrogenasami dýchacího řetězce chovají odlišně^{26,59,60}.

5.1. Vývoj a příprava nových forem přípravků CoQ

Sortiment nabízených forem přípravků CoQ se neustále rozšiřuje. Cílem je co nejvíce zvýšit jeho absorpci. Protože CoQ (mol. hmot. 863) je rozpustný v tucích, většina komerčních preparátů obsahuje lipidový přídatek. Na trhu se stále objevují nové léčivé formy (např. šumivá, s prodlouženým uvolňováním, rychle rozpustná, želatinové tobolky, žvýkačky) s různým stupněm absorpce v organismu⁶¹. O další zlepšení absorpce se v současnosti pokoušejí i preparáty s biodegradovatelnými nanočásticemi (založenými na kopolymeru kyseliny mléčné), které jsou naplněné CoQ⁶². Obecně platí, že účinnost absorpce klesá s tím, jak se zvyšuje podaná dávka⁶¹. Rovněž preparáty obsahující oba isomery molekuly CoQ (*cis* a *trans*) mohou výrazně ovlivnit míru dostupnosti pro organismus, protože pouze *trans* forma je přirozená a organismem využitelná⁶³. Fermentační výroba, která zajišťuje výrobu *trans* formy, se postupně stala více rozšířená než chemická, kterou se získá směs *cis* a *trans* isomerů. Biotechnologická příprava CoQ využívá řady mikroorganismů, např. *Agrobacterium*, *Rhodobacter* a *Paracoccus* a stále se optimalizuje^{64,65}.

5.2. Vývoj nového přípravku MitoQ

V současnosti se farmaceutický průmysl intenzivně věnuje vývoji nového přípravku, MitoQ (obr. 4), což je vlastně molekula redukovaného CoQ kovalentně vázaná na lipofilní kation trifenylyl-fosfonan⁶⁶. Struktura MitoQ je schopná selektivně se zabudovat na matrixovou stranu vnitřní mitochondriální membrány tak, že kation trifenylyl-



Obr. 4. Strukturální vzorec nově vyvíjeného preparátu MitoQ

fosfonanu zůstává na povrchu a molekula CoQ se zanořuje do membrány. Velmi rychlá akumulace do mitochondrií je řízena mitochondriálním membránovým potenciálem. Cílem terapie těmito preparáty je výrazně zvýšit fyziologickou antioxidační kapacitu u širokého spektra chorob s oxidačním stresem⁶⁷.

5.3. Klinické studie

Snížené hladiny CoQ v organismu byly zjištěny během stárnutí i při mnoha patologických stavech. Změněné hladiny CoQ byly popsány u různých kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění, u nemocných s cukrovkou či rakovinou⁶⁸.

Primární nedostatek CoQ způsobuje různé defekty v syntéze ATP a také různý stupeň oxidačního stresu, což vysvětluje velmi různorodý klinický obraz postižení⁶⁹. V některých dobře dokumentovaných případech pacientů s existujícím nedostatkem CoQ je jeho dodání jednoznačně velmi účinné^{70,71}.

Významnou část klinického použití CoQ (stovky publikovaných studií) zaujímá velké spektrum chorob srdce a cév (např. různé srdeční poruchy, infarkt myokardu, angina pectoris, stav po chirurgických zásazích na srdci a cévách, vysoký krevní tlak). Nedávno uveřejněné velké průzkumy ukázaly terapeutické možnosti podání CoQ v dané oblasti. Rosenfeldt a spol.⁷² v meta-analýze klinických testů (statistické zpracování většího počtu srovnatelných studií za účelem integrace výsledků a posouzení efektivity terapeutických zásahů) potvrdili, že užití CoQ snížilo systolický i diastolický krevní tlak. Pepe a spol.⁷³ shrnuli současný stav v oblasti kardiovaskulárních nemocí sice jako velmi nadějný, ale pro konečné potvrzení účinků upozorňují na nezbytnost dalších systematických studií.

Mezi rizikové faktory, které přispívají ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění, je řazena také cukrovka 2. typu. Lim a spol.⁷⁴ zjistili, že hladiny CoQ v plasmě asijských pacientů byly přibližně 3× nižší než u zdravých kontrol. Zajímavé zjištění bylo, že převažoval oxidovaný CoQ, zatímco u zdravých jedinců převažuje jeho redukovaná forma. Autoři vysvětlili tyto změny jako reakci organismu na trvalý oxidační stres. Tři měsíce perorálně podávaná dávka (200 mg den⁻¹) doplnila sice chybějící CoQ, ale poměr redukovaného a oxidovaného CoQ se nezměnil. Dodání CoQ však nemělo v této studii žádný vliv na funkci buněčné vrstvy vystýlající vnitřek malých cév (endotelu).

Další velká skupina onemocnění, kde se CoQ uplatňuje jako možný terapeutický prostředek, jsou neurodegenerativní nemoci (desítky publikovaných studií). Galpern a Cudkowicz⁷⁵ shrnuli slibné výsledky s použitím CoQ na zvířecích modelech neurodegenerace (např. amyotrofické laterální sklerózy, Parkinsonově či Huntingtonově nemoci).

Pozitivní účinek podání CoQ u parodontálních onemocnění se spíše najde v reklamních letáčích než v odborné literatuře. Poslední dostupné přehledné články doporučují vedle pečlivé hygieny dutiny ústní velmi obecnou antioxidační či multi-vitaminovou doplňkovou léčbu,

kde se mohou uplatnit i CoQ a vitamin E^{76,77}.

Také výzkum, který se týká rakoviny a případných léčebných účinků CoQ, není zatím dostatečný. V literatuře najdeme popsání zlepšení zdravotního stavu pacientů, ale studií je jen velmi málo, aby se mohl posoudit vliv CoQ při tomto onemocnění.

Ani bádání týkající se možných pozitivních účinků CoQ při léčbě mužské neplodnosti není zatím postačující pro potvrzení léčebného účinku, i když skupina italských odborníků se tomuto tématu věnuje již řadu let⁷⁸. Nicméně i zde jsou třeba další systematické studie, které by potvrdily pozitivní vliv podávaného CoQ⁷⁹.

Na otázku vztahu CoQ a stárnutí se zaměřili Sohal a Foster⁸⁰ v přehledném článku. Tito autoři po podání CoQ sice našli vyšší endogenní CoQ v tkáních i mitochondriích, ale nezaznamenali žádný zřetelný rozdíl v aktivitách antioxidační či prooxidační činnosti organismu ani rozdíl v délce života pokusných myší⁸¹.

Velkou oblast uplatnění pro CoQ nabízí dermatologie a kosmetika. CoQ představuje v kůži první antioxidační obranu proti stárnutí pleti vlivem slunečního záření i agresivním škodlivinám z vnějšího prostředí⁸². V přípravcích je CoQ často použitý v kombinaci s dalšími účinnými látkami (např. antioxidanty, jako jsou vitaminy A, C, E), a tím se zvyšuje ochranný účinek přípravků^{83,84}. I pro dermatologické použití se vyvíjejí nanonosiče pro CoQ⁸⁵.

5.4. Toxicita a vedlejší účinky podání CoQ

CoQ je látka tělu vlastní a přirozená, proto se většinou při jeho aplikaci nevyskytují nepříznivé vedlejší účinky ani při dlouhodobém podání. Zhipeng a spol.⁸⁶ zjistili, v tříměsíční studii, že krysy CoQ velmi dobře tolerovaly dávky až do 3000 mg kg⁻¹ den⁻¹. Studie na pacientech postižených amyotrofickou laterální sklerózou, kteří dostávali 8 měsíců 3000 mg CoQ den⁻¹, neodhalila žádné závažnější vedlejší účinky⁸⁷. Přibližně 1 % jedinců si stěžovalo (nezávisle na podané dávce) na některé z následujících problémů: nechutenství, žaludeční obtíže, pálení žáhy, zvracení, průjem, příznaky chřipky, podrážděnost, nespavost, bolest hlavy, závrať, zvýšená citlivost na světlo, kožní vyrážky či svědění⁸⁸. V současné době doporučená denní dávka dietního doplňku pro dospělého člověka se pohybuje mezi 15–100 mg den⁻¹, což představuje několikanásobně vyšší dávku, než je průměrný denní příjem potravou. Léčebné dávky jsou ovšem vyšší: 100 až 200 mg den⁻¹ u srdečních chorob, řádově vyšší u mitochondriálních poruch a nervových nemocí⁸³.

5.5. Možné interakce s léky

Pokud se týká interakce podání CoQ s jinými léky, jsou patrně tři oblasti, které zasluhují větší pozornost. První skupina zahrnuje studie pacientů s léčbou anthracykliny (adriamycin, rubidomycin), velmi účinnými cytostatiky používanými pro široké spektrum nádorů u dětí i dospělých, které způsobují nežádoucí poškození srdečního svalu. CoQ může tomuto poškození zabránit nebo ho alespoň

zmírnit, aniž by snížil chemoterapeutické vlastnosti anthracyklinů⁸⁹. Protože však ne všechny studie potvrdily zlepšení srdeční činnosti, jsou důležité další výzkumy v této oblasti⁹⁰.

Druhá je skupina pacientů s antikoagulační léčbou warfarinem (derivátem kumarinu), nejběžněji předepisovaným prostředkem k léčbě a prevenci trombózy, který tlumí krevní srážlivost tím, že působí proti vitamínu K (derivátu CoQ, menachinonu). Studie se suplementací CoQ vykázaly značně protikladné výsledky: od žádného ovlivnění, přes sníženou odpověď na warfarin, až po zvýšené riziko krvácení⁹¹. Případným komplikacím zabránil častější stanovení trombinového času, které možné poruchy ve srážlivosti krve včas odhalí.

Třetí skupina problematických interakcí zahrnuje statiny, látky snižující cholesterol, které představují jedny z nejprodávanějších léků na světě⁹². Statiny jsou inhibitory 3-hydroxy 3-metylglutaryl koenzym A (HGM-CoA) reduktasy, klíčového enzymu přeměny HGM-CoA na mevalonát, společný prekurzor v syntéze cholesterolu i CoQ⁹³. Existují proto doporučení na občasné přerušování léčby statiny a dlouhodobou suplementaci CoQ⁹⁴. Některé studie totiž skutečně ukázaly sníženou hladinu CoQ v krevní plasmě po terapeutickém užívání různých typů statinů. Protože CoQ cirkuluje spolu s lipoproteiny a je tudíž závislý na jejich hladině, bylo by třeba provést standardizaci hladin CoQ na hladiny celkových lipidů a cholesterolu. Další studie by měly potvrdit či vyvrátit oprávněnost suplementace CoQ při léčbě statiny.

6. Závěr

Význam CoQ je nejlépe ilustrován vysokým počtem publikovaných studií. I přes velké množství prací v oblasti základního a aplikovaného výzkumu, zůstává hodně otázek kolem jeho působení v organismu neobjasněno. Protože je CoQ nedílnou součástí buňky a zasahuje do mnoha jejích funkcí, těžko lze definovat jeho přesný léčebný účinek. Nejčastěji se uvažuje o jeho funkci v buněčné bioenergetice a antioxidantních vlastnostech. To je dále komplikováno poměrně širokým spektrem stavů a nemocí, kde byly popsány benefiční účinky po jeho podání. Výhodou CoQ jsou však zanedbatelná toxicita a výborná snášenlivost, která dovoluje provádět další studie. Konečné potvrzení léčebných účinků a jasné vymezení aplikací však dále vyžaduje přesnější znalosti a rovněž správně vedené klinické studie.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry AV0Z 50110509 MŠMT.

LITERATURA

- Crane F. L., Hatefi Y., Lester R. L., Widmer C.: *Biochim. Biophys. Acta* 25, 220 (1957).
- Lenaz G., Fato R., Formiggini G., Genova M. L.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S8 (2007).
- Appelkvist E. L., Kalén A., Dallner G., v knize: *Biological and Clinical Aspects of Coenzyme Q* (Folkers K., Littarru G. P., Yamagami Y., ed.), 141–150. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1991.
- Turunen M., Olsson J., Dallner G.: *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171, 2004.
- Echtay K. S., Winkler E., Klingenberg M.: *Nature* 408, 609 (2000).
- Fontaine E., Ichas F., Bernardi P.: *J. Biol. Chem.* 273, 25734 (1998).
- Sun I. L., Sun E. E., Crane F. L., Morre D. J., Lindgren A., Low H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11126 (1992).
- Gille L., Nohl H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 347 (2000).
- Lenaz G., Samori B., Fato R., Battino M., Parenti Castelli G.: *Biochem. Cell. Biol.* 70, 504 (1992).
- Fiorini R., Ragni L., Ambrosi S., Littarru G. P., Gratton E., Hazlett T.: *Photochem. Photobiol.* 84, 209 (2008).
- Genova M. L., Merlo Pich M., Biondi A., Bernacchia A., Falasca A., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G., Lenaz G.: *Exp. Biol. Med.* 228, 506 (2003).
- James A. M., Smith A. J., Murphy M. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 47 (2004).
- Capaldi R. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 694, 291 (1982).
- Lenaz G., Genova M. L.: *Am. J. Physiol.* 292, C1221 (2007).
- Genova M. L., Baracca A., Biondi A., Casalena G., Faccioli M., Falasca A. I., Formiggini G., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G.: *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 740 (2008).
- Schägger H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 154 (2002).
- Eubel H., Heinemeyer J., Sunderhaus S., Braun H. P.: *Plant Physiol. Biochem.* 42, 937 (2004).
- Krause F., Scheckhuber C. Q., Werner A., Rexroth S., Reifschneider N. H., Dencher N. A., Osiewacz H. D.: *J. Biol. Chem.* 279, 26453 (2004).
- Schägger H., Pfeiffer K.: *EMBO J.* 19, 1777 (2000).
- Hackenbrock C. R., Chazotte B., Gupte S. S.: *J. Bioenerg. Biomembranes* 18, 331 (1986).
- Lenaz G.: *FEBS Lett.* 509, 151 (2001).
- Rauchová H., Tsang S. H., Lee C. P., Drahota Z.: *CoQ Res. Biol. Med.* 2, 5 (1994).
- Jolin T.: *Endocrinology* 123, 248 (1988).
- Rauchová H., Zachařová G., Soukup T.: *Horm. Metab. Res.* 36, 286 (2004).
- Rauchová H., Battino M., Fato R., Lenaz G., Drahota Z.: *J. Bioenerg. Biomembranes* 24, 235 (1992).
- Rauchová H., Drahota Z., Bergamini C., Fato R., Lenaz G.: *J. Bioenerg. Biomembranes* 40, 85 (2008).
- Rauchová H., Drahota Z., Rauch P., Fato R., Lenaz G.: *Acta Biochim. Pol.* 50, 405 (2003).
- Echtay K. S., Winkler E., Frischmuth K., Klingenberg M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1416 (2001).
- Echtay K. S.: *Free Radical Biol. Med.* 43, 1351

- (2007).
30. Walter L., Nogueira V., Leverve X., Heitz M. P., Bernardi P., Fontaine E.: *J. Biol. Chem.* 275, 29521 (2000).
 31. Papucci L., Schiavone N., Witort E., Donnini M., Lapucci A., Tampestini A., Formigli L., Zecchi-Orlandini S., Orlandini G., Carella G., Brancato R., Capaccioli S.: *J. Biol. Chem.* 278, 28220 (2003).
 32. Gómez-Díaz G., Barosso M. P., Navas P.: *Protoplasma* 214, 19 (2000).
 33. Fato R., Bertolli E., Parenti Castelli G., Lenaz G.: *FEBS Lett.* 172, 6 (1984).
 34. Hauss T., Dante S., Haines T. H., Dencher N. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1710, 57 (2005).
 35. Afri M., Ehrenberg B., Talmon Y., Schmidt J., Cohen Y., Frimer A. A.: *Chem. Phys. Lipids* 131, 107 (2004).
 36. Kozlov A. V., Nohl H., Gille L.: *Bioorg. Chem.* 26, 334 (1998).
 37. Bentinger M., Brismar K., Dallner G.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S41 (2007).
 38. Watts G. F., Playford D. A., Croft K. D., Ward N. C., Mori T. A., Burke V.: *Diabetologia* 45, 420 (2002).
 39. Linnane A. W., Kios M., Vitetta L.: *Mitochondrion* 7 (Suppl 1), S51 (2007).
 40. Linnane A. W., Eastwood H.: *Ann. NY Acad. Sci.* 1067, 47 (2006).
 41. Linnane A. W., Kios M., Vitetta L.: *Biogerontology* 8, 445 (2007).
 42. Bliznakov E. G., Hunt G., v knize: *The Miracle Nutrient Coenzyme Q₁₀*, 1–240. Bantam Books, Toronto 1986.
 43. Gazdík F., Piják M. R., Borová A., Gazdíková K.: *Čas. Léč. Čes.* 142, 390 (2003).
 44. Battino M., Ferri E., Villa R. F., Gorini A., Huertas J. F. R., Fiorella P. C., Genova M. L., Lenaz G., Marchetti M.: *Membr. Biochem.* 9, 179 (1991).
 45. Tran U. C., Clarke C. F.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S62 (2007).
 46. Bentinger M., Dallner G., Chojnacki T., Swiezewska E.: *Free Radical Biol. Med.* 34, 563 (2003).
 47. Kalén A., Appelkvist E. L., Dallner G.: *Lipids* 24, 579 (1989).
 48. Yamamoto Y., Yamashita S.: *Mol. Aspects Med.* 18, S79 (1997).
 49. Cabrini L., Barzanti V., Cipollone M., Fiorentini D., Grossi G., Tolomelli B., Zambonin L., Landi L.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 6026 (2001).
 50. Mattila P., Kumpulainen J.: *J. Food Compost. Anal.* 14, 409 (2001).
 51. Weber C., Bysted A., Hølmer G.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 67, 123 (1997).
 52. Kubo H., Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S., Kishida H., Hosoe K.: *J. Food Compost. Anal.* 21, 199 (2008).
 53. Bhagavan H. N., Chopra R.K.: *Free Radical Res.* 40, 445 (2006).
 54. Zhang Y., Åberg F., Appelquist E. L., Dallner G., Ernster L.: *J. Nutr.* 125, 446 (1995).
 55. Miles M. V.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S72 (2007).
 56. Geromel V., Darin N., Chrétien D., Béné P., DeLondlay P., Rötig A., Munnich A., Rustin P.: *Mol. Genet. Metab.* 77, 21 (2002).
 57. Rauchová H., Lenaz G.: *Česká Slov. Farm.* 50, 78 (2001).
 58. Zs-Nagy I.: *Arch. Gerontol. Geriatr.* 11, 177 (1990).
 59. Brière J. J., Schlemmer D., Chretien D., Rustin P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 1138 (2004).
 60. Degli Esposti M., Ngo A., Ghelli A., Benelli B., Carelli V., McLennan H., Linnane A. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 395 (1996).
 61. Bhagavan H. N., Chopra R. K.: *Mitochondrion* 7 (Suppl 1), S78 (2007).
 62. Ankola D. D., Viswanad B., Bhardwaj V., Ramarao P., Ravi Kumar M. N. V.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 361 (2007).
 63. Ikematsu H., Nakamura K., Harashima S., Fujii K., Fukutomi N.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44, 212 (2006).
 64. Choi J. H., Ryu Y. W., Seo J. H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 9 (2005).
 65. Cluis C. P., Burja A. M., Martin V. J. J.: *Trends Biotechnol.* 25, 514 (2007).
 66. Murphy M. P., Smith R. A. J.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 629 (2007).
 67. Tauskela J. S.: *IDrugs* 10, 399 (2007).
 68. Dhanasekaran M., Ren J.: *Curr. Neurovasc. Res.* 2, 447 (2005).
 69. Quinzii C. M., López L. C., Von-Moltke J., Naini A., Krishna S., Schuelke M., Salvati L., Navas P., DiMauro S., Hirano M.: *FASEB J.* 22, 1874 (2008).
 70. Quinzii C. M., DiMauro S., Hirano M.: *Neurochem. Res.* 32, 723 (2007).
 71. Rötig A., Mollet J., Rio M., Munnich A.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S112 (2007).
 72. Rosenfeldt F. L., Haas S. J., Krum H., Hadj A., Ng K., Leong J. Y., Watts G. F.: *J. Hum. Hypertens.* 21, 297 (2007).
 73. Pepe S., Marasco S. F., Haas S. J., Sheeran F. L., Krum H., Rosenfeldt F. L.: *Mitochondrion* 7(Suppl 1), S154 (2007).
 74. Lim S. C., Lekshminarayanan R., Goh S. K., Ong Y. Y., Subramaniam T., Sum C. F.: *Atherosclerosis* 196, 966 (2008).
 75. Galpern W. R., Cudkowiec M. E.: *Mitochondrion* 7 (Suppl 1), S146 (2007).
 76. Battino M., Bullon P., Wilson M., Newsman H.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 10, 458 (1999).
 77. Munoz C. A., Kiger R. D., Stephens J. A., Kim J., Wilson A. C.: *Compend. Contin. Educ. Dent.* 22, 425 (2001).
 78. Balercia G., Buldreghini E., Vignini A., Tiano L., Paggi F., Amoroso S., Ricciardo-Lamonica G., Boscaro M., Lenzi A., Littarru G. P.: *Fertil. Steril.* (2008).
 79. Patel S. R., Sigman M.: *Urol. Clin. N. Am.* 35, 319 (2008).
 80. Sohal R. S., Foster M. J.: *Mitochondrion* 7 (Suppl 1),

- S103 (2007).
81. Sohal R. S., Kamzalov S., Sumien N., Ferguson M., Rebrin I., Heinrich K. R., Foster M. J.: *Free Radical Biol. Med.* 40, 480 (2006).
 82. Shapiro S. S., Saliou C.: *Nutrition* 17, 839 (2001).
 83. Fuller B., Smith D., Howerton A., Kern D.: *J. Cosmet. Dermatol.* 5, 30 (2006).
 84. Hojerová J.: *Česká Slov. Farm.* 49, 119 (2000).
 85. Teeranachaideekul V., Souto E. B., Junyaprasert V. B., Müller R. H.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 141 (2007).
 86. Zhipeng W., Mingkai L., Shuyu C., Min J., Jingru M., Xue M., Yumei W., Xiaoxing L.: *J. Toxicol. Sci.* 32, 505 (2007).
 87. Ferrante K. L., Shefner J., Zhang H., Betensky R., O'Brien M., Yu H., Fantasia M., Taft J., Beal M. F., Traynor B., Newhall K., Donofrio P., Caress J., Ashburn C., Freiberg B., O'Neil C., Paladenech C., Walker T., Pestronk A., Abrams B., Florence J., Renna R., Schierbecker J., Malkus B., Cudkowicz M.: *Neurology* 65, 1834 (2005).
 88. Hathcock J. N., Shao A.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 282 (2006).
 89. Conklin K. A.: *Integr. Cancer Ther.* 4, 110 (2005).
 90. Bryant J., Picot J., Levitt G., Sullivan I., Baxter L., Clegg A.: *Health Technol. Assess.* 11, 27 (2007).
 91. Shalansky S., Lynd L., Richardson K., Ingaszewski A., Kerr C.: *Pharmacotherapy* 27, 1237 (2007).
 92. Hájková M., Kratochvíl B., Rádl S.: *Chem. Listy* 102, 3 (2008).
 93. Langsjoen P. H., Langsjoen A. M.: *BioFactors* 18, 101 (2003).
 94. Langsjoen P. H., Langsjoen J. O., Langsjoen A. M., Lucas L. A.: *BioFactors* 25, 147 (2005).

H. Rauchová and M. Vokurková (*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic and Centre for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic*): **Recent View of Coenzyme Q**

Coenzyme Q (CoQ), a lipophilic substituted benzoquinone present in all cells. Besides its fundamental role of an electron carrier associated with energy production in the respiratory chain, CoQ has two other functions in mitochondria. It is an essential factor in activation of protein uncoupling and it controls permeability of transition pores. Moreover, it participates in extramitochondrial electron transport in plasma membranes and lysosomes, controls physicochemical properties of membranes, and is the only endogenous lipid antioxidant. Its pro-oxidant role consists in generating the major superoxide radical/H₂O₂ second-messenger system. Biosynthesis of CoQ proceeds in every cell, small amounts of CoQ can be obtained from diet. CoQ is also available as a dietary supplement. It shows minimal toxicity, excellent tolerance, and no significant side effects. Its beneficial effects are largely attributed to its essential role in cellular bioenergetics and antioxidant properties. Supplementation of CoQ can improve conditions of a wide range of pathological states. Some forms of mitochondrial CoQ deficiency respond well to its oral administration. Recent meta-analysis of tests for hypertension is also promising. This review summarizes the current knowledge of the therapeutic efficacy of CoQ in various diseases.

CHOLESTEROL – PŘÍTEL ČI NEPŘÍTEL?

HANA LUBANDA a MAREK VECKA

Univerzita Karlova v Praze, I. lékařská fakulta, IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, U nemocnice 2, 128 00 Praha 2
hlubanda@seznam.cz

Došlo 7.11.07, přijato 5.11.08.

Klíčová slova: cholesterol, biosyntéza a transport cholesterolu, ateroskleróza, hypercholesterolemie

Obsah

1. Úvod a biomedicínský význam
2. Historické poznámky
3. Biosyntéza cholesterolu
4. Transport cholesterolu v lidském těle
 - 4.1. Absorpce cholesterolu z potravy ve střevě
 - 4.2. Transport cholesterolu v cirkulaci
 - 4.3. Intracelulární pohyb cholesterolu
 - 4.4. Vylučování cholesterolu
5. Regulace na úrovni extracelulárního transportu cholesterolu
6. Regulace intracelulárního obsahu cholesterolu
7. Cholesterol ve zdraví a nemoci
8. Současné možnosti léčby hypercholesterolemie
 - 8.1. Dietní a režimová opatření
 - 8.2. Farmakoterapie
 - 8.3. Extrakorporální aferéza
9. Závěr

1. Úvod a biomedicínský význam

Cholesterol je nejznámější a také jeden z nejdůležitějších sterolů, podskupiny steroidů¹ obsahujících nezaměnitelnou strukturu cyklopentanofenanthrenu a hydroxylskupinu na uhlíku č. 3. Patří k základním strukturním komponentám buněčné membrány a dále představuje m.j. výchozí sloučeninu pro biosyntézu významných signálních molekul – steroidních hormonů, které řídí celou řadu procesů. Steroidní hormony regulují metabolismus minerálů a vody, glukoneogenezi, zajišťují pohlavní diferenciaci, reprodukční funkce a odpověď organismu na stresové reakce. Dále je v lidském těle cholesterol prekurzorem žlučových kyselin, které pomáhají při absorpci živin. 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), meziprodukt biosyntézy cholesterolu, je prekurzorem cholekalciferolu (vitaminu D₃), který se uplatňuje v řízení kalcium-fosfátového metabolismu (viz obr. 1). Nedávno byla objevena důležitá úloha cholesterolu v lidské embryogenezi a byla identifikována

řada dědičných metabolických poruch biosyntézy cholesterolu².

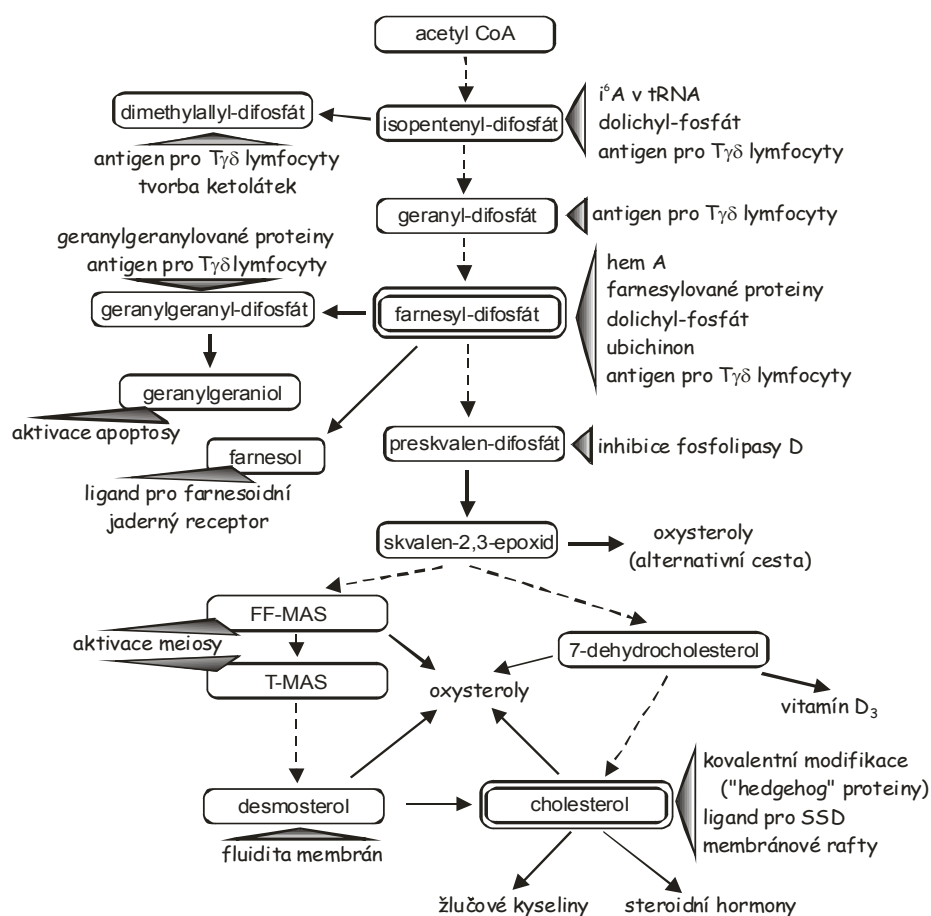
V kontrastu s výše uvedeným však stojí to, že vysoká hladina cholesterolu (hypercholesterolemie), zvláště pak nadbytek LDL frakce, je dnes považován za hlavní příčinu aterosklerózy. Ateroskleróza je onemocnění, které je v rozvinutých zemích vedoucí příčinou úmrtnosti v populaci. Tím si získal cholesterol mimořádnou pozornost nejen lékařů, ale také farmakologického a genetického výzkumu a vešel i do povědomí široké veřejnosti.

2. Historické poznámky

První izolaci látky, kterou bychom dnes nepochybně nazvali cholesterol, můžeme připisat Francouzům Poulletierovi de la Salle (1769) a A. F. de Fourcroy (1789). Oba badatelé popisovali izolovaný produkt jako krystalickou substanci ze žlučových kamenů. Chevreul navrhl pro tuto látku roku 1816 termín „cholesterine“; řecky „chole“ znamená žluč a „stereos“ je pevný. Po zjištění, že cholesterolin obsahuje alkoholovou hydroxyskupinu, navrhl Berthelot (1859) změnu názvu sloučeniny na „cholesterol“³.

Cesta k našemu dnešnímu poznání významu a patofyziologické úlohy cholesterolu v lidském organismu byla dlouhá a sahá ještě hlouběji do historie. Britský chemik a filosof Boyle (vzpomeňme Boylův zákon), zjistil v roce 1665, že po jídle se krev zvířat mléčně zakalí. Až o celé století později si Henson všiml, že z této „mléčné tekutiny“ lze získat tuk (1774, cit.³). V roce 1779 Parry publikoval objev, že příčinou anginy pectoris je obstrukční koronární nemoc. Během 19. století se zájem vědců začal více obracet k ateroskleróze, jejíž etiologie a patologický význam byl nejasný. Termín „arteriosklerosa“ poprvé uvedl v roce 1904 Marchand, aby tak popsal poruchu ve struktuře cévních stěn, která začíná v její vnitřní vrstvě. Dále předpokládal, že je příčinou téměř všech obstrukcí v tepnách. V Petrohradě v roce 1908 popsal Ignatowski možnou souvislost mezi dietou bohatou na cholesterol a experimentální aterosklerózou. O dva roky později prokázal Windaus, že aterosklerotické pláty obsahují šestnásobek volného a dvacetinásobek esterifikovaného cholesterolu oproti normální arteriální stěně. Aničkov v roce 1913 vyvolal cholesterolovou dietou aterosklerózu u králíků. Navíc experimentálně prokázal, že stupeň aterosklerotického postižení byl úměrný množství cholesterolu v dietě.

Druhá polovina minulého století přinesla poznatky o metabolismu cholesterolu na molekulární úrovni. V roce 1950 Gofman a jeho kolegové identifikovali pomocí ultracentrifugace lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein, LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoprotein, HDL). Dále popsali pozitivní korelaci mezi zvýšeným zastoupením LDL částic a infarktem myokardu u mužů a také inverzní vztah mezi HDL a rizikem



Obr. 1. **Metabolický význam biosyntetické dráhy cholesterolu**; FF-MAS – sterol aktivující folikulární meiosis, T-MAS – sterol aktivující testikulární meiosis, SSD – sterol sensing domain (proteinová doména citlivá na steroly), $i^6A - N^6$ -isopentenyladenosin v molekule transferové RNA

koronární aterosklerózy⁴. Framinghamská studie (začala v roce 1948 a pokračuje vlastně dodnes s třetí testovanou generací) prokázala, že riziko rozvoje ischemické choroby srdeční je lineárně závislé na hladině cholesterolu v krvi. V roce 1964 obdrželi Bloch a Lynen Nobelovu cenu za medicínu za práci na poznání metabolismu cholesterolu a mastných kyselin (MK). Za soubor prací o LDL receptoru a objasnění etiopatogeneze familiární hypercholesterolemie získali Brown a Goldstein v roce 1985 další Nobelovu cenu.

3. Biosyntéza cholesterolu

Cholesterol se do organismu dostává buď zvenčí – je vstřebáván ze zažívacího traktu, nebo je syntetizován *de novo* z acetyl-CoA. Tento složitý a náročný řetězec více než 20 chemických reakcí je schopna realizovat každá buňka (s výjimkou bezjaderných erytrocytů). Syntéza cholesterolu probíhá ve všech tkáních, ale nejvíce ho vznikne

v játrech, v distální části tenkého střeva a kůži. První část biosyntézy je naznačena na obr. 2a. V posledním stupni biosyntézy cholesterolu se nejprve vytvoří ze skvalenu lanosterol a to oxygenací s následnou cyklizací. Cholesterol vzniká postupně z lanosterolu po aerobním odbourání tří methylových skupin ve formě CO_2 a postupným přesunem dvojné vazby v kruhu B steroidního skeletu. Možných metabolických drah je zde více (viz obr. 2b). Některé meziprodukty biosyntézy cholesterolu (desmosterol, lathosterol, kyselina mevalonová) jsou v analytické praxi využívány pro stanovení úrovně biosyntézy cholesterolu⁵.

4. Transport cholesterolu v lidském těle

4.1. Absorpce cholesterolu z potravy ve střevě

V tukcích přijímaných potravou se cholesterol vyskytuje jak ve formě volné, tak esterifikované. V trávicím traktu jsou lipidy emulgovány účinkem žlučových kyselin

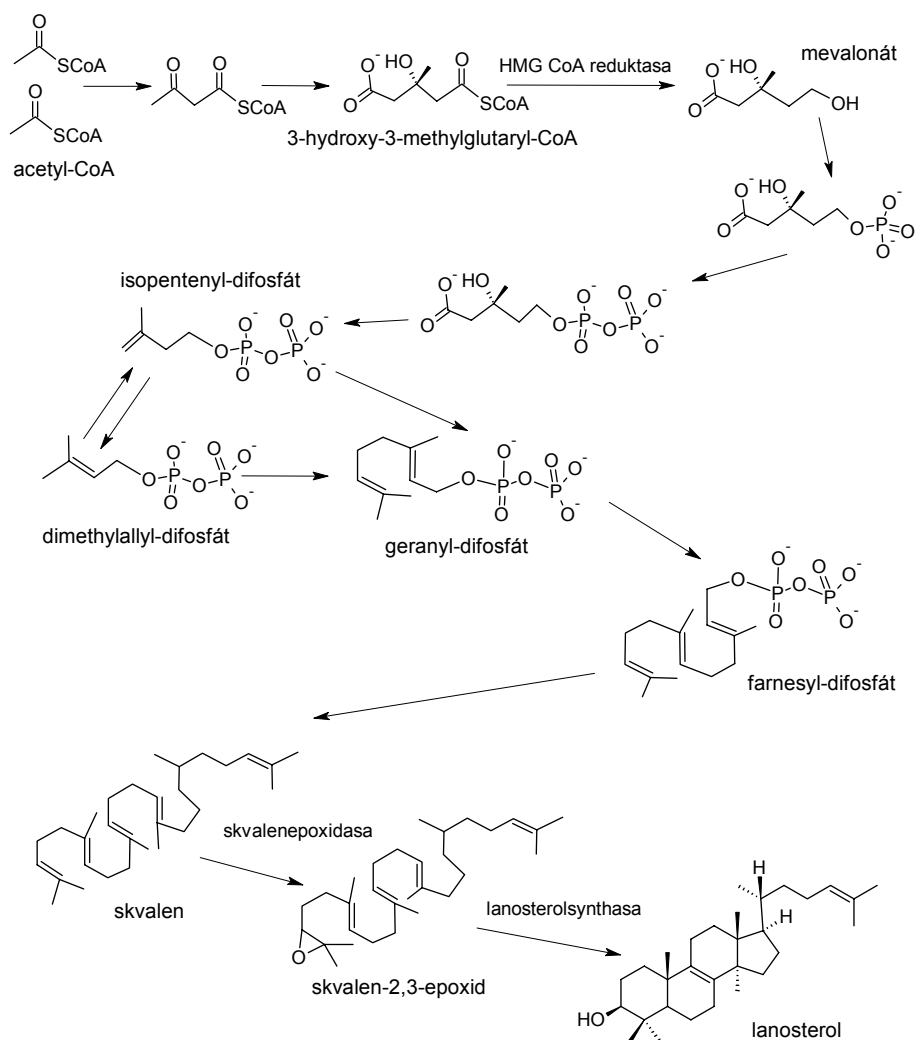
a hydrolyzovány působením lipolytických enzymů pankreatické šťávy. Natrávená směs lipidů spolu se žlučovými kyselinami vytváří ve středním úseku tenkého střeva (jejunu) směsné micely o průměru 3–10 μm . Tyto směsné micely se při styku s kartáčkovým lemem enterocytů postupně rozpadají a jejich součásti se dostávají do bezprostřední blízkosti sliznice střeva (enterocytů). Cholesterol je translokován přes membránu enterocytu receptorovým mechanismem zahrnujícím protein podobný Niemannovu-Pickovu proteinu 1 (NPC1L-1). Žlučové kyseliny jsou později absorbovány v distálnějších úsecích střeva jako součást enterohepatálního oběhu žlučových kyselin.

V enterocyту je cholesterol reesterifikován za katalýzy isoenzymem 2 acyl:cholesterol-*O*-acyltransferasy (ACAT-2), hromadí se spolu s resyntetizovanými triacylglyceroly a fosfolipidy v cisternách endoplasmatického retikula. Asociací s molekulami bílkovin se vytvářejí

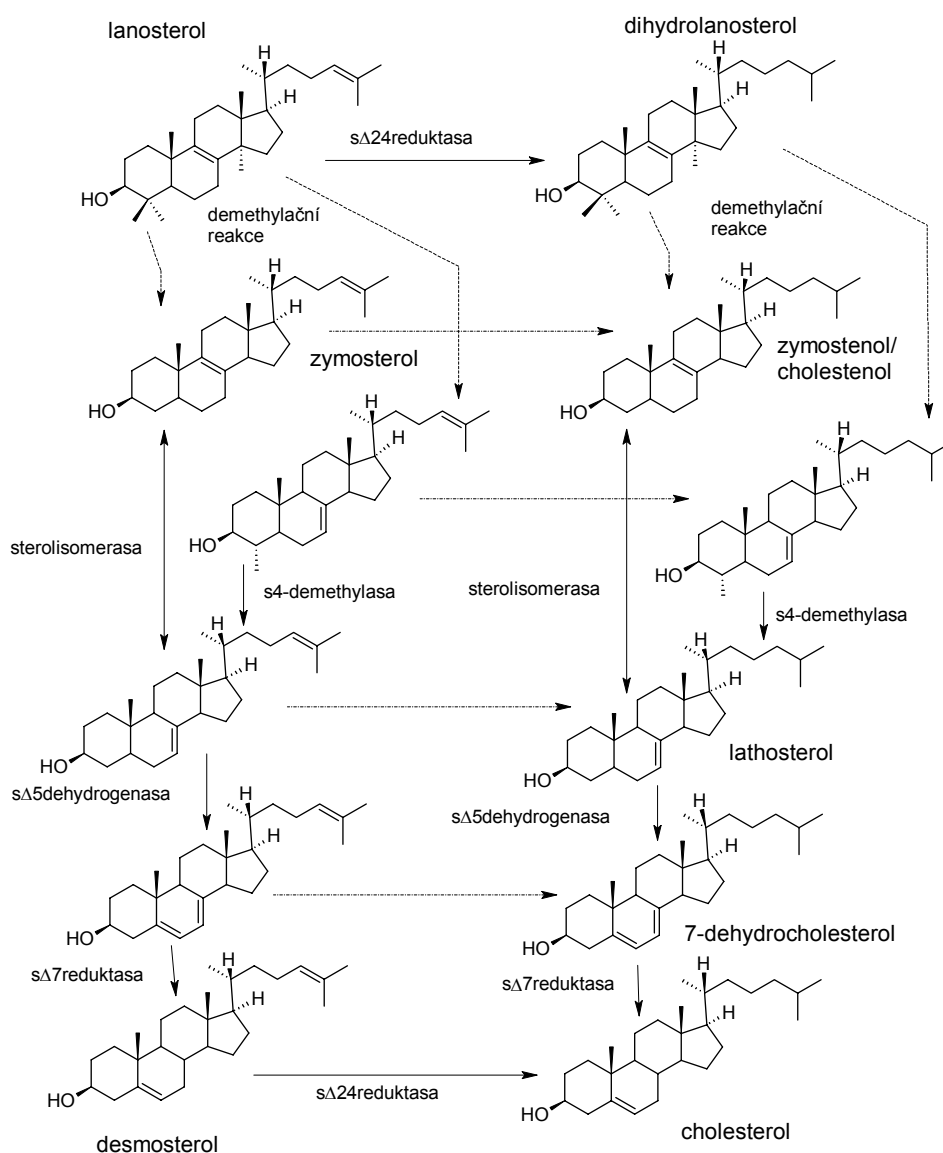
transportní lipoproteinové částice chylomikrony a v nepatrné míře lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL). Chylomikrony a VLDL jsou uvolňovány do lymfy. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících transport cholesterolu ze střeva do krevního oběhu. Zrychlená střevní pasáž, snížená aktivita pankreatických enzymů a složky potravy, jako je vláknina, nenasycené mastné kyseliny a rostlinné steroly⁶, snižují absorbované množství cholesterolu.

4.2. Transport cholesterolu v krevním oběhu

V lidské plasmě je cholesterol transportován ve formě lipoproteinových částic. Každá lipoproteinová částice se skládá z hydrofobního lipidového jádra [triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu], které je obklopeno amfifilním obalem z fosfolipidů, volného cholesterolu a apoproteinů. Lipoproteiny se obvykle rozdělují do několika tříd



Obr. 2a. Biosyntéza lanosterolu z acetyl koenzymu A; HMG – 3-hydroxy-3-methylglutaryl



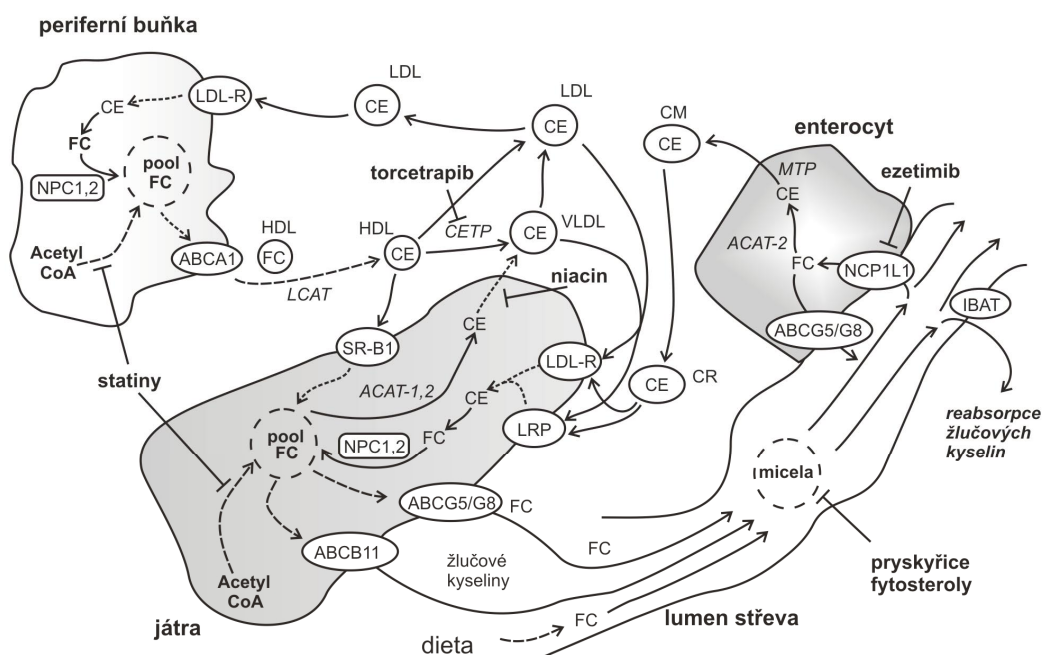
Obr. 2b. **Biosyntéza cholesterolu z lanosterolu**; s – steroidní, Δn poloha dvojné vazby, kde probíhá redukční reakce

podle hustoty. Čím vyšší je podíl lipidů, tím je nižší hustota částice. V krevní plasmě nalézáme následující třídy lipoproteinů:

Chylomikrony mají nejnižší hustotu a jsou syntetizovány ve střevě. Základní funkcí je transportovat TAG do tkání a cholesterol do jater. Přes *ductus thoracicus* se dostávají z lymf do plasmy. Chylomikrony se zachycují na receptorech endotelu kapilár (hlavně ve svalech a tukových tkáních) a z fosfolipidů a TAG jsou odtěpěny mastné kyseliny pomocí lipoproteinové lipasy. Zbytky chylomikronů putují do jater.

Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL) jsou syntetizovány ve střevě a játrech. Resyntetizované TAG v játrech jsou inkorporovány do VLDL a jejich odbourává-

ní je analogické chylomikronům. Lipoproteiny se střední hustotou (IDL) vznikají z VLDL a jsou mezistupněm ke vzniku lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). Ty jsou bohaté na estery cholesterolu a zachycují se na LDL-receptorech v periferních tkáních a játrech. Tím se cholesterol dostává do periferních tkání, kde se při zvýšené dodávce ukládá do aterosomových plátů a LDL jsou proto nazývány aterogenním „zlým“ lipoproteinem. Lipoperoxidací nenasycených mastných kyselin vznikají vysoce proaterogenní oxidované LDL (ox-LDL) s vysokou afinitou k makrofágům, které se po zachytu částic ox-LDL mění na pěnové buňky plné cholesterolu a přispívají ke vzniku nestabilního aterosomového plátu.



Obr. 3. **Metabolické dráhy cholesterolu u člověka;** ABC – transportér používající ATP, ACAT – acyl-CoA:cholesterol transferasa, CE – cholesteryl ester, CETP – protein přenášející estery cholesterolu, CM – chylomikron, CR – chylomikronový remnant, FC – volný cholesterol, HDL – lipoprotein o vysoké hustotě, IBAT – střevní transportní molekula pro žlučové kyseliny, LCAT – lecitin: cholesterol acyltransferasa, LDL – lipoprotein o nízké hustotě, LDLR – receptor pro částice LDL, LRP – receptor podobný LDL-R, MTP – mikrosomální transferový protein pro triacylglyceroly, NPC – Niemannův-Pickův protein, NPC1L1 – protein podobný Niemannovu-Pickovu proteinu 1, pool FC – metabolický pool volného cholesterolu, SR-B1 – receptor pro částice HDL, VLDL – lipoprotein o velmi nízké hustotě. Podle cit.^{7–9}.

Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) jsou jediné částice, které jsou schopné efektivně odstraňovat cholesterol ze subendoteliálních prostorů cév a jsou označovány jako antiaterogenní „hodný“ lipoprotein. Vznikají v játrech a enterocytech a interagují s lecitin: cholesterolacyltransferasou (LCAT), která tvoří estery cholesterolu. Ty jsou vyměněny za TAG, vzniká HDL₂, který se zachycuje v játrech. Přehled dějů je znázorněn na obr. 3.

4.3. Intracelulární pohyb cholesterolu

Největší podíl (60–80 %) intracelulárního cholesterolu je obsažen v plasmatické membráně, kde cholesterol tvoří až 40 % všech látek¹⁰. Další významnou část zásob cholesterolu je možné nalézt ve formě cytosolových kapek cholesterolesterů, které jsou tvořeny z volného cholesterolu účinkem isoformy 1 enzymu ACAT; zpětná hydrolýza esteru je prováděna neutrálními hydrolasami cholesterolesterů. V membránách endoplasmatického retikula se nachází pod 1 % buněčného obsahu cholesterolu, což umožňuje buňce zjišťovat i malé výkyvy v absolutním množství cholesterolu, a podle toho modulovat aktivitu jak biosyntetických, tak degradačních mechanismů spojených s endoplasmatickým retikulem.

Vstup cholesterolu do buňky

Obecně jsou tyto děje nespecifické, tedy nerozlišují mezi cholesterolem a podobnými molekulami. Cholesterol z diety vstupuje do enterocytu transportním mechanismem závislým na proteinu NPC1L1 (viz kapitola 4.1.). Sterolové molekuly cirkulující v krevním oběhu jako součást lipoproteinů (viz kapitola 4.2.) jsou buňkami přijímány s účastí receptorů pro lipoproteiny, např. pro částice LDL pomocí LDL receptoru a následnou endocytózou, pro HDL pomocí zachycovacího receptoru třídy B typ 1 (SR-B1) bez endocytózy částice.

Osud cholesterolu uvnitř buňky

Nejdůležitější funkcí cholesterolu je modulace vlastností biologických membrán – nejvíce cholesterolu je po případné hydrolýze esteru recyklováno zpět do plasmatické membrány, případně uskladněno jako ester. Ve steroidogenních buňkách musí cholesterol projít mitochondriální membránou s přispěním steroidogenního akutního regulačního proteinu (StAR) a periferního benzodiazepinového receptoru (PBR), aby se mohl rozštěpit postranní řetězec a následně vznikly steroidní hormony. Tvorba žlučových kyselin klasickou cestou v hepatocytu je regulována na úrovni 7 α -hydroxylace, která probíhá v endoplasmatickém

retikulu. Alternativní cesta, jež není specifická pro hepatocyt, oproti tomu začíná v mitochondriích, kde je přítomna sterol-27-hydroxylasa (cit.¹¹).

Exkreční mechanismy na buněčné úrovni¹²

Buňka se může zbavit přebytečného cholesterolu principiálně třemi odlišnými způsoby:

i) předáním cholesterolu do lipoproteinové kaskády (viz kapitola 4.2.). Hlavním akceptorem cholesterolu jsou částice HDL, ať už při tvorbě nascentních částic pre- β -HDL lipidací apoproteinu apoA-I fosfolipidy a cholesterolem pomocí proteinu ABCA1, při dalším zrání HDL na částice HDL₂, HDL₃ (účinkem ABCG1), nebo v průběhu přenosu volného cholesterolu do zralých HDL (působením SR-B1),

ii) exkrecí cholesterolu transportéry ABCG5/G8 do žluči nebo lumen střeva – tato cesta je používána pouze u enterocytů a hepatocytů,

iii) hydroxylací za vzniku oxysterolů, které fungují také jako signální molekuly. Přítomnost další hydroxyskupiny v molekule způsobí vyšší hydrofilnost a snazší transport. Tato možnost metabolisme cholesterolu je klíčová pro exkreci cholesterolu z mozku, kde je cholesterol konvertován na (24S)-hydroxycholesterol, který přímo prochází přes hematoencefalickou bariéru. Do této skupiny reakcí můžeme zařadit dvojnásobnou hydroxylaci fotolytického produktu 7-DHC, kterou se tvoří 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.

4.4. Vylučování cholesterolu

Z lidského těla je cholesterol vylučován převážně žlučí jako cholesterol nebo po konverzi v játrech na žlučové kyseliny. Ve žluči jsou nejčastěji zastoupenými žlučovými kyselinami kyselina chenodeoxycholová (45 %) a kyselina cholová (31 %), tzv. primární žlučové kyseliny syntetizované játry. Uvnitř střeva jsou primární žlučové kyseliny konvertovány na sekundární žlučové kyseliny, kyselinu deoxycholovou (z kyseliny cholové) a lithocholovou (z kyseliny chenodeoxycholové). Jak primární, tak sekundární žlučové kyseliny jsou reabsorbovány ve střevě a transportovány zpět do jater. V játrech je karboxylová skupina žlučových kyselin konjugována s glycinem a taurinem před jejich sekrecí do žlučových kanálků. Tento proces sekrece žlučových kyselin z jater do žluči a dále do střeva s následnou reabsorpcí je nazýván enterohepatální cirkulace. Za jeden den je žlučí z lidského těla odstraněn přibližně 1 g cholesterolu. Žlučové kyseliny vykonávají důležité fyziologické funkce: slouží k odstraňování nadbytečného cholesterolu z lidského těla, spolu s fosfolipidy rozpouštějí cholesterol ve žluči a předcházejí srážení cholesterolu ve žlučniku, v tenkém střevě působí jako emulgátory, usnadňují tak trávení a absorpci tuků a lipofilních vitaminů ve střevě.

5. Regulace na úrovni extracelulárního transportu cholesterolu

Biosyntéza a transport cholesterolu jsou v lidském těle přísně regulovány. Velká část cholesterolu je přijímána stravou nebo syntetizována v játrech, menší část si buňky tvoří samy. Buňky se tedy spoléhají na přísun cholesterolu krevním oběhem ve formě lipoproteinových částic.

LDL receptor má za úkol poskytovat buňkám dostatek cholesterolu. Největší množství LDL receptorů najdeme v játrech, gonádách a nadledvinách.

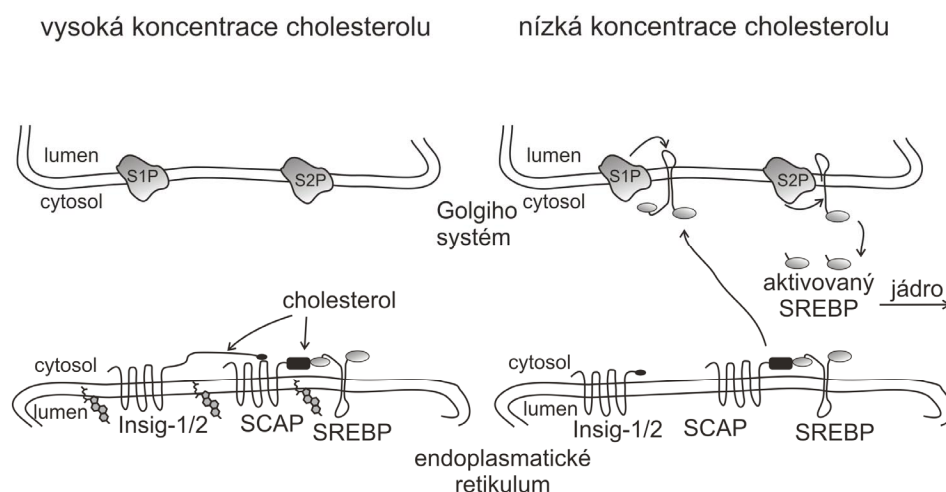
Lecitin:cholesterolacyltransferasa je enzym syntetizovaný v játrech, který se vyskytuje v plasmě v komplexech s lipoproteiny HDL. Enzymovou aktivitou LCAT (a v menší míře ACAT) vznikají prakticky všechny estery cholesterolu. LCAT je odpovědná za přenos mastné kyseliny v poloze *sn*-2 fosfatidylcholinu (lecitinu) na 3 β hydroxyskupinu cholesterolu. Zdrojem cholesterolu pro esterifikaci je volný cholesterol všech buněčných membrán a lipoproteinů (chylomikronů, VLDL, LDL a primárních, „nascentních“ HDL). Zdrojem fosfatidylcholinu jsou především primární HDL, ale i chylomikrony, VLDL a IDL. Jakmile se cholesterol v nascentních HDL esterifikuje, vznikne určitý koncentrační gradient, který přitahuje cholesterol ze tkání a ostatních lipoproteinů. HDL ztrácí hustotu a vzniká HDL₂, který dopravuje cholesterol do jater.

6. Regulace intracelulárního obsahu cholesterolu

Protože cholesterol hraje důležitou roli ve vnitřním metabolismu buňky, musí být jeho intracelulární hladina udržována na konstantní úrovni. Stablní koncentrace intracelulárního cholesterolu jsou zajištěny několika odlišnými mechanismy.

Mikrosomální 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasa (HMGR) je hlavní regulační enzym v biosyntéze cholesterolu. Je přítomen v endoplasmatickém retikulu všech buněk, které produkují cholesterol. Jeho nejvyšší aktivitu lze prokázat v játrech, tenkém střevě, gonádách a nadledvinách. Aktivita tohoto enzymu je regulována několika mechanismy. Krátkodobě kovalentní modifikací fosforylačně-defosforylačními reakcemi a dále zpětnovazebnou inhibicí enzymu. Z klinického hlediska zasahují do krátkodobé regulace aktivity HMGR fosforylačně-defosforylačními mechanismy např. hormony zajišťující homeostázu cukrů – glukagon a inzulin. Glukagon zvýšením cAMP inhibuje syntézu cholesterolu a inzulin vede snížením cAMP ke stimulaci syntézy cholesterolu.

Dlouhodobá regulace HMGR se děje řízením genové exprese a rychlosti degradace enzymu. Hladina cholesterolu v buňce (přesněji vzato v endoplasmatickém retikulu) reguluje transkripci genů kódujících enzymy zodpovědné



Obr. 4. **Regulace genové exprese hladinou cholesterolu v endoplasmatickém retikulu;** molekuly cholesterolu brání disociaci komplexu SCAP:SREBP z membrány endoplasmatického retikula tím, že podporují jeho kotvení proteinem INSIG. Při nízké hladině cholesterolu komplex disociuje a v Golgiho systému je protein SREBP postupně štěpen dvěma proteasami S1P a S2P. Výsledný produkt putuje do jádra, kde vazbou na příslušné sekvence podporuje transkripci. Zkratky: SCAP – protein aktivující štěpení proteinu SREBP, SREBP – protein vázající se na sterolový řídicí element řetězce DNA. Podle cit.^{13,14}

za biosyntézu cholesterolu a genů kódujících syntézu LDL receptorů (viz obr. 4).

Zpětnovazební inhibice HMGCoA reduktasy indukovaná cholesterolem je umožněna vazbou cholesterolu k doméně reagující na steroly (sterol sensing domain) ve struktuře HMGCoA reduktasy. Tím je inhibována aktivita enzymu, ale také stoupá rychlost jeho degradace. HMGCoA reduktasa je po ubiquitinaci degradována v proteasomech (multiproteinové komplexy určené k odbourávání bílkovin).

7. Cholesterol ve zdraví a nemoci

Příjem cholesterolu z vnějšku je dnes značně různorodý v závislosti na dietních zvyklостech daného jedince. Během evoluce se u člověka pravděpodobně několikrát významně změnily stravovací zvyklosti a příjem cholesterolu. V současnosti je možné rozlišit dva dietní extrémy: lakto-ovo-vegetariány (bez mléka a vajec) se silně redukováným příjmem exogenního cholesterolu (až na 60 mg/den) a dietu bohatou na cholesterol u všežravců (300 až 700 mg/den). Játra a střevo jsou významnými producenty cholesterolu. Denně je v lidském těle játry syntetizováno přibližně 500 mg cholesterolu, u osob s nízkým příjmem cholesterolu potravou produkují játra až 800 mg cholesterolu.

Také buněčné potřeby jsou značně variabilní v závislosti na stadiu vývoje organismu a typu tkáně.

Vybrané patologické stavy spojené s poruchami homeostázy cholesterolu

a) Hypercholesterolemie a ateroskleróza

Pro aterosklerózu je charakteristické ukládání cho-

lesterolu z lipoproteinů do pojivových tkání arteriálních stěn. Choroby, u nichž jsou dlouhodobě zvýšené hladiny VLDL, IDL a LDL v krvi (primární dyslipidémie genetiky podmíněné či sekundární dyslipidémie – např. diabetes mellitus, lipoidní nefróza, hypotyreóza), jsou často provázeny předčasnou nebo velmi závažnou aterosklerózou.

Dnes doporučený cílový limit pro celkovou hladinu cholesterolu v séru $5,2 \text{ mmol l}^{-1}$ je daleko vyšší než sérové hladiny cholesterolu u volně žijících primátů ($3,25 \text{ mmol l}^{-1}$), kteří mají pravděpodobně stejné průměrné hodnoty cholesterolu jako naši předci. Přestože mnozí pacienti mají hladinu celkového cholesterolu pod dnes doporučeným limitem, rozvine se u nich ischemická choroba srdeční a následně infarkt myokardu. To pravděpodobně, mimo jiné, povede k přehodnocení a opětovnému snížení limitu cholesterolu.

b) Neurodegenerativní onemocnění a poruchy metabolismu cholesterolu

Alzheimerova choroba (ACH)

Je nejznámější neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém se postupně rozvíjí demence. Odhaduje se, že postihuje více než 15 milionů lidí na světě. Stárnoucí mozková tkáň postupně ztrácí schopnost odstraňovat toxický beta-amyloid, který je vedlejším produktem normální neuronové aktivity.

Bylo prokázáno, že hladina cholesterolu ovlivňuje tvorbu beta-amyloidu, ačkoliv molekulární mechanismus vztahu mezi poruchou homeostázy cholesterolu a ACH zůstává nejasný. Vysoká plasmatická koncentrace cholesterolu a přítomnost apo E isoformy E4 jsou rizikovými faktory pro rozvoj ACH. Podávání statinů (viz kapitola

8.2.), jako prevence kardiovaskulárních onemocnění, může působit také preventivně na pozdně počínající Alzheimerovu chorobu, nejčastější formu tohoto onemocnění. Pravděpodobným mechanismem účinku statinů by mohla být stimulace mozkových endoteliálních buněk k tvorbě LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), který řídí vylučování beta-amyloidu^{15,16}.

Smithův-Lemliho-Opitův syndrom (SLO syndrom)

Nízké hladiny cholesterolu mohou mít nepříznivé účinky na lidský organismus, protože cholesterol je nezbytný pro řadu metabolických dějů (obr. 1). Typickým příkladem nedostatku cholesterolu jsou geneticky podmíněné defekty v biosyntéze cholesterolu. Mezi nejčastější patří SLO syndrom s odhadovanou incidencí ve středoevropském prostoru okolo 1/20000 – 1/10000. Tento syndrom je autosomálně recesivně dědičné onemocnění způsobené nedostatkem 7-DHC reductasy. Je charakterizováno mentální a růstovou retardací, poruchami chování (autismus, opakované sebepoškozování, stereotypní pohyby, poruchy spánku), kraniofaciálními malformacemi, mužským pseudhermafroditismem a končetinovými anomáliemi¹⁷. V séru nacházíme těžkou hypocholesterolemii a akumulaci 7-DHC, která je patognomická pro onemocnění. Je zajímavé, že u krys, kterým byly podávány inhibitory 7-DHC reductasy, bylo možné současným podáváním stravy bohaté na cholesterol obnovit normální fenotyp, což vedlo k návrhu, že nedostatek cholesterolu je hlavní příčinou SLO syndromu¹⁸. Přímá role 7-DHC nebo jeho oxidovaných derivátů není dodnes jasná^{19–21}. Současná taktika léčby spočívá v suplementaci cholesterolu dietou, čímž se zvyšuje plasmatická koncentrace cholesterolu²².

Huntingtonova choroba (HCH)

Huntingtonova choroba je autosomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění, které je způsobeno zvýšeným počtem trinukleotidových sekvencí (CAG) v genu pro bílkovinu huntingtin. Nemoc se projevuje progresivní degenerací striata (součást bazálních ganglií, uložená v subkortikální části mozku). Klinické příznaky se nejčastěji manifestují okolo 30.–45. roku života; jsou to hyperkinézy, atetózy, psychické poruchy, poruchy chůze, demence. Léčba není známa. Nedávné nálezy podporují teorii, že při tomto onemocnění hraje také roli porucha biosyntézy cholesterolu. U pacientů s Huntingtonovou chorobou a na myších modelech byly prokázány významně snížené koncentrace klíčových mRNA genů pro biosyntézu cholesterolu. Dále v mozcích transgenických myší R6/2 progresivně klesají hladiny prekurzorů biosyntézy cholesterolu (lathosterol, lanosterol) a klesá aktivita HMGR již v presymptomatickém stadiu onemocnění²³.

c) Poruchy chování, sebevražedné tendence a hypocholesterolemie

Během posledních let byla publikována řada prací zabývajících se existencí vztahu mezi hypocholesterolemií a psychickými poruchami (depresivitou, násilím a sebevražedností) s protichůdnými výsledky. Nejčastěji zmiňova-

ným vysvětlením tohoto vztahu je Engelbergova hypotéza z roku 1992, podle které změny koncentrace cholesterolu v plasmě mohou ovlivňovat množství cholesterolu v plasmatických membránách, jejich viskozitu a následně serotoninergní transmisí²⁴. Nicméně publikované studie sledující metabolismus serotoninu v mozkomíšním moku nenalezly vztah mezi hladinami cholesterolu a metabolity serotoninu²⁵. Již delší dobu se spekuluje o tom, že také nedostatek vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 a stoupající spotřeba cukrů při změně dietních zvyklostí by se mohly podílet na nárůstu depresivity a suicidality²⁶.

8. Současné možnosti léčby hypercholesterolemie

Léta 50. a 60. minulého století byla obdobím rozsáhlé diskuse o příčinách vzniku aterosklerózy. Na jedné straně stál „klasický“ názor, že toto onemocnění je neoddelitelnou součástí stárnutí, na straně druhé stála takzvaná „lipidová hypotéza“, která postulovala hlavní roli lipidů, často zjednodušeně cholesterolu, v procesu aterogeneze. Velké studie na základě dietních opatření i lékových intervencí postupně shromáždily důkazy pro lipidovou hypotézu, která je v hlavních rysech platná dodnes.

8.1. Dietní a režimová opatření

Mezi základními kroky v léčbě hypercholesterolemie je nezbytné na začátku zmínit dietní a režimová opatření. Přestože jejich možnosti jsou limitované, hlavní výhodou zůstává, že jde o přirozenou formu regulace hladiny cholesterolu a jiných lipidů v lidském těle. Hlavním cílem v léčbě hypercholesterolemie je nejen normalizace laboratorních parametrů, ale především snížení kardiovaskulárního rizika. Denním vyloučením 200 mg cholesterolu z diety se sníží celkový cholesterol v krvi přibližně o 0,13 mmol l⁻¹ (cit.²⁷). V průměru bývá dietními opatřeními dosaženo snížení celkového cholesterolu po 6 měsících intervence o 5,3 % (cit.²⁸). Krátkodobě lze intenzivní dietou dosáhnout maximálního poklesu celkového cholesterolu o přibližně 10–20 % a to pouze u 20–40 % zúčastněných²⁹.

Pozitivní vliv na koncentrace sérového cholesterolu mají mastné kyseliny. Je známo, že nahrazení nasycených mastných kyselin nenasycenými vede ke snížení hladin cholesterolu v séru a působí velmi prospěšně^{30–32}. Přestože alkohol obecně u pacientů s hyperlipoproteinémií není doporučován, byla v roce 1997 publikována v USA studie sledující vliv pití malého množství alkoholu (100–200 ml vína denně), která prokázala pokles celkového a LDL cholesterolu provázený vzestupem koncentrace HDL cholesterolu. Tyto změny byly dále provázeny snížením výskytu kardiovaskulární morbidity a mortality^{33,34}.

Celou řadou klinických studií byl dále prokázán pozitivní vliv pravidelné fyzické aktivity na lipidové spektrum urychlením katabolismu lipoproteinových částic a zvýšením aktivity lipoproteinové lipasy. Nejčastěji bývá zmiňován vzestup koncentrace HDL cholesterolu spojeného

s poklesem koncentrací celkového a LDL cholesterolu³⁵.

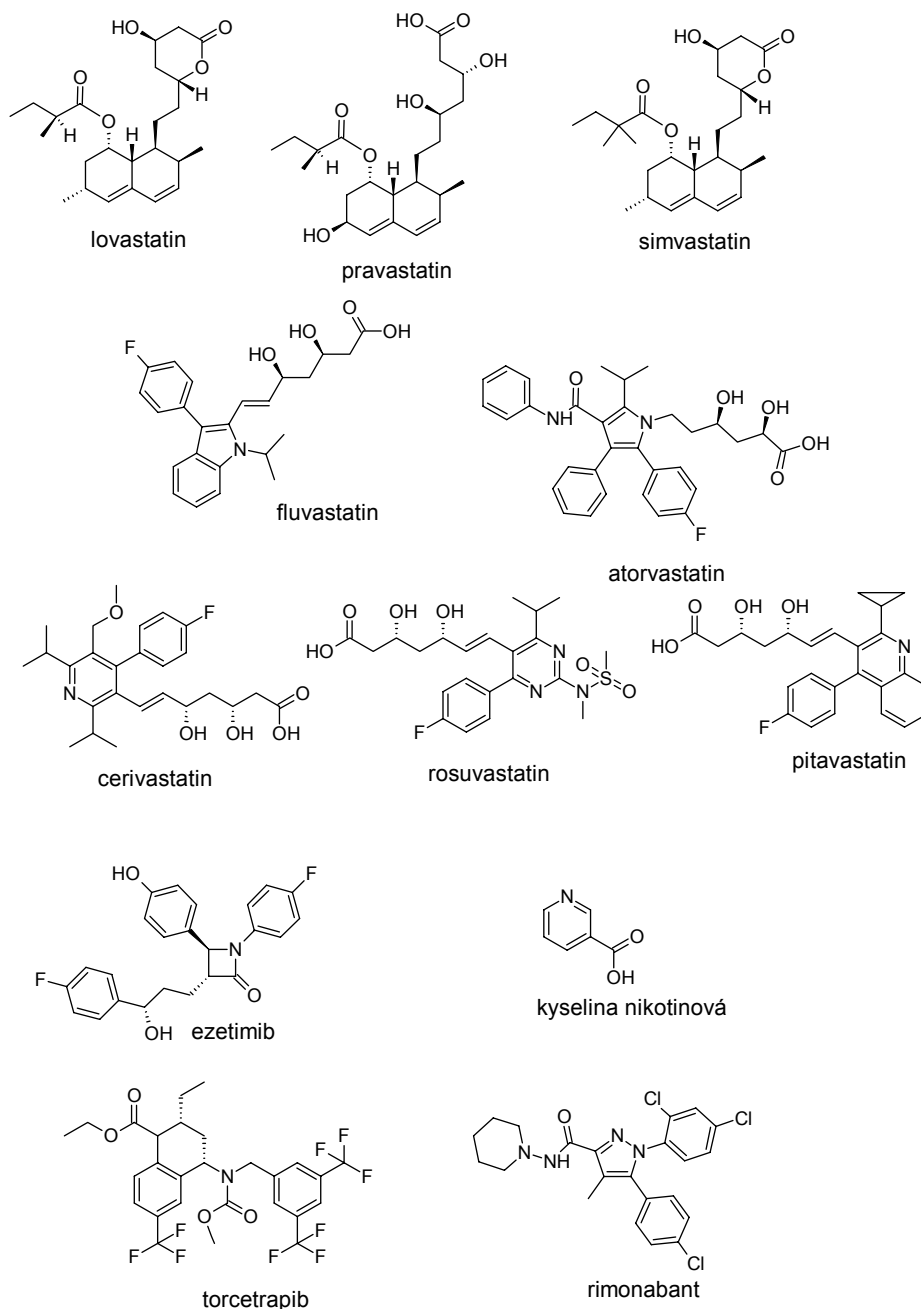
Vstřebávání cholesterolu ve střevě také snižují některé další látky, jako vláknina, rostlinné stanoly a steroly, inhibitory ACAT a dále syntetické saponiny^{6,36}.

8.2. Farmakoterapie

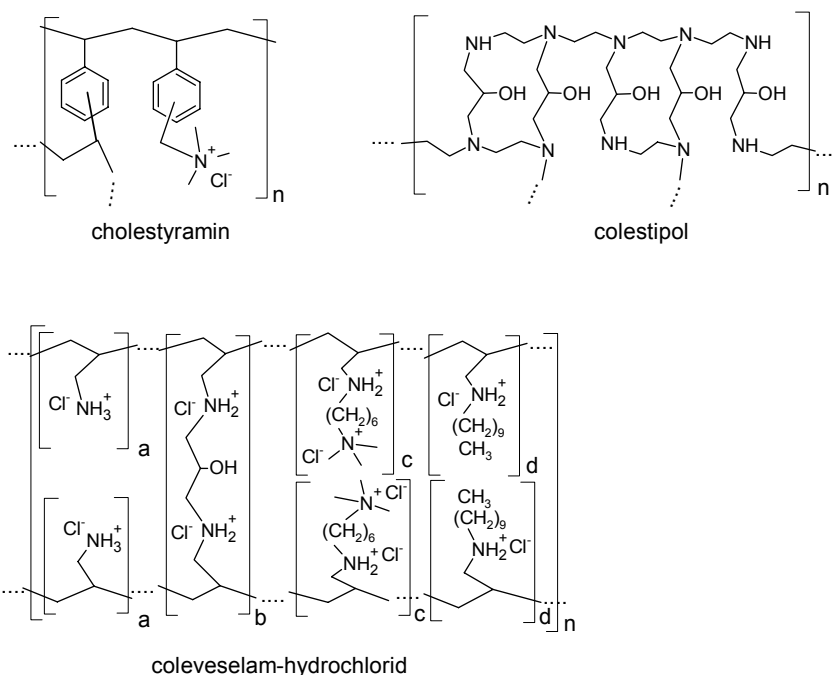
Statiny

V roce 1976 objevil Endo a spol., že plíseň *Penicillium citricum* je schopná některými svými produkty

(statiny) inhibovat biosyntézu cholesterolu kompetitivní inhibicí HMGR. Inhibice způsobuje nitrobuněčný deficit cholesterolu a důsledkem je zvýšení syntézy a aktivity LDL receptorů, které umožňují zvýšené zachycování částic LDL z plasmě. Statiny také snižují hladinu triacylglycerolů v plasmě. Tento mechanismus působení není ovšem zcela přesně objasněn. Zvažuje se snížení biosyntézy VLDL částic v játrech a jejich zvýšené vychytávání také LDL receptory. U smíšených hyperlipidemií je efekt léčby monoterapií statiny na hladinu triacylglycerolů příz-



Obr. 5a. Strukturní vzorce hypolipidemických léků I



Obr. 5b. **Strukturní vzorce hypolipidemických léků II – nosiče žlučových kyselin**; tyto účinné látky jsou vlastně složité kopolymery³⁹, většinou ve formě hydrochloridu. Cholestyramin je kopolymer styrenu sesíťovaného divinylbenzenem, na který je připojena kvartérní amoniová skupina. U colestipolu (kopolymer di- až hexa-ethyltri- až heptaaminu s epichlorhydrinem) se předpokládá, že je protonována asi jedna pětina dusíkových atomů. Colesevelam je vyráběn z polyallylaminu síťovaného epichlorhydrinem a alkylovaného 1-bromdekanem a (6-bromhexyl)trimethylammonium bromidem⁴⁰

nivý tam, kde jejich hodnota nepřekračuje 4 mmol l^{-1} . Při vyšších hodnotách již statiny v monoterapii selhávají a je třeba přistoupit ke kombinační terapii.

Statiny lze rozdělit podle původu do tří generací: 1. generace – biologické produkty plísní a semisyntetické deriváty: lovastatin, pravastatin, simvastatin; 2. generace – syntetické racemáty: fluvastatin; 3. generace – plně syntetické preparáty (enantiomery): cerivastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin (vzorce jsou uvedeny na obr. 5a)⁴⁴.

Statiny třetí generace mají nekomplexnější účinky na celé lipidové spektrum. Přestože léčba statiny významně zasahuje do metabolismu cholesterolu, nebyl provedenými studiemi prokázán vliv statinů na tvorbu steroidních hormonů nebo vitamínu D.

Statiny a rhabdomyolýza

Hluboko do povědomí lékařské veřejnosti vešel právě cerivastatin svým rhabdomyolytickým potenciálem (způsobujícím akutní rozpad buněk kosterního svalu). Tento preparát v kombinační léčbě s gemfibrozilem a ve vyšších dávkách i v monoterapii vedl k úmrtí na rhabdomyolýzu. Tyto vedlejší účinky vedly k jeho konečnému stažení z farmaceutického trhu.

Při sledování nežádoucích účinků a interakcí statinů s ostatními léky hraje významnou úlohu jejich jaterní biotransformace působením isoenzymů cytochromu P450. Tři hlavní isoenzymy cytochromu P450, které se účastní bio-

transformace statinů, jsou 3A4, 2C9 a 2D6. Až dvacetinásobně se může zvýšit koncentrace statinů při kompetitivním zablkování daného isoenzymu jiným lékem. Tím výsoce vzrůstá potenciální riziko rozvoje nežádoucích účinků a rhabdomyolýzy. Například u statinů (cerivastatin), které jsou převážně metabolizovány isoenzymem cytochromu P4503A4, lze kompetitivně zablkovat jejich odbourávání některými běžnými antihypertenzivy (verapamil, diltiazem, felodipin) nebo kontraceptivy s noretisteronem.

Statiny lze také z chemického hlediska rozdělit na hydrofilní a lipofilní. Z klinického hlediska existuje teoretický předpoklad, že lipofilní statiny (např. lovastatin, simvastatin, pravastatin) mohou mít vyšší mytoxické účinky díky možnému snazšímu vstupu do svalové buňky³⁷.

Ezetimib

Je nováčkem na farmaceutickém trhu při léčbě hyperlipidemií. Ezetimib (obr. 5a) je inhibitor absorpce cholesterolu (působí pravděpodobně přímou inhibicí Niemann Pick like-1 proteinu, o kterém se předpokládá, že je transportním proteinem pro cholesterol) v buňkách kartáčkového lemu střevní sliznice (viz kapitola 4.1). Ezetimib je zcela nový typ hypolipidemika, které působí blokádu vstřebávání cholesterolu enterocytem, a snižuje tak dodávku cholesterolu ze střeva do jater. To vede jednak k žádoucí regulaci LDL receptorů v játrech a ke zvýšení

vychytávání LDL částic z plasmy, ale také k nežádoucí zvýšené syntéze cholesterolu *de novo* v játrech. Předpokládané využití ezetimibu proto pravděpodobně bude spočívat především v kombinací terapii se statiny, které zablokují biosyntézu cholesterolu v játrech. V tomto případě mluvíme o tzv. duální inhibici³⁸.

Sekvestranty žlučových kyselin

Cholestyramin a colestipol (obr. 5b) jsou v léčbě hyperlipidemií využívány již několik desítek let. Jejich základní indikací je izolovaná hypercholesterolemie. Všechny sekvestranty jsou nevstřebatelné a tím netoxické, proto je lze bezpečně podávat u dětí a těhotných. Limitujícím faktorem jsou nežádoucí účinky (především úporná zácpa), které popisuje 30–50 % pacientů. Nejmodernější pryskyřice colesvelam (obr. 5b), podávaná v USA, má méně nežádoucích účinků a lepší toleranci.

Sekvestranty žlučových kyselin přerušují enterohepatický oběh žlučových kyselin zablokováním zpětné resorpce žlučových kyselin v distální části tenkého střeva, ileu. Zde se vyměňují chloridové anionty sekvestrantu za anionty žlučových kyselin, které jsou tak vyřazeny z procesu zpětné absorpce. Významně stoupá přeměna cholesterolu na žlučové kyseliny, aby byla zachována jejich hotovost, protože je porušeno zpětné inhibiční působení žlučových kyselin na vlastní syntézu. Stoupá exprese LDL receptorů na hepatocytech, zvýšeně se zachycují LDL částice s následným snížením plasmatické koncentrace cholesterolu.

Podobného výsledku lze také dosáhnout chirurgickým vyřazením ilea.

Kyselina nikotinová (niacin) „Již přes 40 let známý a přesto stále neznámý lék“

Od 60. let minulého století je známo, že niacin inhibičně lipolýzy v tukové tkáni snižuje koncentrace volných mastných kyselin v plasmě. Za hlavní mechanismus působení niacinu na snížení cholesterolu se považuje snížení produkce VLDL v játrech a následně snížení jejich sekrece do krve. To také pravděpodobně vede ke snížení tvorby LDL, jehož prekurzorem je VLDL. Hladina LDL-cholesterolu při léčbě niacinem klesá o 20–25 %. Mechanismus významného zvýšení koncentrace HDL-cholesterolu o 20–30 % není dosud přesně znám. O přibližně 20 % klesají koncentrace apolipoproteinu B a stoupají koncentrace apo A-I. Dále niacin prakticky jako jediné hypolipidemikum snižuje koncentrace lipoproteinu(a). Je prokázáno řadou klinických studií, že niacin pozitivně působí na kardiovaskulární morbiditu a mortalitu, snižuje progresi a vyvolává regresi aterosklerózy. Limitující v léčbě jsou poměrně časté nežádoucí účinky, jako je flush, hyperurikemie a gastrointestinální obtíže.

Torcetrapib

Tato látka (obr. 5a) je inhibitor proteinu přenášejícího estery cholesterolu (CETP), který hraje významnou roli v reverzním transportu cholesterolu. Estery cholesterolu

v HDL částicích jsou transportovány působením CETP do LDL a VLDL. Inhibicí CETP torcetrapibem se významně zvyšuje koncentrace HDL cholesterolu.

Rimonabant

Rimonabant (obr. 5a) je hypolipidemikum, které působí jako blokátor endokanabinoidního systému prostřednictvím receptorů CB₁ (cit. ⁴¹). V centrálním nervovém systému způsobí snížení chuti k jídlu a v adipocytech zvýšením syntézy adiponektinu zvyšuje hladiny HDL cholesterolu, snižuje inzulinovou rezistenci a hladiny triacylglycerolů. S úspěchem je využíván u nemocných při léčbě dyslipidemií s diabetes mellitus a obezitou.

8.3. Extrakorporální aferéza

Extrakorporální aferéza je mimotělní očišťování plasmy od aterogenních LDL částic⁴². Jde o metodu technicky i ekonomicky velice náročnou, je využívána spíše omezeně a pouze ve specifických indikacích, např. u homozygotů s familiární hypercholesterolemií a při těžké hypercholesterolemii s kumulací kardiovaskulárních rizik v mladém věku. Poprvé byla provedena v roce 1967 v Paříži. Dnes se využívá k odstranění aterogenních částic nejčastěji tři metod: vysrážení LDL indukované heparinem, imunoabsorpce LDL s využitím protilátek proti apolipoproteinu B, nebo vazby LDL částic na dextran-sulfátovou celulosu. Jednorázový výkon vede k poklesu LDL cholesterolu o 50–80 %, dlouhodobě o 50–65 %. Dále snižuje velmi efektivně koncentraci lipoproteinu(a), samostatného rizikového faktoru aterosklerózy a zlepšuje reologické vlastnosti krve. Vede též k regresi podkožních xantomů a regresi aterosklerotických plátů v cévním řečišti⁴³.

9. Závěr

Metabolismus cholesterolu na molekulární úrovni dostává v poslední době jasnější obrysy. Cholesterol je vnímán nejen jako součást buněčných membrán, ale i jako látka schopná kovalentní interakce s některými proteiny a také jako ligand pro bílkovinné domény. Regulace biosyntézy a příjmu cholesterolu ve stravě probíhá složitými mechanismy zasahujícími jak extracelulární, tak vnitrobuněčné pochody. Nové poznatky o těchto pochodech dovolily účinnější boj se zvýšenou hladinou cholesterolu, kterou se snažíme snížit inhibicí jak biosyntézy, tak i absorpcí cholesterolu.

Některé otázky metabolismu cholesterolu, které mají významný klinický dopad, ale zůstávají stále nevyřešeny – např. není zcela jasná role cholesterolu v neurodegenerativních poruchách. V souvislosti s rozvojem aterosklerotického poškození se stále hovoří o metabolitech cholesterolu, ale úloha meziproduktů biosyntézy cholesterolu v organismu také není uspokojivě známa. Zmíněné problémy otevírají široké pole pro další výzkum, věrme tedy, že se v blízké době podaří na některé otázky odpovědět.

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR číslo MSM0021620820.

LITERATURA

- Kasal A.: Chem. Listy 97, 921 (2003).
- Waterham H. R.: Clin Genet. 61, 393 (2002).
- McNamara J. R., Warnick G. R., Cooper G. R.: Clin. Chim. Acta 369, 158 (2006).
- Dock W.: Ann. Intern. Med. 49, 699 (1958).
- Žák A., Vecka M., Tvrzická E., Hrubý M., Novák F., Papežová H., Lubanda H., Veselá L., Staňková B.: Phys. Res. 54, 443 (2005).
- Modrianský M., Valentová K., Přikrylová V., Walterová D.: Chem. Listy 97, 504 (2003).
- Dietschy J. M., Turley S. D.: J. Lipid Res. 45, 1375 (2004).
- Altmann S. W., Davis H. R., Zhu L. J., Yao X., Hoos L. M., Tetzloff G., Iyer S. P., Maguire M., Golovko A., Zeng M., Wang L., Murgolo N., Graziano M. P.: Science 303, 1201 (2004).
- Redgrave T. G.: Biochem. Soc. Trans. 32, 79 (2004).
- Maxfield F. R., Wüstner D.: J. Clin. Invest. 110, 891 (2002).
- Miller W. R.: Mol. Cell Endocrinol. 265-266, 46 (2007).
- Ikonen E.: Physiol. Rev. 86, 1237 (2006).
- McPherson R., Gautier A.: Biochem Cell Biol. 82, 201 (2004).
- Espenshade P. J.: J. Cell Sci. 119, 973 (2006).
- Whitfield J.F.: Expert Opin Ther Targets. 10, 1257 (2007).
- Kuller LH.: Curr Atheroscler Rep. 9, 154 (2007).
- Tierney E., Nwokoro N. A., Porter F. D., Freund L. S., Ghuman J. K., Kelley R. I.: Am. J. Med. Genet. 98, 191 (2001).
- Gaoua W., Wolf C., Chevy F., Ilie F., Roux C.: J. Lipid Res. 41, 637 (2000).
- Gaoua W., Chevy F., Roux C., Wolf C.: J. Lipid Res. 40, 456 (1999).
- De Fabiani E., Caruso D., Cavaleri M., Galli Kienle M., Galli G.: J. Lipid Res. 37, 2280 (1996).
- Fernandez C., Martin M., Gomez-Coronado D., La-suncion M. A.: J. Lipid Res. 46, 920 (2005).
- Haas D., Garbade S. F., Vohwinkel C., Muschol N., Trefz F. K., Penzien J. M., Zschocke J., Hoffmann G. F., Burgard P.: J. Inher. Metab. Dis. 30, 375 (2007).
- Valenza M., Leoni V., Tarditi A., Mariotti C., Björkhem I., Di Donato S., Cattaneo E.: Neurobiol. Dis. 28, 133 (2007).
- Engelberg H.: Lancet. 339, 727 (1992).
- Vevera J.: Cas. Lek. Cesk. 145, 118 (2006).
- Peet M., Murphy B., Shay J., Horrobin D.: Biol. Psychiatry 43, 315 (1998).
- Carke R., Frost Ch., Collins R., Appleby P., Peto R.: BMJ 314, 112 (1997).
- Tang J. L., Armitage J. M., Lancaster T., Silagy C. A., Fowler G. H., Neil H. A.: BMJ 316, 1213 (1998).
- Denke M. A.: Arch. Intern. Med. 155, 17 (1995).
- Žák A., Tvrzická E., Zeman M., Vecka M.: Cas. Lek. Cesk. 144 Suppl 1, 6 (2005).
- Robinson J. G., Stone N. J.: Am. J. Cardiol. 98 (44), 39i (2006).
- Schmidt E. B., Christensen J. H., Aardestrup I., Madsen T., Riahi S., Hansen V. E., Skou H. A.: Lipids 36, S65 (2001).
- Handa K., Sasaki J., Saku K., Kono S., Arakawa K.: Am. J. Cardiol. 65, 287 (1990).
- Thun M. J., Peto R., Lopez A. D., Monaco J. H., Henley S. J., Heath C. W., Doll R.: N. Engl. J. Med. 337, 1705 (1997).
- Huttunen J. K., Lansimies E., Voutilainen E., Ehnholm C., Hietanen E., Penttilä I., Siitonen O., Rauramaa R.: Circulation 60, 1220 (1979).
- Zadák Z., Hyšpler R., Tichá A., Solichová D., Bláha V., Melichar B.: Acta Med. 49, 23 (2006).
- Maron D. J., Fazio S., Linton M. F.: Circulation 101, 207 (2000).
- Bruckert E., Giral P., Tellier P.: Circulation 107, 3124 (2003).
- Zarras P., Vogl O.: Prog. Polym. Sci. 24, 485 (1999).
- Davidson M. H., Dillon M. H., Gordon B., Jones P., Samuels J., Weiss S., Isaacsohn J., Toth P., Burke S. K.: Arch. Intern. Med. 159, 1893 (1999).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 314 (2006).
- Morelli F., Carlier P., Giannini G., De Luigi M. C., Dejana A. M., Ruzzenenti M. R.: Int. J. Artif. Organs 28, 1025 (2005).
- Naoumova R. P., Thompson G. R., Soutar A. K.: Curr. Opin. Lipidol. 15, 413 (2004).
- Hájková M., Kratochvíl B., Rádl S.: Chem. Listy 102, 3 (2008).

H. Lubanda and M. Vecka (Department of Internal Medicine 4, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic): **Cholesterol: A Friend or Foe?**

The review describes recent findings on cholesterol biosynthesis and its fate in the human organism from the medicinal point of view. Biosynthesis of cholesterol is a complex process which also provides the organism with several indispensable compounds. Cholesterol is utilized both as such and in the form of many derivatives. Cholesterol is not only a cellular membrane component, but it also binds covalently to proteins. Cholesterol biosynthesis control and its dietary intake are performed by sophisticated mechanisms including extracellular and intracellular pathways. New findings on these processes allow a more efficient therapy of high cholesterol level in blood plasma.

CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE

EVA VAVŘÍKOVÁ A JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové
jarmila.vinsova@faf.cuni.cz

Došlo 11.10.07, přepracováno 3.6.08, přijato 11.9.08.

Klíčová slova: chitosan, antibakteriální aktivita, protinádorová aktivita, antioxidační aktivita

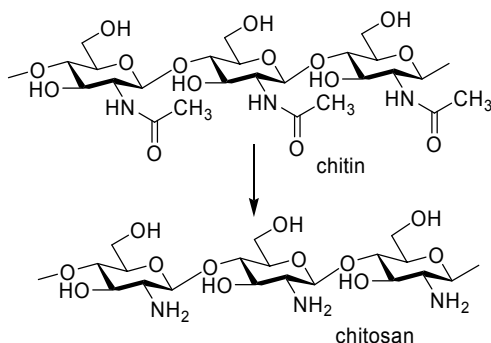
Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika chitosanu
3. Farmaceutické aplikace chitosanu
 - 3.1. Antibakteriální aktivita
 - 3.2. Protinádorová aktivita
 - 3.3. Antioxidační aktivita
4. Závěr

1. Úvod

Polymery jsou v dnešní době stále častěji využívány jako vhodné biodegradabilní nosiče léčiv. Používají se k pomalému uvolňování účinné složky, tedy jako depotní formy, ke zvyšování rozpustnosti a lepší možnosti cíleného podání.

Mezi přírodní polymery typu polysacharidů patří chitosan (poly-D-glukosamin), odvozený od přírodního chitinu, druhého nejrozšířenějšího polysacharidu po celulóse. Získává se alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením *N*-deacetylasy (EC 3.5.1.41)¹, (obr. 1).



Obr. 1. Deacetylce chitinu

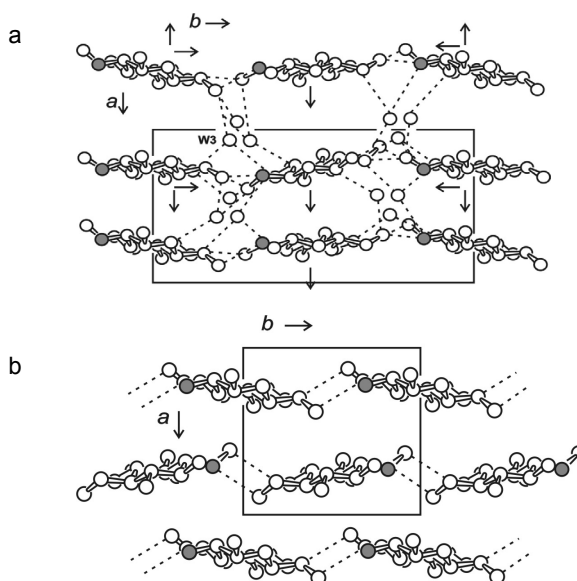
Stupeň deacetylce chitinu se udává v procentech, obvykle v rozmezí 60–100 %. Chitosan se v přírodě vyskytuje pouze v malém množství u několika typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*².

Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní³. Pro své výjimečné vlastnosti se používá v různých oborech zahrnujících především biomedicínu, kosmetiku, agrochemii, fyzikální chemii, konzervaci potravin, čištění vody a impregnaci textilií⁴. Používá se také jako potravní doplněk pro snížení hladiny cholesterolu a redukci hmotnosti. Váže na sebe tuky a cholesterol a odvádí je ze zažívacího traktu dříve, než jsou zpracovány⁵. Jako vláknina zlepšuje činnost tlustého střeva a snižuje pocit hladu, proto se používá k hubnutí. Někdy se mu přičítá přílišný redukční účinek, který však nebyl vědecky prokázán.

2. Charakteristika chitosanu

Chitosan neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan patří mezi méně časté kationové polymery. V porovnání s chitinem má větší chemickou a biochemickou reaktivitu.

Rentgenostrukturní analýzou^{6,7} byly objeveny 4 krystalické polymorfy chitosanu, tři hydratované (tendonová forma, forma II a L2), které snadno vytvářejí ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami a jedna nehydratovaná forma, která vzniká zahříváním hydratovaného chitosanu na teplotu 200 °C (cit.³). Dehydrataci se



Obr. 2. a) Hydratovaný chitosan, b) nehydratovaný chitosan

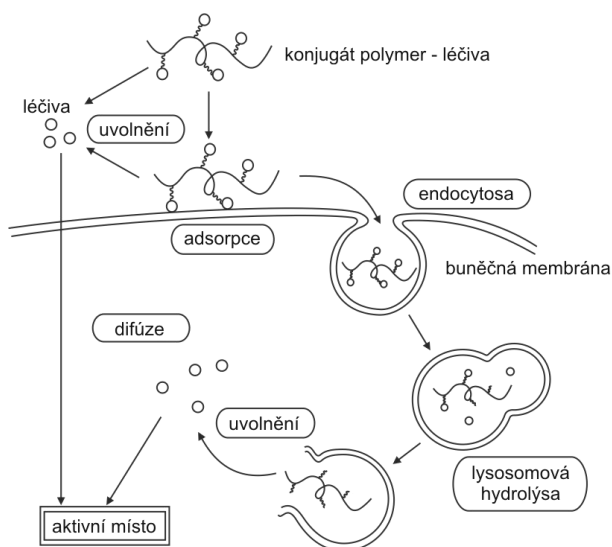
zkracují vzdálenosti vrcholů struktury „cik-cak“ a oddálení jednotlivých řetězců, (obr. 2, cit.⁸). Tato změna je ireversibilní. Nehydratované krystaly jsou nerozpustné v kyselinách, s kovovými ionty tvoří komplexy. Krystaly bezvodé formy ztrácí funkci biomateriálů a mohou být použity jako inertní pryskyřice.

Molekula chitosanu má tři reaktivní centra: primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu. Aminoskupina snadno podléhá kvarternizaci, čímž lze zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě a tvoří komplexy s ionty kovů. Primární hydroxyskupina bývá nejčastěji substituována spojovacími články „spacery“, na které se váže aktivní složka – léčivo nebo skupina, která je zodpovědná za cílení léčiva nebo zvýšení rozpustnosti ve vodě. Sekundární hydroxyskupina je modifikována především za účelem zvýšení rozpustnosti ve vodě.

3. Farmaceutické aplikace chitosanu

Pro své výjimečné vlastnosti je chitosan velmi zajímavý materiál a bioaktivní činitel ve farmaceutických a biomedicinských odvětvích. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním znakem je řízené uvolňování a cílení léčiva. Vyžaduje se též optimální odpověď receptoru, minimální vedlejší účinky a prodloužený efekt léčiva.

Polymer může být léčivem, pokud sám vykazuje farmakologickou aktivitu, i když jeho monomerní jednotky jsou neaktivní. Polymerní proléčivo je makromolekulární látka, která slouží nejčastěji jako nosič léčiva, sama může mít i nemusí biologickou aktivitu. Je obvykle složeno z polymerního nosiče, biodegradabilní vazby mezi nosičem a léčivem a mívá skupinu, která způsobuje cílení, např. specifický peptid pro cílovou buňku.



Obr. 3. Cesty léčivé látky k aktivnímu místu

Použití makromolekulárních proléčivových konjugátů s nízkou molekulovou hmotností je jednou z metod transportu léčiv, který je zaměřen na zlepšení pohybu látky změnou rozpustnosti a molekulární velikosti, udržení vhodných koncentrací léčiv pomalu se uvolňujících z nosičů, cílený transport léčiv do cílových buněk, podporu inkorporace léčiv do buněk endocytózou a hybridizací dvou druhů léčiv nebo léčiva s bioaktivním polymerním nosičem. Design konečné molekuly konjugátu musí být také v souladu s fyzikálními vlastnostmi konjugátu a biochemickými vlastnostmi polymerního nosiče. Polymerní nosiče (jejich velikost, elektrický náboj, hydrofilnost nebo lipofilnost a specifická transmembránová transportní schopnost) mohou změnit farmakologické a imunologické aktivity látek, které roznášejí.

Průnik makromolekulárního proléčiva do buňky může probíhat difúzí uvolněného léčiva do buňky nebo endocytózou konjugátu polymer-léčivo (obr. 3). Nejideálnější cestou pro polymery je endocytóza, kdy je celý konjugát vpraven do buňky a v lysosomech se z něho léčivo postupně uvolňuje působením lysosomových enzymů.

3.1. Antibakteriální aktivita

Samotný chitosan vykazuje antibakteriální účinnost vůči mnoha grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*) i gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*)⁹ a houbám při pH < 6. Přesný mechanismus antimikrobiální účinnosti sice není plně znám, ale předpokládá se, že kladně nabitě aminoskupiny glukosaminových jednotek interagují s negativně nabitými komponentami mikrobiálních buněčných membrán, tím mění propustnost a způsobují únik intracelulárního obsahu^{10,11}, což vede k rozpadu buněk^{12–14}. Další návrh mechanismu působení se týká penetrace nízkomolekulárního chitosanu do buňky, kde se váže na DNA a způsobuje částečnou inhibici RNA a proteinové syntézy¹⁵. Chitosan rovněž chelatuje s kovy potřebnými pro růst mikroorganismů¹⁶. Biologická aktivita chitosanu závisí na mnoha faktorech (molekulové hmotnosti, stupni deacetylace chitinu, derivatizaci, typu substituce, velikosti a poloze substituentů na chitosanovém skeletu, rozpustnosti, pH roztoku), které vedou k rozsáhlému studiu jeho modifikací ve snaze o přípravu vhodné aplikační formy, zlepšení účinku a cíleného působení.

Důležitým faktorem je velikost molekuly chitosanu a jeho koncentrace¹⁷. Obecně lze konstatovat, že optimální velikost aktivního chitosanu se pohybuje v rozmezí 2 až 200 kDa.

Tokura a spol.¹⁸ objevili, že chitosan s vyšší molekulovou hmotností (9300) téměř úplně inhibuje aktivitu *E. coli*, zatímco chitosan s nízkou molekulovou hmotností (2200) je inaktivní. K objasnění tohoto pozoruhodného faktu bylo použito chitosanu značeného pomocí fluorescein isothiokyanátu (FITC). Vysokomolekulární chitosan zaplní vnější stranu buněčné stěny a inhibuje pronikání živin dovnitř, zatímco chitosan s nízkou molekulovou

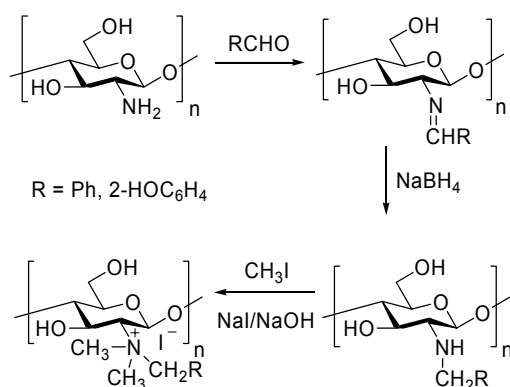
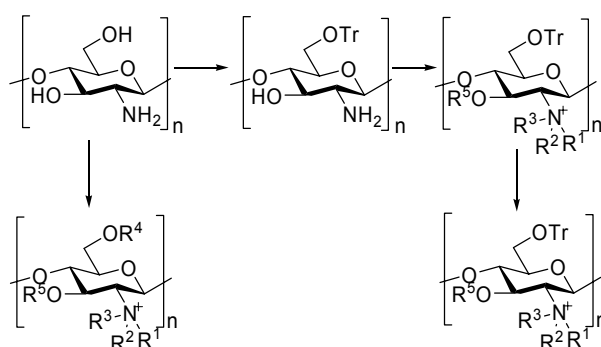


Schéma 1. Příprava Schiffových a kvarterních bází



R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, CH₃
 Tr = C(C₆H₅)₃

Schéma 2. N-methylace oligochitosanu a chitosanu

hmotností se akumuluje uvnitř buňky, což ukazuje na to, že *E. coli* metabolizuje tento chitosan jako potravu.

Další důležitou podmínkou je pH. Antimikrobiální účinnost chitosanu vzrůstá s klesajícím pH^{19,20}. Je-li pH < 6,5, dochází k ionizaci za vzniku pozitivně nabitě části. Nemodifikovaný chitosan je při pH 7 nerozpustný a antibakteriálně neúčinný^{19,21}, proto je velká pozornost směřována na přípravu jeho rozpustných solí. Rozpustnost se zvyšuje jak kvarternizací^{9,22}, tak hydrofilní substitucí, např. u (2-hydroxypropyl)chitosanu²³, N-(karboxybutyl)chitosanu²⁴, (karboxymethyl)chitosanu^{25,26} a sulfatovaného chitosanu^{27,28}, která navíc zvyšuje antibakteriální vlastnosti. Pro tento efekt se také syntetizují deriváty chitosanu větvené na uhlíku C6 monomerní jednotky²⁹.

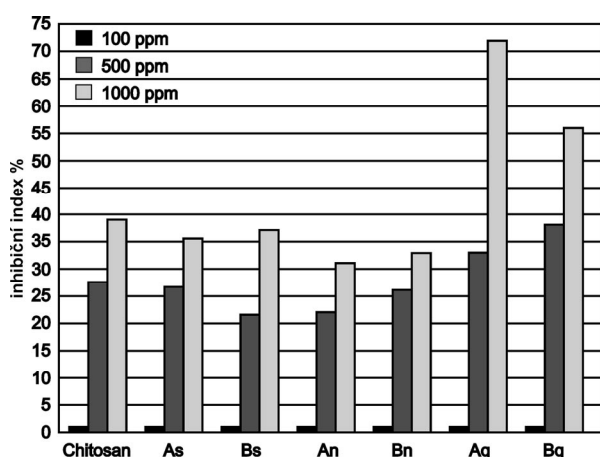
Kvarternizace dusíku aminoskupiny patří k nejčastějším modifikacím. Volná aminoskupina byla kondenzována s benzaldehydem (A) a salicylaldehydem (B) za vzniku Schiffových bází, které byly dále redukovány tetrahydridoboritanem sodným a v posledním stupni kvarternizovány

methyljodidem (schéma 1). U všech produktů byla sledována antifungální účinnost. Nejúčinnější byly právě kvarterní báze³⁰ (viz obr. 4).

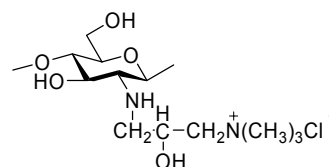
Methylace chitosanu vedla k syntéze N,N,N-trimethylchitosanu (schéma 2). Postupně byly methylovány vedle aminoskupin také hydroxyskupiny chitosanu a jeho oligomerů a sledována jejich antibakteriální účinnost vůči *Staphylococcus aureus* při pH 5,5 a 7,2. Oligomery chitosanu se ukázaly jako neaktivní, zatímco methylované deriváty chitosanu vykazovaly jistou účinnost. Kvarternizace je potřebná pro účinnost při pH 7,2. Náboj kvarterní amoniové skupiny chitosanu umožňuje jeho rozpustnost v dolních částech gastrointestinálního traktu za neutrálních nebo alkalických podmínek³¹. Vedle N-methylovaných kvarterních amoniových solí byl připraven i analogický N-ethyl-derivát, který se používá jako perorální nosič³².

Kvarternizaci lze zavést do chitosanu substituent s aminoskupinou, jako je např. při přípravě (2-hydroxypropyl)trimethylamoniového derivátu (obr. 5) reakcí chitosanu s glycidyltrimethylammonium-chloridem³³, který vykázal antioxidační a biocidní účinnost proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, a *Candida albicans*.

Hydrochlorid (ethylamino)-2-(hydroxyethyl)chitosanu byl nejprve hydroxyetylován na primární hydroxyskupině a poté alkylován (2-chlorethyl)amin-hydrochloridem (schéma 3, cit.³⁴). Vznikl ve vodě lépe rozpustný, antibakteriálně účinný derivát proti *Escherichia coli*.



Obr. 4. Antifungální účinnost proti *Colletotrichum lagenarium*; As, Bs – Schiffovy báze; An, Bn – redukované formy; Aq, Bq – kvarterní báze



Obr. 5. Modifikovaný chitosan

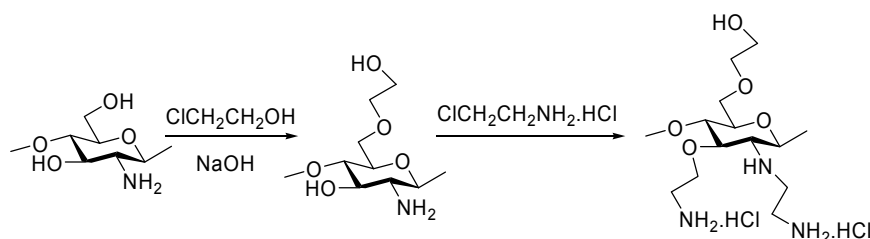


Schéma 3. Syntéza ethylamino(hydroxyethyl)chitosanu

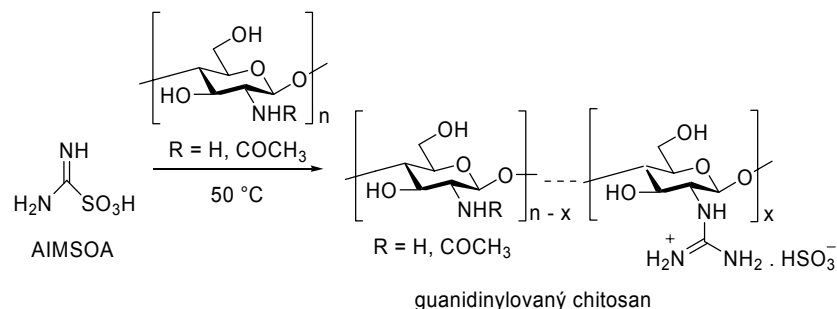


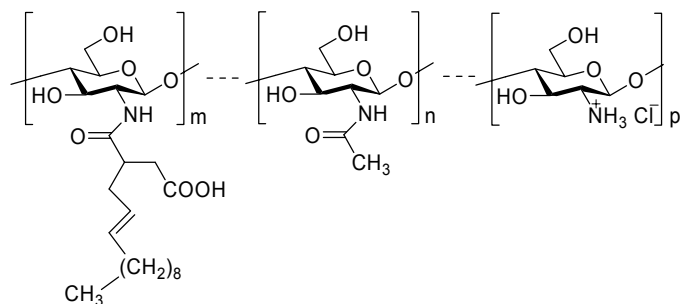
Schéma 4. Guanidinylace chitosanu

Poly(1-vinylimidazol) je znám jako ve vodě dobře rozpustný antibakteriálně účinný polymer³⁵. Byl připraven reakcí s chitosanem ve zředěné kyselině octové působením iontů ceru. Kombinace těchto sloučenin vedla k účinnosti proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Protonace vinylimidazolových jednotek zvyšuje rozpustnost ve vodě³⁶.

Guanidinylace chitosanu o různých molekulových hmotnostech vedla ke zvýšení počtu aminoskupin v molekule. Byla provedena aminoiminomethansulfonovou kyselinou (schéma 4). Tyto deriváty vykazaly čtyřikrát nižší hodnoty MIC než samotný chitosan. Zvýšená aktivita je způsobena vyšší hustotou pozitivního náboje guanidinových derivátů, které snadněji asociují na negativním povrchu buněk a vykazují vyšší antibakteriální účinnost proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*³⁷.

Cílení do jaterních buněk vedlo k syntéze galaktosylovaného chitosanu s vysokou afinitou k HepG2 (buněčná linie rakovinných jaterních buněk). Po zavedení lysinového spojovacího článku na chitosan následovalo kovalentní spojení 4-*O*-β-D-galaktopyranosyl-D-glukonové kyseliny s více vaznými galaktosovými jednotkami. β-D-Galaktosové jednotky jsou významné právě pro cílenou dopravu do jaterních buněk³⁸. Tyto glykokonjugátové molekuly vykazaly aktivitu vůči *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

N-Alkylace chitosanu disacharidy vedla ke zvýšení antibakteriální účinnosti proti *E. coli* a *S. aureus*. Typ disacharidu spojeného s molekulou chitosanu, stupeň substituce disacharidu a pH ovlivňovalo antibakteriální účinnost. Maltosové deriváty chitosanu (stupeň deacetylce chitinu 30–40 %) vykazaly nejvyšší antibakteriální účinnost proti *S. aureus*, zatímco proti *E. coli* byly nejúčinnější cello-

Obr. 6. Příprava nízkomolekulárních *N*-[2-(dodec-2-en-1-yl)sukcinoyl]chitosanů

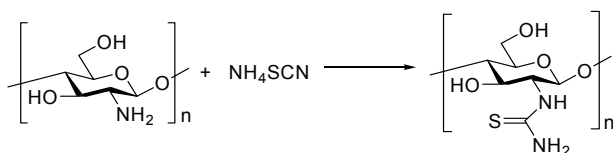


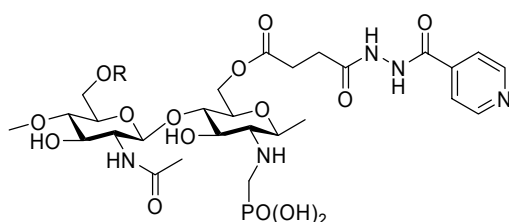
Schéma 5. Thiomočovínový derivát chitosanu

biosové deriváty (stupeň deacetylce chitinu 30–40 %). *N*-Alkylované disacharidové deriváty chitosanu vykázaly vyšší aktivitu než samotný chitosan při pH 7,0 (cit.³⁹).

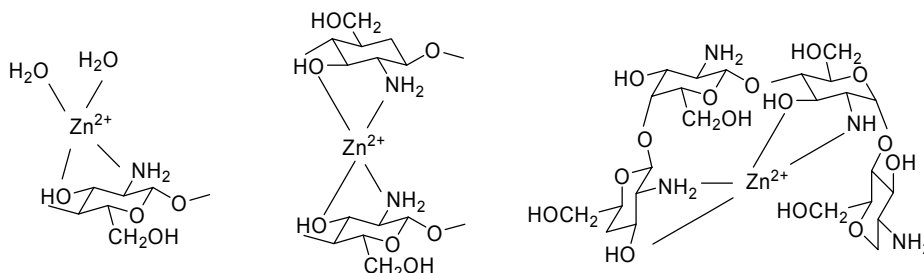
Dále byla připravena série nízkomolekulárních *N*-[2-(dodec-2-en-1-yl)sukcinoyl]chitosanů reakcí chitosanu (4,6 kDa), s 2-(dodec-2-en-1-yl)sukcinanhydridem (obr. 6). Tyto deriváty s dlouhým alifatickým řetězcem a různým stupněm *N*-substituce jsou účinné proti *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Candida kruisei* a *Fusarium oxysporum*⁴⁰.

Antibakteriální vlastnosti chitosanu mohou významně zvýšit stříbrné ionty, až o 98 % (cit.²⁰). Samotné stříbro a jeho ionty jsou známy svou antibakteriální účinností⁴¹. Proto byly připraveny komplexy thiomočovínového chitosanu připraveného reakcí chitosanu s thiokyanátem amonným v ethanolu (schéma 5). Je zajímavé, že se stříbrem koordinuje svými volnými elektrony síra, nikoliv dusík. Tyto komplexy vykázaly široké spektrum antimikrobiální účinnosti. Minimální inhibiční koncentrace byly 20× nižší než u samotného chitosanu, komplex měl vyšší antibakteriální než antifungální účinnost⁴².

Mnoho výzkumů se zabývá kombinací chitosanu a jiného antibakteriálního činidla. Např. konjugáty s tetra-



Obr. 7. Chitosan-isoniazid-hemisukcinát



Obr. 8. Struktury zinečnatých komplexů

cyklinem a karminomycinem si plně zachovaly antibakteriální účinnost⁴³. Tablety nebo tobolky metronidazolu se používají k léčbě *Helicobacter pylori*. Pro lepší uvolňování z žaludku byl zabudován do chitosanových tobolek⁴⁴.

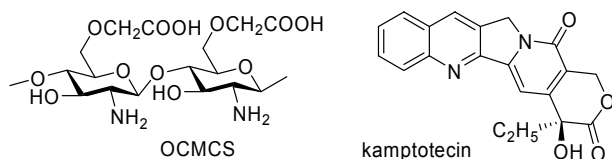
Chitosan byl použit k syntéze polymerního proléčiva isoniazidu (INH), důležitého antituberkulotika, pro prodloužení doby působení. Díky své rozpustnosti ve vodě se může podávat intravenózně. Kondenzace s INH vyžadovala dvoustupňovou syntézu. Nejprve byla provedena funkcionalizace chitosanu kyselinou fosforitou a částečná formylace volných aminoskupin. Isoniazid byl substituován sukcinanhydridem na sukcinyl isoniazid, který pak reakcí s chitosanem poskytl chitosan-isoniazid-hemisukcinát (obr. 7, cit.⁴⁵).

Monomerní alginát sodný byl pospojován chloridem vápenatým a poté pokryt chitosanem. Tento materiál se používá k léčbě ran i popálenin. Použití chitosanu při léčbě ran podporuje růst fibroblastů a působí na aktivitu makrofágů, což urychluje léčebný proces⁴⁶. Z dalších léčiv, která byla navázána na tento komplex, lze jmenovat ciprofloxacin⁴⁶, norfloxacin⁴⁷ a gatifloxacin⁴⁸.

Pokud chitosan reaguje s roztokem chloridu zinečnatého, vytváří cheláty s aminoskupinami různým způsobem (obr. 8). Tyto komplexy vykazují široké spektrum antimikrobiální účinnosti, jsou 2–8 krát účinnější než chitosan⁴⁹.

3.2. Protinádorová aktivita

Protinádorová účinnost chitosanu závisí na jeho molekulové hmotnosti, rozpustnosti a obsahu acetylových skupin. Vysokomolekulární chitosan je neúčinný, proto je třeba připravit chitosan o nižší molekulové hmotnosti. Ke štěpení polymerů chitosanu jsou nejčastěji používány přirozené enzymy chitosanasy a chitinasy³. Pro hydrolyzu lze využít i několika dalších levnějších hydrolytických enzymů, např. lysozymu⁵⁰, pektinasy⁵¹, hemicellulasy⁵² a papainu⁵³. Pro přípravu chitosanu rozpustného ve vodě byl použit také *Bacillus amyloliquefaciens* V656 obsahující chitinasu⁵⁴. Získané hexamery vykázaly protinádorovou aktivitu, inhibovaly růst buněk adenokarcinomu CT26 u myši a indukovaly apoptózu. Hydrolyzáty indukují charakteristickou DNA fragmentaci buněk CT26. Po částečné hydrolyze *N*-acetylovaného chitosanu cellulásou⁵⁵ se změnila krystalová struktura, termostabilita a zvýšila se rozpustnost ve vodě bez změny chemické struktury. Částečně



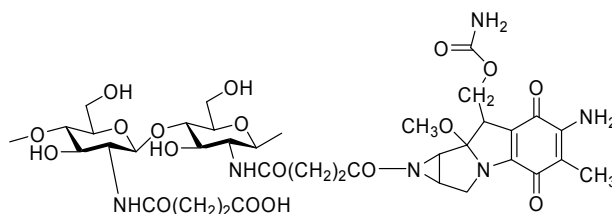
Obr. 9. Chitosan-kamptotecin

acetylovaný nízkomolekulární chitosan, hexamery a heptamery chitosanu a chito oligosacharidy vykazují protinádorovou účinnost u sarkomu 180 po intraperitoneálním a perorálním podání. Hlavním cílem výzkumu v této oblasti je objasnění vlastností nízkomolekulárních chitosanů, jejich působení na inhibici angiogeneze a indukce apoptózy u Erichova ascitického tumoru u myši. Po intraperitoneální injekci buňky tohoto nádoru ztrácejí v důsledku indukce apoptózy až 90 % kapalně fáze⁵⁶.

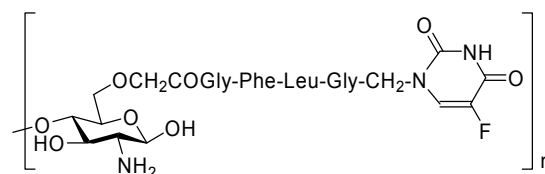
Na buněčné linii 293 a HeLa byly testovány různé poměry chitosanu a pentahydrátu síranu měďnatého (1:1.56, 1:0.8, a 1:0.4). Měďnatý komplex interaguje s DNA, což způsobí rozštěpení DNA a protinádorovou účinnost. Chelatace měďnatých iontů vede k zesílení pozitivního náboje na aminoskupině chitosanu. Komplex inhibuje rozmnožování buněk v S fázi růstového cyklu obou linií. K buňkám linie 293 byl komplex selektivnější než k buňkám HeLa; na normální plicní buněčné linii HLF nepůsobí. Nejvyšší aktivitu vykázal při poměru 1:0,4. Účinnost tedy závisí na koncentraci iontů v komplexu⁵⁷.

Chitosan se používá především jako nosič protinádorové látky na místo účinku. Kamptotecin je alkaloid a protirakovinné léčivo. Je velmi účinný při léčbě nádoru žaludku, tlustého střeva a močového měchýře, jeho nevýhodou je špatná rozpustnost a toxicita. Kamptotecinové alkaloidy blokují topoisomerasu I, enzym důležitý pro replikaci DNA. Při inhibici topoisomerasy I je zablokováno rozpletení dvojitého vlákna DNA a řetězec DNA se rozpadá. Agregací s *O*-(karboxymethyl)chitosanem (OCMCS) byl připraven biokompatibilní a amfifilní systém pro řízené uvolňování látky v cílové tkáni, (obr. 9, cit.⁵⁸).

Dalším známým léčivem proti leukemii P388, leukemii L1210 a melanomu B16 je mitomycin C. Poškozuje DNA způsobem podobným alkylačním cytostatikům. Jako nosič byl použit *N*-sukcinylochitosan, který je netoxický při koncentraci 2 g kg⁻¹ i.p. a protinádorově neaktivní. Reakcí *N*-sukcinylochitosanu a mitomycinu C za použití vodního karbodiimidu byl připraven konjugát, který není nutné podávat i.p. (obr. 10, cit.^{59,60}).

Obr. 10. Konjugát *N*-sukcinylochitosanu a mitomycinu C

5-Fluoruracil (5FU) patří do skupiny antimetabolitů, který je používán již řadu let. Má však nepříjemné vedlejší účinky. Pro jejich snížení za zachování protinádorové aktivity byl navázán na chitosan přes hexamethylenový můstek a močovinný zbytek. Konjugát chitosan/močovina/C6/močovina/5FU a chitosan-oligosacharid/močovina/C6/močovina/5FU konjugát vykazovaly silnou inhibiční aktivitu vůči Meth-A fibrosarkomu a MH-134Y hepatomu. Ve vodě rozpustné makromolekuly se do buňky dostávají endocytózou a fagocytózou. Nádorové buňky přijímají více těchto makromolekul. V lysosomech nádorových buněk je přítomno zvýšené množství lysosomové proteasy – kathepsinu B. Bylo zjištěno, že tetrapeptidový spojovací článek Gly-Phe-Leu-Gly umožňuje specifické uvolňování léčiva v lysosomech tímto enzymem, a proto byl 5FU konjugován s částečně acetylovaným *O*-(methoxykarbonyl)chitosanem (obr. 11, cit.⁶¹).

Obr. 11. Konjugát *O*-(karboxymethyl)chitosanu a Gly-Phe-Leu-Gly-5-fluoruracilu

Doxorubicin je antracyklinové protinádorové antibiotikum s širokým spektrem protinádorové aktivity. Působí blokádu enzymu topoisomerasy II, který se podílí na změnách v prostorovém uspořádání DNA při její replikaci před dělením buňky. Při bloádě topoisomerasy II se nespojují jednotlivé části DNA a ta se rozpadá. Pro velmi silné vedlejší účinky (kardiotoxicita), nízkou stabilitu a špatnou rozpustnost ve vodě byl připraven jako několikvrstvé mikrotobolky obsahující chitosan a alginát vázané na (karboxymethyl)celulose dotované koloidními částicemi uhličitanu vápenatého⁶². Enkapsulace léčiva efektivně indukuje apoptózu HepG2 nádorových buněk.

3.3. Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují nebo brání oxidaci oxidovatelných buněčných substrátů. Zachytávají radikály a ROS (reaktivní kyslíkové species) obsahující reaktivní kyslíkové atomy, zahrnující hydroxylový radikál •OH, superoxidový radikál •O₂⁻ a peroxid vodíku H₂O₂. Tyto radikály jsou velmi nestabilní a reagují rychle s jinými látkami v těle, což vede k poškození buněk a tkání. Antioxidanty působí proti tvorbě volných radikálů a ROS nebo aktivují celou řadu detoxikujících proteinů.

V posledních letech je věnována velká pozornost také antioxidační účinnosti chitosanu. Tato účinnost rovněž závisí na velikosti molekuly a stupni acetylace^{63–65}. Nízkomolekulární, částečně *N*-acetylovaný chitosan rozpustný ve vodě je možné považovat za přírodní antioxidant. I když přesný mechanismus jeho antioxidační účinnosti

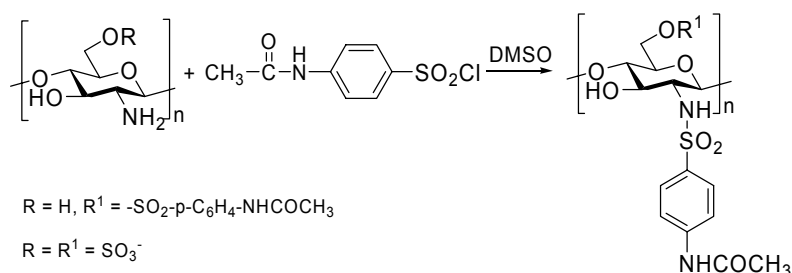


Schéma 6. Sulfatované deriváty chitosanu o molekulové hmotnosti 4000 Da a 20 000 Da

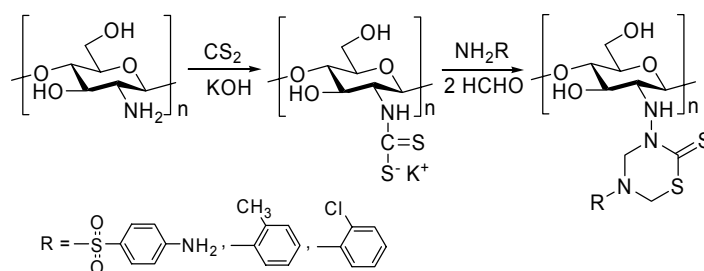


Schéma 7. Příprava 1,3,5-thiadiazin-2-thionových derivátů chitosanu

není znám, předpokládá se, že amino a hydroxyskupiny vázané na C-2, C-3 a C-6 pyranosového cyklu reagují s radikály za tvorby stabilnějších polymerních radikálů. Účinnost pravděpodobně souvisí s chelatačními vlastnostmi chitosanu, které vedou ke zpomalení oxidace lipidů⁶⁶. Chitosan inhibuje peroxidaci linolenové kyseliny, vykazuje vysokou aktivitu vůči hydroxylovým radikálům (83,7 %, cit.⁶⁷).

Xing a spol.⁶⁸ publikovali antioxidační aktivitu různých druhů sulfatovaných chitosanů při reakci s radikály. Byly připraveny sulfáty a sulfanilamidové deriváty chitosanu o různých molekulových hmotnostech (schéma 6). Výsledky ukázaly, že zavedení sulfanilamidové skupiny zvyšuje nejenom rozpustnost, ale i antioxidační aktivitu⁶⁹.

Glutathion jako známý přírodní antioxidační peptid obsahující síru inspiroval přípravu celé řady sirných obměn. Do chitosanu byly zavedeny 1,3,5-thiadiazin-2-

-thionové deriváty obsahující dva typy síry s potenciální antioxidační aktivitou⁷⁰ (schéma 7).

Eugenol (4-allyl-2-methoxy-fenol) byl zabudován do molekuly chitosanu (schéma 8), aby zvýšil jeho antioxidační účinnost svými fenolickými hydroxyskupinami. Zavedením objemného substituentu se snížila citlivost na pH a zvýšila se inhibice iniciace a propagace oxidačních řetězových reakcí⁷¹.

Částečně kvarternizované deriváty chitosanu s kyselinou gallovou vykazovaly účinnost proti superoxidům⁷². Superoxidový anion $\cdot O_2^-$ vzniká téměř ve všech buňkách a je hlavní příčinou toxicity kyslíku. V porovnání s ostatními kyslíkovými radikály má superoxidový radikál dlouhou životnost a je tedy mnohem nebezpečnější.

Stejně jako u antibakteriálně účinných derivátů chitosanu byla kvůli zvýšení antioxidační účinnosti aminoskupina chitosanu alkylována ethylem, 2-(dimethylamino)

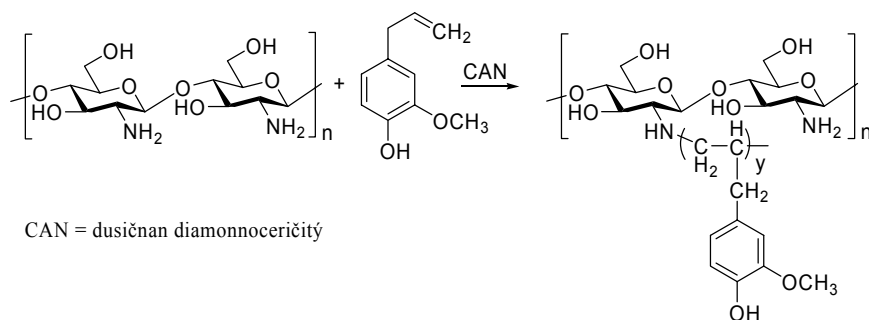


Schéma 8. Eugenolový polymer chitosanu

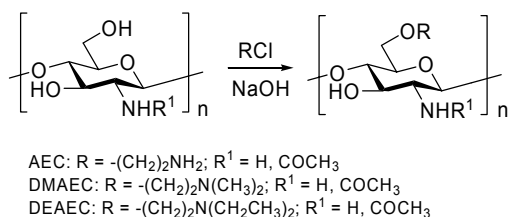


Schéma 9. Alkylace chitosanu

ethylem a 2-(diethylamino)ethylem⁷³. Antioxidační účinnost závisí na stupni deacetylce chitinu a typu substituce. Nejúčinnější lapač ROS volných radikálů se ukázal AEC90, což je 90% deacetylovaný *N*-aminoethylovaný chitosan mající nejvyšší procento volných aminoskupin (schéma 9).

5-Chlor-2-hydroxybenzaldehyd a 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyd byly použity pro přípravu Schiffových bází s aminoskupinami chitosanu a (karboxymethyl)chitosanu (schéma 10, cit.⁷⁴). Přestože byla do molekuly vnesena fenolická hydroxyskupina, antioxidační účinnost vůči superoxidovému a hydroxylovému radikálu se nezvýšila. Z toho vyplývá, že pro tuto účinnost je nezbytná především volná aminoskupina, i když hydroxyskupiny u předchozích derivátů působily stimulačně.

4. Závěr

Chitosan vykazuje celou řadu biologických aktivit. Podle narůstajícího počtu publikací v posledních letech lze usuzovat, že jde o velice perspektivní polykationtový polysacharid s širokým potenciálem využití v nejrůznějších aplikacích. V oblasti farmacie je jeho budoucnost především v roli biodegradabilního nosiče léčiv různých farmakologických skupin s možností jejich modifikace pro cílovou tkáň, odstranění některých nežádoucích vlastností léčiva a zvýšení biodostupnosti léčiva.

Tato práce byla podpořena projekty MSM 0021620822 a GAUK 76807/2007.

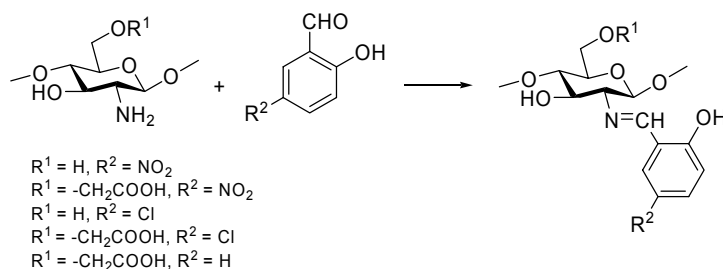


Schéma 10. Příprava Schiffových bází

LITERATURA

1. Tokuyasu K., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 60, 1598 (1996).
2. Hu K. J., Hu J. L., Ho K. P., Yeung K. W.: *Carbohydr. Polym.* 58, 45 (2004).
3. Uraganu T., Tokata S. (ed.): *Material Science of Chitin and Chitosan*. Springer, New York 2006.
4. Vinšová J., Vavříková E.: *Chem. Listy* 101, 978 (2007).
5. Koide S. S.: *Nutr. Res. (N. Y.)* 18, 1091 (1998).
6. Clark G. L., Smith A. F.: *J. Phys. Chem.* 40, 863 (1937).
7. Okuyama K., Noguchi K., Miyazawa T., Yui T., Ogawa K.: *Macromolecules* 30, 5849 (1997).
8. Yui T., Imada K., Okuyama K., Obata Y., Suzuki K., Ogawa K.: *Macromolecules* 27, 7601 (1994).
9. Chun H. K., Jang W. C., Heung J. C., Kyu S. C.: *Polym. Bull.* 38, 387 (1997).
10. Fernandez-Saizn P., Ocio M. J., Lagaron J. M.: *Biopolymers* 83, 577 (2006).
11. Tsai G. J., Su W. H.: *J. Food Prot.* 62, 239 (1999).
12. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L.: *Int. J. Food Microbiol.* 95, 147 (2004).
13. Chen Y. L., Chou C. C.: *Food Microbiol.* 22, 29 (2005).
14. Helander I. M., Nurmiäho-Lassila E. L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller, S.: *Int. J. Food Microbiol.* 71, 235 (2001).
15. Zheng L. Y., Zhu J. F.: *Carbohydr. Polym.* 54, 527 (2003).
16. Jia G., Wang H. L., Wu J. C. G., Lin J. G.: *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 932 (2004).
17. Liu N., Chen X. G., Park H. J., Liu C. G., Liu C. S., Meng X. H., Yu L. J.: *Carbohydr. Polym.* 64, 60 (2006).
18. Tokura S., Ueno K.: *Macromol. Symp.* 120, 1 (1997).
19. Yang T. C., Chou C. C., Li C. F.: *Int. J. Food Microbiol.* 97, 237 (2005).
20. No H. K., Park N. Y., Lee S. H., Meyers S. P.: *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65 (2002).
21. Chung Y. C., Kuo C. L., Chen C. C.: *Bioresour. Technol.* 96, 1473 (2005).

22. Jia Z., Shen D., Xu W. *Carbohydr. Res.* 333, 1 (2001).
23. Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q.: *Carbohydr. Polym.* 50, 35 (2002).
24. Muzzarelli R., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2019 (1990).
25. Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., Yao K. D.: *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324 (2001).
26. Wang L. C., Chen X. G., Zhoní D. Y., Xu Q. C.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18, 1125 (2007).
27. Jayakumar R., Nwe N., Tokura S., Tamura H.: *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 175 (2007).
28. Huang R., Du Y., Zheng L., Liu H., Fan L.: *React. Funct. Polym.* 59, 41 (2004).
29. Kurita K., Kojima T., Nishiyama Y., Shimojoh M.: *Macromolecules* 33, 4711 (2000).
30. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P.: *Carbohydr. Res.* 342, 1329 (2007).
31. Runarsson O. V., Holappa J., Nevalainen T., Hjalmarsson M., Jarvinen T., Loftsson T., Einarsson J. M., Jonsdottir J., Valdimarsdottir M., Massona M.: *Eur. Polym. J.* 43, 2660 (2007).
32. Avadi M. R., Sadeghi A. M. M., Tahzibi A., Bayati Kh., Pouladzadeh M., Zohuriaan-Mehr M. J., Rafiee-Tehrani M.: *Eur. Polym. J.* 40, 1355 (2004).
33. Chi W., Qin C., Zeng L., Li W., Wang W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 103, 3851 (2007).
34. Xie Y., Liu X., Chen Q.: *Carbohydr. Polym.* 69, 142 (2007).
35. Saravanan S., Selvan P. S., Gopal N., Gupta J. K., De B.: *Arch. Pharm.* 338, 488 (2005).
36. Caner H., Yilmaz E., Yilmaz O.: *Carbohydr. Polym.* 69, 318 (2007).
37. Hu Y., Du Y., Yang J., Kennedy J. F., Wang X., Wang L.: *Carbohydr. Polym.* 67, 66 (2007).
38. Mi F. L., Yu S. H., Peng C. K., Sung H. W., Shyu S. S., Liang H. F., Huang M. F., Wang C. C.: *Polymer* 47, 4348 (2006).
39. Yang T. C., Chou C. C., Li C. F.: *Int. J. Food Microbiol.* 97, 237 (2005).
40. Tikhonov V. E., Stepnova E. A., Babak V. G., Yamskov I. A., Palma-Guerrero J., Jansson H. B., Lopez-Llorca L. V., Salinas J., Gerasimenko D. V., Avdienko I. D., Varlamov V. P.: *Carbohydr. Polym.* 64, 66 (2006).
41. Kang H. Y., Jung M. J., Jeong Y. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 521 (2000).
42. Chen S., Wu G., Zeng H.: *Carbohydr. Polym.* 60, 33 (2005).
43. Krysteva M., Todorova N. P., Maneva K., Todorov D., Dimnitrov C.: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 14, 178 (1999).
44. Ishak R. A. H., Awad G. A. S., Mortada N. D., Nour S. A. K.: *J. Controlled Release* 119, 207 (2007).
45. Rando D. G., Brandt C. A., Ferreira E. I.: *Braz. J. Pharm. Sci.* 40, 335 (2004).
46. Ozturk E., Agalar C., Kececi K., Denkbaz E. B.: *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 1602 (2006).
47. Denkbaz E. B., Ozturk E., Ozdemir N., Kececi K., Agalar C.: *J. Biomater. Appl.* 18, 291 (2004).
48. Zhu A., Jin W., Juan L., Yang G., Yu H., Wu H.: *Carbohydr. Polym.* 68, 693 (2007).
49. Wang X., Du Y., Liu H.: *Carbohydr. Polym.* 56, 21 (2004).
50. Varum K. M., Holme H. K., Izume M., Stokke B. T., Smidsrod X.: *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 5 (1996).
51. Shin-ya Y., Lee M. Y., Hinode H., Kajiuchi T.: *Biochem. Eng. J.* 7, 85 (2001).
52. Qin C., Du Y., Xiao L., Li Z., Gao X.: *Int. J. Biol. Macromol.* 31, 111 (2002).
53. Pantaleone D., Yalpani M., Scollar M.: *Carbohydr. Res.* 237, 325 (1992).
54. Liang T. W., Chen Y. J., Yen Y. H., Wang S. L.: *Process Biochem.* 42, 527 (2007).
55. Qin C., Zhou B., Zeng L., Zhang Z., Liu Y., Du Y., Xiao L.: *Food Chem.* 84, 107 (2004).
56. Prashanth K. V. H., Tharanathan R. N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1722, 22 (2005).
57. Zheng Y., Yi Y., Qi Y., Wang Y., Zhang W., Du M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4127 (2006).
58. Aiping Z., Jianhong L., Wenhui Y.: *Carbohydr. Polym.* 63, 89 (2006).
59. Song Y., Onishi H., Machida Y., Nagai T.: *J. Controlled Release* 42, 93 (1996).
60. Song Y., Onishi H., Nagai T.: *Int. J. Pharm.* 98, 121 (1998).
61. Ouch T., Tada M., Ohya Y., Hasegawa K., Arai Y., Kadowaki K., Akao S., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M.: *React. Funct. Polym.* 37, 235 (1998).
62. Zhao Q., Han B., Wang Z., Gao C., Peng C., Shen J.: *Nanomedicine NBM* 3, 63 (2007).
63. Kim K. W., Thomas R. L.: *Food Sci.* 101, 308 (2007).
64. Chien P. J., Sheu F., Juany W. T., Su M. S.: *Food Chem.* 102, 1192 (2007).
65. Koryagin A. S., Erofeeva E. A., Yakimovich N. O., Aleksandrova E. A., Smirnova L. A., Malkov A. V.: *Pharmacol. Toxicol.* 142, 444 (2006).
66. Peng C., Wang Y., Tang Y.: *J. Appl. Polym. Sci.* 70, 501 (1998).
67. Feng T., Du Y., Wei Y., Yao P.: *Eur. Food Res. Technol.* 225, 133 (2007).
68. Xing R. E., Yu H. H., Liu S., Zhang W. W., Zhang Q. B., Li Z. E., Li P. C.: *Bioorg. Med. Chem.* 13, 1387 (2005).
69. Zhong Z., Ji X., Xing R., Liu S., Guo Z., Chen X., Li P.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3775 (2007).
70. Ji X., Zhong Z., Chen X., Xing R., Liu S., Wang L., Li P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4275 (2007).
71. Jung B. O., Chung S. J., Lee S. B.: *J. Appl. Polym. Sci.* 99, 3500 (2006).
72. Sun T., Xie W., Xu P.: *Carbohydr. Polym.* 58, 379 (2004).
73. Je J. Y., Kim S. K.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5989 (2006).
74. Guo Z., Xing R., Liu S., Yu H., Wang P., Li C., Li P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 4600 (2005).

E. Vavříková and J. Vinšová (*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Chitosan and Its Pharmaceutical Applications**

Chitosan is a prospective cationic polysaccharide which shows a number of functions in many fields, including biomedical, pharmaceutical, preservation, microbial

and others. In this review, we have summarized three main areas of its biomedical applications due to its antimicrobial, anticancer, and antioxidant effects. The applications are influenced by a number of factors such as its polymerization degree, the degree of chitin deacetylation and some other physicochemical properties. The biodegradable, non-toxic and non-allergenic nature of chitosan suggests its use as a carrier in drug delivery systems.

ADIPOCYTOKINY – NEDÁVNO OBJEVENÉ HORMONY TUKOVÉ

TKÁNĚ

VOJTĚCH ŠKOP^a, KATEŘINA KONTROVÁ^a,
JARMILA ZÍDKOVÁ^a a VÁCLAV ZÍDEK^b^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, Praha 6, ^b Fysiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, Praha 4 Krč
vojtech.skop@vscht.cz

Došlo 24.6.08, přijato 10.9.08.

Klíčová slova: adipocytokiny, adipokiny, obezita, tuková tkáň, inzulin, diabetes, inzulinová rezistence, glukosa

Obsah

1. Úvod
2. Popis a funkce jednotlivých adipocytokinů
 - 2.1. Adipocytokiny potlačující působení inzulinu
 - 2.2. Adipocytokiny podporující působení inzulinu
 - 2.3. Ostatní adipocytokiny
3. Závěr

1. Úvod

Tuková tkáň byla po dlouhá staletí stranou zájmu vědců i lékařů, byla považována za pouhé úložiště zásobních látek. Ale nárůst obezity a problémů, které s ní souvisí, za posledních 30 let vedl k vytvoření představy o negativním působení této tkáně jak u vědecké, tak laické veřejnosti. Z tohoto důvodu přišla v posledních dvou desetiletích vlna intenzivního vědeckého zájmu o tyto buněčné typy podporovaná jednak narůstajícím množstvím obézních jedinců a také poznáním, že adipocyty se účastní velkého množství regulačních a homeostatických pochodů. Mezi tyto pochody patří regulace množství tuku a energetické rovnováhy, imunitní odpověď, kontrola krevního tlaku, hemostáza a reprodukční funkce. Tyto procesy jsou regulovány převážně sekrecí tkáňových hormonů z adipocytů a ostatních buněk tukové tkáně, které byly souhrnně nazvány adipocytokiny nebo adipokiny. Působení adipocytokinů je autokrinní, parakrinní i endokrinní a zjednodušeně se dají rozdělit na ty, které podporují působení inzulinu a na ty, které ho potlačují¹.

Nepříznivý vliv abdominální obezity na metabolismus je zprostředkovan mimo jiné právě změnami v produkci adipocytokinů, ke kterým dochází při výrazném rozvoji obezity². Nedávno popsané tkáňové hormony sekretované

adipocyty přispívají ke zhoršené produkci inzulinu, inzulinové rezistenci a endotheliálním dysfunkcím. Způsobují zánětlivé stavy a podporují rozvoj aterosklerózy^{3,4}.

2. Popis a funkce jednotlivých adipocytokinů

2.1. Adipocytokiny potlačující činnost inzulinu

Faktor nekrotizující nádory – α

Faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis faktor – α , TNF- α) je známý více jako prozánětlivý cytokin produkovaný buňkami imunitního systému. Spojení mezi obezitou a expresí prozánětlivých cytokinů bylo poprvé zmíněno před 17 lety. Tato studie předložila názor, že obezita je provázána zánětem a zároveň byla prokázána produkce TNF- α adipocyty a jeho schopnost regulovat působení inzulinu^{1,5}. Pozdější práce poukázaly na klíčovou roli TNF- α při rozvoji inzulinové rezistence⁶ a jeho zvýšenou krevní hladinu při obezitě vlivem vyšší produkce adipocytů⁷.

TNF- α indukuje fosforylaci substrátu inzulinového receptoru 1 a 2 (IRS-1 a 2) na serinu (Ser) a threoninu (Thr). To brání interakci IRS-1 a 2 s inzulinovým receptorem a fosforylaci na tyrosinu (Tyr) zprostředkované inzulinem⁸. Zároveň způsobuje pokles aktivity lipoproteinlipasy a zvýšení aktivity hormon sensitive lipasy. Následkem je zvýšené uvolňování volných mastných kyselin do oběhu a snížená akumulace lipidů³.

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) byl mezi prvními faktory, které byly spojované s rozvojem inzulinové rezistence a kardiovaskulárními chorobami⁵.

Je významnou měrou sekretován v útrobním tuku⁹, kde je jeho sekrece asi třikrát větší než v podkožním tuku. Patří mezi významné prozánětlivé cytokiny a podílí se na rozvoji jaterní inzulinové rezistence¹⁰. Jeho množství je zvýšené u obézních jedinců a u pacientů s diabetem 2. typu. Na druhou stranu IL-6 za určitých podmínek může podporovat energetickou výměnu a citlivost k inzulinu. Jeho negativní působení na metabolismus zatím zůstává sporné¹¹.

Interleukin-1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) patří mezi cytokiny se silně prozánětlivým účinkem¹² a v tukové tkáni je nejvíce produkovan makrofágy, které jsou zde trvale usídlené. Produkce je vyšší v útrobní tukové tkáni ve srovnání s podkožní. Nedávné studie prokázaly, že exprese IL-1 β v tukové tkáni vzroste při obezitě u hlodavců i u lidí. U lidí s vyšší krevní hladinou IL-1 β spolu se zvýšeným IL-6 bylo popsáno zvýšené nebezpečí diabetu 2. typu.

IL-1 β snižuje expresi IRS-1 na úrovni transkripce a tím porušuje signální dráhu inzulinu. Podílí se tak s ostatními faktory na rozvoji inzulinové rezistence¹³.

Chemotaktický protein monocytů-1

Chemotaktický protein monocytů-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) patří mezi chemokiny do rodiny malých indukovaných cytokinů. Hraje velice významnou roli v přestupu monocytů a T-lymfocytů do tkání. Je exprimován v adipocytech a dalších buněčných typech včetně hladkého svalstva a endothelu, pokud dojde k zánětlivému stimulu.

U obézních hlodavců dochází k jeho zvýšené expresi. Pacienti s diabetem mají prokazatelně vyšší hladiny MCP-1 v plasmě. Samotný MCP-1 je schopen narušovat signální dráhu inzulinu v kosterním svalstvu i při běžných fyziologických koncentracích. Tyto nové poznatky napovídají, že MCP-1 má kromě zánětlivé odpovědi další významnou funkci v komunikaci mezi tukovou a svalovou tkání. Může se tak podílet na rozvoji inzulinové rezistence¹⁴.

Rezistin

Tento adipocytokin byl identifikován v roce 2000 třemi nezávislými pracovišti. Počáteční studie ukazovaly zvýšenou hladinu rezistinu u obézních hlodavců, snížení hladiny vlivem antidiabetických léků a redukci hyperglykemie imunoneutralizací rezistinu.

Rezistin se skládá ze 114 aminokyselin. Sekretován je jako homodimer, ve kterém jsou podjednotky spojeny disulfidovými můstky. V krevním oběhu se vyskytuje ve dvou formách, hexamerní a trimerní, která je více bioaktivní a tvoří disulfidové vazby. Pravděpodobně se štěpení disulfidových vazeb využívá k aktivaci.

U myši byl popsán vliv vyšší koncentrace rezistinu na snížení příjmu glukosy do buněk. K této změně došlo jiným mechanismem, než ovlivněním signálu inzulinového receptoru, pravděpodobně snížením aktivity glukosových transportérů. Dále bylo prokázáno, že rezistin indukuje expresi faktorů, které inhibují signální dráhu inzulinu. Na myších modelech byla také ukázána pozitivní korelace mezi rostoucím množstvím rezistinu a vyššími hladinami inzulinu, glukosy a lipidů a rozvíjející se obezitou. Vyskytují se ale i práce, které tyto korelace nepotvrzují nebo dokonce vyvracejí.

Zvýšená exprese rezistinu je výsledkem diferenciací adipocytů. Vyšší počet adipocytů u hlodavců lokálně způsobí vyšší produkci rezistinu, který inhibuje inzulinovou signalizaci a příjem glukosy a tím brání i diferenciaci dalších adipocytů. Tímto způsobem je zajištěna zpětná kontrola adipogeneze.

U lidí byla opět zjištěna pozitivní korelace mezi obezitou a vyšší hladinou krevního rezistinu. Během hubnutí navíc došlo k významnému snížení koncentrace rezistinu. U lidí je oproti hlodavcům mnohem více prací, které s těmito výsledky nesouhlasí, proto není jisté, zda má rezistin u lidí na obezitu nějaký vliv. Stejně tak nebyl u lidí prokázán vliv rezistinu na metabolismus glukosy, působení inzulinu nebo diabetes. Pravděpodobně bude v nejbližších

letech působení lidského rezistinu předmětem intenzivního vědeckého zkoumání.

V několika studiích na lidech byl popsán vliv zánětlivých cytokinů na hladinu rezistinu, která významně korelovala např. s IL-6 a C-reaktivním proteinem. Dále bylo prokázáno, že TNF- α a IL-6 silně stimulují expresi rezistinu. Je známo, že při obezitě dochází ke zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů, je pravděpodobné, že rezistin může působit jako signální molekula, iniciující imunitní odpověď a produkci prozánětlivých cytokinů¹⁵.

Protein vázající retinol 4

Protein vázající retinol 4 (Retinol binding protein 4, RBP4) je prozatím jediný známý specifický vazebný protein pro retinol v krevním oběhu a dlouhou dobu se myslelo, že jeho jedinou funkcí je roznášení retinolu do tkání. K hlavní produkci dochází v játrech, ale byla popsána i syntéza adipocytů^{16,17}.

V roce 2005 bylo objeveno spojení RBP4 s inzulinovou rezistencí. Hladiny RBP4 jsou zvýšené při inzulinové rezistenci a diabetu 2. typu. Po podání antidiabetik se koncentrace RBP4 ustálí na normálních hodnotách. Zvýšená exprese nebo podání rekombinantního RBP4 vyvolává inzulinovou rezistenci, naopak nižší hladiny zvyšují citlivost k inzulinu. Podání syntetických analogů retinolu, která způsobují vyšší vylučování RBP4 močí, upravuje inzulinovou rezistenci a glukosovou intoleranci u obézních myši¹⁶.

Inhibitor plasminogenového aktivátoru-1

Dnes je vysoká hladina inhibitoru plasminogenového aktivátoru-1 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) považována za významnou složku metabolického syndromu. Nedávné studie naznačují, že kromě role v ateroskleróze, má vliv i na rozvoj tukové tkáně a funkci inzulinu v adipocytech. Mechanismus, kterým dochází při obezitě ke zvýšené expresi PAI-1, je velice komplexní a účastní se ho několik faktorů¹⁸.

2.2. Adipocytokiny podporující působení inzulinu

Adiponektin

Adiponektin je exprimován z převážné části v adipocytech. V ostatních buněčných typech se ho syntetizuje pouze malé množství. Byl objeven v roce 1995 na základě rozdílné exprese mRNA v buněčné linii 3T3-L1 diferencovaných adipocytů oproti nediferencovaným preadipocytům. V literatuře je možné ho najít ještě pod názvy Acrp30, AdipoQ, apM1 a Gelatin-binding protein 28 (GBP28).

Adiponektin je složen ze dvou strukturně odlišných oblastí, N-terminální fibrilární doména má kolagenovou strukturu, zatímco C-terminální oblast je globulární. Za nativních podmínek se v monomerní formě nevyskytuje. Základní stavební jednotkou jsou těsně propojené homotrimery, jež se pomocí fibrilární části spojují do složitějších komplexů, které cirkulují v krvi.

Předpokládá se, že adiponektin zvyšuje citlivost tkání

k inzulinu a snižuje riziko aterosklerózy. Jeho koncentrace jsou paradoxně nižší u obézních jedinců oproti hubeným, navíc redukci tělesné hmotnosti je možné hladinu adiponektinu opět zvýšit. To vede k domněnce, že snížená koncentrace adiponektinu vlivem obezity způsobí snížení citlivosti tkání k inzulinu, což je spojeno s rozvojem inzulinové rezistence a diabetickými stavy. Tento názor podporuje i studie, která prokázala nižší hladiny adiponektinu u pacientů s diabetem oproti zdravým jedincům. Nejvýraznější korelace byla nalezena mezi hladinou adiponektinu a inzulinem stimulovaným příjmem glukosy¹⁹.

Leptin

Z fyziologického hlediska způsobuje obezitu porucha energetické rovnováhy. Příjem i výdej energie musí být přísně regulované, aby byla tělesná hmotnost udržována na konstantní hodnotě. Regulace těchto procesů se účastní komplexní interakce různých faktorů produkovaných v periferních tkáních. Pomocí systému zpětné kontroly je jejich působení nakonec zakotveno v centrálním nervovém systému (CNS), kde se jejich interakce přemění na nervový signál.

Nedostatek leptinu se u modelových organismů projevuje sníženým výdejem energie a obezitou. Krevní koncentrace leptinu vzrůstají se zvětšující se obezitou a se zvětšujícím se podílem tukové tkáně. Syntéza se dále zvyšuje se zvětšující se velikostí adipocytů. Hladina leptinu je navíc ovlivněna řadou dalších faktorů, jako je věk, pohlaví, teplota, ve které se organismus nachází, nebo poruchy příjmu potravy (anorexie, bulimie), při kterých je pozměněn i transport leptinu přes hematoencefalickou bariéru.

Během hladovění je exprese leptinu na nízké úrovni, silně poklesne i jako odezva na zvýšený výdej energie. Po najedení dojde k rychlému obnovení syntézy a krevní koncentrace leptinu. Tímto způsobem leptin slouží jako senzor krátkodobých změn v energetickém metabolismu a jako regulátor příjmu potravy. Při hladovění jsou leptinové receptory nacházející se v hypothalamu bez navázaného leptinu, protože jeho koncentrace je příliš nízká, což vyvolává pocit hladu. Následkem zvýšení koncentrace leptinu je jeho vazba na receptory a útlum pocitu hladu. V CNS má vliv ještě na sekreci některých hormonů a neurotransmiterů.

Leptin, kromě CNS, působí i v periferních tkáních např. v játrech, ledvinách, slinivce, kosterním svalstvu, střevech a reprodukčních orgánech, kde ovlivňuje metabolismus sacharidů a působení inzulinu, metabolismus lipidů, termoregulaci, ovulaci a dospívání. Syntéza leptinu probíhá z převážné části v tukové tkáni, ale je exprimován i v jiných tkáních např. v kosterním svalstvu, žaludku, kostní dřeni a játrech, zde je jeho syntéza značně závislá na věku. Zajímavým poznáním bylo objevení exprese leptinu i jeho receptoru v placentě a vaječnících²⁰.

Visfatin

Visfatin byl popsán jako adipocytokin, jehož exprese probíhá převážně v útrobní tukové tkáni. Jeho význam

v regulaci metabolismu lipidů a sacharidů spočívá zejména ve schopnosti vazby na inzulinový receptor a v aktivaci inzulinové signalizační kaskády. Visfatin podporuje účinek inzulinu, stimuluje lipogenezi a příjem glukosy do buněk. U heterozygotních myši s jednou alelou visfatinu defektní se vyskytuje porušená glukosová tolerance a vyšší hladina glukosy. Pokud jsou defektní obě alely, myši umírají v časném embryonálním stádiu. Při použití kompetitivních metod se zjistilo, že vazba inzulinu neovlivňuje vazbu visfatinu a naopak, navíc visfatin se váže s podobnou afinitou i na inzulinový receptor s mutovanou extracelulární α -podjednotkou, což je místo vazby inzulinu. Tato data nasvědčují, že visfatin skutečně aktivuje inzulinovou signalizační kaskádu vazbou na inzulinový receptor, ale místo této vazby je jiné než místo vazby inzulinu²¹.

Hladina visfatinu v plasmě je zvýšená u osob s diabetem 2. typu, nezávisle na dalších faktorech²², ale i u diabetiků 1. typu. Obecně se zdá, že zvýšené množství visfatinu v krvi je spojeno s pokročilým poškozením β -buněk²³. Možným regulačním prvkem sekrece visfatinu, kromě regulace dalšími adipocytokiny²⁴, se zdá být hladina glukosy a inzulinu. Při zvýšené hladině glukosy v krvi dochází ke zvýšení koncentrace visfatinu. V přítomnosti inzulinu a stejně zvýšené koncentraci glukosy však k navýšení hladiny visfatinu nedochází²⁵.

Při objevení visfatinu bylo zjištěno, že jeho mRNA kóduje protein, který je již delší dobu znám jako imunomodulační cytokin, faktor podporující zrání pre-B buněk (pre-B cell colony-enhancing faktor, PBEF)²³. Ještě před objevem visfatinu a jeho funkcí v metabolismu lipidů a sacharidů byla zjištěna významná sekvenční homologie savčího PBEF s bakteriálním proteinem, identifikovaným jako nikotinamidfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.12, NamPRTasa), významným enzymem katalyzujícím první krok syntézy NAD z nikotinamidu. Současně byla u PBEF tato enzymová aktivita potvrzena²⁶.

Protein stimulující acylaci a adipsin

Protein stimulující acylaci (acylation stimulating protein, ASP) je jedním z faktorů, které mají přímý vliv na diferenciaci adipocytů. Vzniká štěpením komplementového proteinu C3, ke kterému dochází v extracelulárním prostoru. C3 je sekretován několika typy buněk, mezi které patří také zralé adipocyty. Vznik ASP začíná vazbou C3 na faktor B, tento komplex je následně štěpen serinovou proteasou adipsinem. Adipsin je dalším proteinem sekretovaným adipocyty, jehož exprese, stejně jako exprese C3 a faktoru B, podporují chylomikrony.

Funkční studie ukazují, že ASP stimuluje příjem mastných kyselin, glukosy a syntézu triacylglycerolů (TAG) jiným mechanismem než vazbou na C3 receptor. ASP se také účastní rozvoje tukové tkáně. Byl prokázán vliv ASP na diferenciaci adipocytů *in vitro*. Tyto výsledky byly následně potvrzeny *in vivo* na myších modelech s geneticky vyřazeným proteinem C3, které měly redukováné množství tukové tkáně a zhoršený příjem TAG²⁷.

Vaspin

Strukturně je vaspin jedním z členů rodiny inhibitorů serinových proteas, tzv. serpinů. Je produkován tukovou tkání a vykazuje 40% homologii s α_1 -antitrypsinem.

Úroveň exprese a sérová koncentrace vaspinu poklesne při diabetu a při snížení tělesné hmotnosti. Na normální hodnoty se opět dostane podáním inzulinu nebo činidel zvyšujících citlivost k inzulinu. Podání vaspinu obézním myším upravuje glukosovou toleranci a citlivost k inzulinu, normalizuje koncentraci krevní glukosy a také ovlivňuje expresi dalších faktorů důležitých v inzulinové rezistenci (TNF- α , leptin, rezistin a další).

Vaspin je faktor sekretovaný tukovou tkání, s potenciální antiproteasovou aktivitou, který zlepšuje některé poruchy provázející metabolický syndrom zvýšením citlivosti tkání k inzulinu. Není ale jasné, zda má tuto funkci on sám nebo potenciální substrát proteasy, kterou inhibuje²⁸.

Omentin

Na základě rozdílné exprese mezi útrobní a podkožní tukovou tkání byl identifikován další adipocytokín, který byl pojmenován omentin. Podobně jako visfatin má pozitivní vliv na příjem glukosy adipocyty, ale nevykazuje inzulin mimetický efekt, pouze zvyšuje citlivost buněk k inzulinu. Omentin není sekretován přímo adipocyty, ale podpůrnými cévními buňkami²⁹.

2.3. Ostatní adipocytokiny

Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) je další prozánětlivý faktor. Hraje významnou roli při různých imunitních onemocněních, jako je např. systémový lupus erythematosus (SLE)³⁰. Zvýšená krevní hladina IL-18 je spojena s obezitou, metabolickým syndromem a rizikem aterosklerózy a metabolického syndromu^{31,32}. Předpokládá se proto produkce IL-18 v tukové tkáni³².

U transgenických myší, které mají vyřazený gen pro IL-18 nebo jeho receptor, se vyskytuje obezita a inzulinová rezistence, ke které dochází v játrech, svalch a tukové tkáni a s ní související hyperinzulinemie a hyperglykemie. Obezita je výsledkem vyššího příjmu potravy a následné akumulace tuku. V játrech dochází k inzulinové rezistenci prostřednictvím zvýšené exprese genů podílejících se na glukoneogenezi, což poukazuje na novou roli IL-18 v homeostáze energetického příjmu a citlivosti tkání k inzulinu³³.

Rozpustný preadipocytový faktor-1

Rozpustný preadipocytový faktor-1 (preadipocyte factor-1, Pref-1) je transmembránový protein vysoce exprimovaný v preadipocytech. Exprese u zralých adipocytů úplně chybí. Extracelulární oblast Pref-1 podléhá na dvou místech proteolytickému štěpení za vzniku 50 a 25 kDa rozpustných produktů.

Myši s transgenní expresí většího štěpného produktu Pref-1 v tukové tkáni vykazují podstatný pokles hmotnosti

celkového tuku a nižší expresi faktorů sekretovaných adipocyty, včetně leptinu a adiponektinu. U těchto myší s částečnou ztrátou tukové tkáně se projevila hyperglykemie, porušená glukosová tolerance a zhoršená citlivost k inzulinu. Výsledky ukazují, že rozpustný Pref-1 má negativní vliv na adipogenezi a s ní související správnou funkci adipocytů³⁴.

Angiotensin

Renin-angiotensinový systém je známý důležitý regulační mechanismus krevního tlaku a hospodaření s elektrolyty. Produkce angiotensinogenu – prekurzoru angiotensinu – byla na konci 20. století zjištěna také v tukové tkáni, kde je vyšší u obézních jedinců ve srovnání s hubenými. Vyšší exprese je podobně jako u dalších adipocytokínů v útrobní tukové tkáni ve srovnání s podkožní.

Dosavadní výsledky ukazují, že angiotensin produkováný tukovou tkání by mohl být významný faktor ovlivňující expresi dalších adipocytokínů (TNF- α , IL-6, PAI-1, leptinu a dalších) a mohl by tak ovlivňovat významné pochody probíhající v tukové tkáni, včetně zánětlivých procesů a růstu tukové tkáně^{35,36}.

3. Závěr

Hlavní podmínkou přežití člověka byla po dlouhou dobu jeho schopnost šetřit energii a překonat různé dlouhá období nedostatku potravy. Slabí jedinci umírali a přežívali pouze ti, kteří měli vhodnou genetickou výbavu k efektivnímu ukládání a využívání svých energetických zásob. Předpokládáme, že jedny z faktorů, které patří do této „vhodné genetické výbavy“, jsou právě adipocytokiny a to zejména ty, které podporují činnost inzulinu (adiponektin, leptin, visfatin, ASP, adiposin vaspin, omentin a pravděpodobně i další). Za normálních fyziologických podmínek nebo dokonce za stavu hladovění tyto adipocytokiny podporují růst tukové tkáně, příjem glukosy a brzdí odbourávání energetických zásob ve formě TAG. Jsou v jisté rovnováze s ostatními adipocytokiny (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, rezistinem, RBP4, PAI-1 a dalšími), které naopak brání v jejich působení a v působení inzulinu. Společné působení všech adipocytokínů spolu se správným působením mnoha dalších mechanismů, mezi které patří např. neurohormonální regulace a transkripční faktory, udržuje homeostázu důležitých metabolitů a podporuje správný růst tukové tkáně.

Celkový růst tukové tkáně, včetně diferenciací adipocytů, je tedy řízen kromě adipocytokínů mnoha dalšími stejně důležitými pochody, které v tomto článku nejsou diskutovány. Není to tedy pasivní odpověď organismu na nadměrný příjem energie ve formě potravy, ale je to vysoce regulovaný složitý proces. V obecném povědomí je schopnost tukové tkáně rozpínat se do nekonečna, ale právě poslední informace o regulaci jejího růstu, včetně nových poznatků o adipocytokinech naznačují, že tomu tak není. Pokud velikost tukové tkáně při pozitivní energetické bilanci překročí určitou hranici, přestane být schopna dále

se zvětšovat a přestane být schopna dále ukládat živiny. Tyto živiny, zejména volné mastné kyseliny, se pak začínou ukládat v jiných tkáních, převážně játrech a svalech, kde působí negativně. Vlivem zvyšování produkce prozánětlivých adipocytokinů (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1) dochází v tukové tkáni ke zvyšování počtu makrofágů a dalších imunitních buněk, vlivem čehož dochází k opětovně vyšší produkci těchto faktorů. Ty pak potlačují působení inzulinu a tím brání dalšímu příjmu živin do tukové tkáně. Při nadměrné obezitě dochází tedy ke změnám v produkci adipocytokinů. Již nejsou v rovnováze adipocytokiny potlačující a podporující činnost inzulinu, ale dochází k vyšší produkci rezistinu, TNF- α , RBP4 a dalších, které brání tukové tkáni v rozvoji a v mnoha jiných tkáních způsobují inzulinovou rezistenci. Naproti tomu se při obezitě produkce adipocytokinů podporujících činnost inzulinu, zejména leptinu a adiponektinu, snižuje a nejsou tak již schopny podpořit správné fungování tukové tkáně. Tento regulační mechanismus působí pravděpodobně proti nadměrnému nárůstu obezity, ale za cenu vzniku celkových poruch v organismu, např. diabetu 2. typu a aterosklerózy, poruch, které často končí až smrtí.

Nové poznatky o tukové tkáni nás postupně utvrzují, že regulační procesy, které zde probíhají, jsou velice komplexní a složité a budou pravděpodobně mnohem složitější, než se dnes domníváme. Objevení a poznání vzájemné souhry či protihry všech adipocytokinů bude předmětem intenzivního vědeckého zkoumání několika příštích desetiletí. Na druhou stranu už poznatky, které víme dnes, by nám v blízké budoucnosti mohly umožnit účinnou terapii poruch souvisejících s obezitou. Z klinického hlediska by každý z adipocytokinů mohl představovat potenciální cíl působení nových léků.

Tato publikace vznikla za finanční podpory grantů IAA500110805 a MŠMT 6046137305.

LITERATURA

- Rosen E. D., Spiegelman B. M.: *Nature* 444, 847 (2006).
- Sethi J. K., Vidal-Puig A. J.: *J. Lipid. Res.* 48, 1253 (2007).
- Zahorska-Markiewicz B.: *Adv. Med. Sci.* 51, 111 (2006).
- Trayhurn P., Wood I. S.: *Br. J. Nutr.* 92, 347 (2004).
- Tilg H., Moschen A. R.: *Mol. Med.* 14, 222 (2008).
- Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Marino M. W., Hotamisligil G. S.: *Nature* 389, 610 (1997).
- Hotamisligil G. S., Arner P., Caro J. F., Atkinson R. L., Spiegelman B. M.: *J. Clin. Invest.* 95, 2409 (1995).
- Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y.: *J. Biol. Chem.* 272, 29911 (1997).
- Fontana L., Eagon J. C., Trujillo M. E., Scherer P. E., Klein S.: *Diabetes* 56, 1010 (2007).
- Klover P. J., Clementi A. H., Mooney R. A.: *Endocrinology* 146, 3417 (2005).
- Febbraio M. A.: *J. Clin. Invest.* 117, 841 (2007).
- Dinarello C. A.: *J. Exp. Med.* 201, 1355 (2005).
- Jager J., Grémeaux T., Cormont M., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J. F.: *Endocrinology* 148, 241 (2007).
- Sell H., Dietze-Schroeder D., Kaiser U., Eckel J.: *Endocrinology* 147, 2458 (2006).
- Kusminski C. M., McTernan P. G., Kumar S.: *Clin. Sci.* 109, 243 (2005).
- Yang Q., Graham T. E., Mody N., Preitner F., Peroni O. D., Zabolotny J. M., Kotani K., Quadro L., Kahn B. B.: *Nature* 436, 356 (2005).
- Stefan N., Hennige A. M., Staiger H., Machann J., Schick F., Schleicher E., Fritsche A., Häring H. U.: *Diabetes Care* 30, 1173 (2007).
- Alessi M. C., Juhan-Vague I.: *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 26, 2200 (2006).
- Berg A. H., Combs T. P., Scherer P. E.: *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 84 (2002).
- Margetic S., Gazzola C., Pegg G. G., Hill R. A.: *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1407 (2002).
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K., Matsuki Y., Murakami M., Ichisaka T., Murakami H., Watanabe E., Takagi T., Akiyoshi M., Ohtsubo T., Kihara S., Yamashita S., Makishima M., Funahashi T., Yamanaka S., Hiramatsu R., Matsuzawa Y., Shimomura I.: *Science* 307, 426 (2005).
- Chen M. P., Chung F. M., Chang D. M., Tsai J. C., Huang H. F., Shin S. J., Lee Y. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 295 (2005).
- López-Bermejo A., Chico-Julià B., Fernández-Balsells M., Recasens M., Esteve E., Casamitjana R., Ricart W., Fernández-Real J. M.: *Diabetes* 55, 2871 (2006).
- Kralisch S., Klein J., Lossner U., Bluher M., Paschke R., Stumvoll M., Fasshauer M.: *J. Endocrinol.* 185, 1 (2005).
- Haider D. G., Schaller G., Kapiotis S., Maier C., Luger A., Wolzt M.: *Diabetologia* 49, 1909 (2006).
- Rongvaux A., Shea R. J., Mulks M. H., Gigot D., Urbain J., Leo O., Andris F.: *Eur. J. Immunol.* 32, 3225 (2002).
- Kalant D., Maslowska M., Scantlebury T., Wang H. W., Cianflone K.: *CJD* 27, 154 (2003).
- Hida K., Wada J., Eguchi J., Zhang H., Baba M., Seida A., Hashimoto I., Okada T., Yasuhara A., Nakatsuka A., Shikata K., Hourai S., Futami J., Watanabe E., Matsuki Y., Hiramatsu R., Akagi S., Makino H., Kanwar Y. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10610 (2005).
- Yang R. Z., Lee M. J., Hu H., Pray J., Wu H. B., Hansen B. C., Shuldiner A. R., Fried S. K., McLenithan J. C., Gong D. W.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, 1253 (2006).
- Dinarello C. A.: *Semin. Nephrol.* 27, 98 (2007).
- Zirlik A., Abdullah S. M., Gerdes N., MacFarlane L., Schönbeck U., Khera A., McGuire D. K., Vega G. L.,

- Grundy S., Libby P., de Lemos J. A.: *Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2043 (2007).
32. Trayhurn P., Wood I. S.: *Br. J. Nutr.* 92, 347 (2004).
 33. Netea M. G., Joosten L. A., Lewis E., Jensen D. R., Voshol P. J., Kullberg B. J., Tack C. J., van Krieken H., Kim S. H., Stalenhoef A. F., van de Loo F. A., Verschueren I., Pulawa L., Akira S., Eckel R. H., Dinarello C. A., van den Berg W., van der Meer J. W.: *Nat. Med.* 12, 650 (2006).
 34. Lee K., Villena J. A., Moon Y. S., Kim K. H., Lee S., Kang C., Sul H. S.: *J. Clin. Invest.* 111, 453 (2003).
 35. van Harmelen V., Ariapart P., Hoffstedt J., Lundkvist I., Bringman S., Arner P.: *Obes. Res.* 8, 337 (2000).
 36. Hauner H.: *Proc. Nutr. Soc.* 64, 163 (2005).

V. Škop^a, K. Kontrová^a, J. Zídková^a,
and V. Zidek^b (^a *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,*
^b *Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague*):
Adipocytokines – Recently Discovered Fat Tissue Hormones

The number of obese and overweight individuals has risen dramatically over the last three decades. Obesity is not only associated with the development of the type 2 diabetes and hypertension but it also has negative effects on liver function, leading to diseases such as nonalcoholic fatty liver disease. Insulin resistance is the primary defect underlying the development of the type 2 diabetes and is a central component defining the metabolic syndrome. Adipose tissue produces and secretes a variety of tissue hormones – adipocytokines and adipokines. The recently described adipocyte secretory hormones contribute to the pathogenesis of impaired insulin secretion and insulin resistance, endothelial dysfunction, a pro-inflammatory state and promote progression of atherosclerosis. The present article gives an overview of the well-known adipocytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, resistin, RBP4, PAI-1, adiponectin, leptin, visfatin, ASP, vaspin, omentin, IL-18, Pref-1, angiotensin) and their role in the regulation of metabolism.

ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ
V CHMELU A PIVU

MARTIN FIDLER* a LENKA KOLÁŘOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-techno-
logická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10
Pardubice**martin.f@centrum.cz, lenka.kolarova@upce.cz*

Došlo 30.5.07, přepracováno 3.3.08, přijato 12.6.08.

Klíčová slova: flavonoidy, chmel, pivo, antioxidační akti-
vita

Úvod

Jednou z možností, jak chránit organismus před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabráňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek. Mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají spolu s potravou, má antioxidační vlastnosti. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, víno, chmel, aromatické a léčivé rostliny a další. V řadě experimentálních studií bylo zjištěno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než u antioxidačních vitamínů¹. Rovněž byl prokázán vztah mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě či v nápojích a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch nebo procesů stárnutí². Polyfenolické látky obsažené v pivu mají široké spektrum příznivých účinků na lidské zdraví, účinky jsou nejen antioxidační, ale i protirakovinotvorné, antimikrobiální a protizánětlivé. Dále hrají polyfenolické látky významnou úlohu v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování.

Většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy. Proto se snažíme charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity, TAA). Existuje velké množství metod pro stanovení TAA, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC¹ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Tato metoda určuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu

Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě testované látky o koncentraci 1 mmol l⁻¹. Směsné vzorky se hodnotí jako látkové množství Troloxu odpovídající aktivitě 1 g či 1 ml vzorku. Tato metoda může být aplikována na měření čistých látek, vodných roztoků i nápojů.

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními¹. Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Nejčastěji se využívají metody založené na eliminaci kyslíkových (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC^{3,4}) nebo syntetických stabilních (ABTS, DPPH) radikálů.

Metoda využívající schopnost antioxidantů zřádit radikálový kationt ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát))⁵ je jednou ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity. Základem metody je generování radikál kationtu ABTS^{•+}, k čemuž lze využít např. peroxodisíran draselný, MnO₂, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dichlorid) či systém H₂O₂/peroxidasa. V této práci byl použit peroxodisíran draselný, který reaguje s ABTS ve stechiometrickém poměru 2:1 (ABTS:K₂S₂O₈). Nadbytek ABTS je nutný pro zachování stability reakční směsi. Pokud je poměr [ABTS]/[ABTS^{•+}] roven 50, pak se absorbance samotné reakční směsi s časem nemění, pokud je však tento poměr blízký nule, je reakční směs nestabilní a dochází ke znatelnému poklesu absorbance v závislosti na čase⁶.

Další metoda využívá schopnosti antioxidantů zřádit radikál DPPH[•] (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), což je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku, čímž přechází do formy stabilní diamagnetické molekuly.

Antioxidační aktivitu lze také posuzovat na základě redukční schopnosti látky. Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP⁸ (Ferric Reducing Antioxidant Power), kde se využívá schopnost antioxidantů redukovat železité komplexy (např. Fe^{III}-TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin), které jsou téměř bezbarvé a po redukcí vytváří barevné produkty. Metoda má svá omezení spočívající v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH (3,6), dále nejsou zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem pomalu.

Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale změnu fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází. Příkladem je elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence.

* Martin Fidler tuto práci úspěšně prezentoval v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

Experimentální část

Tato práce je zaměřena na sledování antioxidační aktivity u 20 vybraných vzorků pív (tab. I), mezi kterými byli zástupci světlých ležáků (P1–P13), světlých výčepních pív (P14, P15), pív speciálních (P16), tmavých pív (P17, P18) a pív nealkoholických (P19, P20). Dále byla sledována antioxidační aktivita chmelových extraktů a granulí (tab. II). Chmelové extrakty připravené extrakcí ethanolem či nadkritickou tekutinou (CO₂) byly dodány firmami Flaveko s.r.o. (F1–F3) a Favea s.r.o. (K1–K4), granulovaný chmel (G1–G3) byl dodán Chmelařským institutem s.r.o. (Žatec).

Pro měření antioxidační aktivity byly použity metody využívající eliminaci syntetických radikálů (ABTS a DPPH), dále metoda založená na redoxních vlastnostech železitého komplexu (FRAP). U všech metod byla spektrofotometricky měřena změna absorbance na UV spektrofotometru Specol 11 (Carl-Zeiss, Německo).

Pro srovnání výsledků jednotlivých metod byla použita standardní látka, Trolox, která byla rozpuštěna v methanolu a z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada obsahující 0,005–0,05 μmol Troloxu pro metodu používající ABTS, 0,01–0,08 μmol Troloxu pro metodu používající DPPH a 0,02–0,1 μmol Troloxu pro metodu FRAP (vše absolutní množství Troloxu v nadávkovaném objemu). Toto rozmezí koncentrací bylo určeno experimentálně. Pro studované vzorky bylo absolutní množství Troloxu odečteno z kalibrační křivky (závislost změny absorbance na absolutním množství Troloxu v nadávkovaném množství) a přepočteno na hodnotu TEAC, která byla vztažena na jednotku vzorku (v případě piva na 1 ml, v případě chmelových extraktů a granulí na 1 g).

Metoda používající ABTS

Radikál kation ABTS^{•+} byl připraven reakcí ABTS diamonné soli ($c = 3,5 \text{ mmol l}^{-1}$) a K₂S₂O₈ ($c = 0,06 \text{ mol l}^{-1}$).

Roztok se nechal reagovat 12–16 h za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Takto vzniklý roztok byl smíchán s čerstvě připraveným octanovým pufrům (pH 4,3) v poměru 39:1 (pufr:ABTS). Ke 2 ml této reakční směsi bylo přidáno 25 μl vzorku. Po promíchání se roztok nechal reagovat 30 min a byl proměřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Původně modrozelený roztok se odbarvil na světle zelený až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

Metoda používající DPPH

Ze zásobního roztoku DPPH ($c = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$) v methanolu byl připraven pracovní roztok o koncentraci $c = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$ obsahující octanový pufr (pH 4,3) v poměru 1:2 (DPPH:pufr). K analýze bylo odebráno 1,9 ml této reakční směsi, ke které bylo přidáno 100 μl vzorku. Úbytek absorbance byl měřen při vlnové délce 515 nm

Tabulka II

Seznam studovaných vzorků chmelových extraktů (K, F) a granulovaného chmele (G)

Označení	Vzorek
K1	CO ₂ extrakt
K2	CO ₂ standardizovaný extrakt
K3	CO ₂ isomerizovaný extrakt
K4	ethanolový extrakt
F1	ethanolový extrakt
F2	CO ₂ extrakt
F3	CO ₂ isomerizovaný extrakt
G1	odrůda – Žatecký červeňák
G2	odrůda – Agnus
G3	odrůda – Premiant

Tabulka I

Seznam studovaných vzorků pív

Označení	Vzorek piva	Označení	Vzorek piva
P1	Braník ležák	P11	Velkopopovický kozel - medium
P2	Budweiser - sv. ležák	P12	Zlatopramen 11°
P3	Velkopopovický kozel - premium	P13	Krušovice jubilejní ležák
P4	Staropramen ležák	P14	Klasik
P5	Gambrinus premium	P15	Krušovice Mušketýr
P6	Pilsner Urquell	P16	Bud Superstrong
P7	Stella Artois	P17	Staropramen černý
P8	Radegast premium	P18	Krušovice černé
P9	Starobrno ležák	P19	Radegast Birell
P10	Pernštejn - sv. ležák	P20	Staropramen nealko

v 30 s intervalech po dobu 10 min pro studium průběhu reakce antioxidantů s DPPH. Pro zjištění celkové antioxidační aktivity byl změřen úbytek absorbance po 30 min od začátku reakce. Původně fialový roztok byl působením antioxidantů odbarven na světle fialový až čirý. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

Metoda FRAP

Při této metodě se pracuje ve vodném prostředí. Reakční směs byla připravena smícháním roztoků FeCl_3 ($c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$), TPTZ s přidavkem kyseliny chlorovodíkové ($c = 10 \text{ mmol l}^{-1}$) a octanového pufru (pH 3,6) v poměru 1:1:10 (FeCl_3 : TPTZ:pufr). Ke 2 ml reakční směsi bylo přidáno 25 μl vzorku. Na rozdíl od předchozích metod byl měřen nárůst absorbance při vlnové délce 593 nm po 10 min od začátku reakce. Změna absorbance byla přepočtena pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství Troloxu.

Výsledky a diskuse

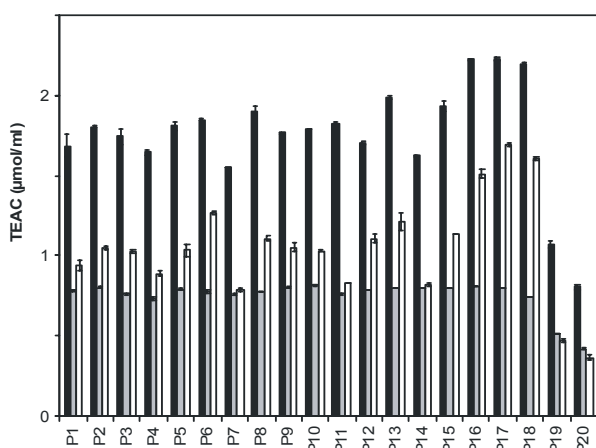
Všemi metodami bylo proměřeno celkem 20 vzorků pív (tab. I). U každého vzorku byly provedeny celkem čtyři experimenty a vypočtena průměrná hodnota. Na základě rovnice regrese kalibrační křivky závislosti změny absorbance na látkovém množství Troloxu byla změna absorbance přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu. Hodnota celkové antioxidační aktivity byla vztažena na jednotku vzorku (1 ml piva).

Grafické znázornění a srovnání výsledků je uvedeno na obr. 1. Z něj je patrné, že ze světlých pív má nejvyšší antioxidační aktivitu pivo speciální (P16), což je 16-ti

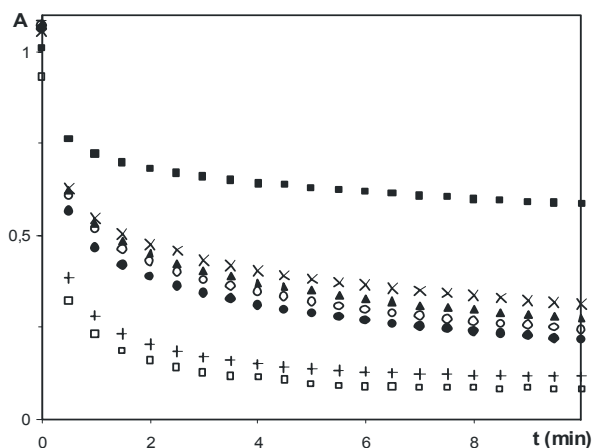
stupňové pivo, které obsahuje více mladiny a tím i více látek vykazujících antioxidační aktivitu. Ležáky a světlá výčepní piva mají antioxidační aktivitu přibližně srovnatelnou v závislosti na výrobci. Nejmenší antioxidační aktivitu mají piva nealkoholická (P19, P20), která se od ostatních pív liší technologickým postupem výroby. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity dosahují piva tmavá (P17, P18), která jsou vyrobená odlišným způsobem s využitím jiného chmelu i sladu. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity změřené za použití různých metod se číselně nerovnejí. Je to způsobeno tím, že každá reakční směs reaguje s různými antioxidanty různými mechanismy. Nejpřesnější by měla být metoda ABTS, kde činidlo reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu. Prenylované flavonoidy a některé další polyfenolické látky reagují s DPPH pomalu, případně nereagují vůbec, proto jsou hodnoty antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH nižší. Nižší hodnoty vykazuje i metoda FRAP, kde je měřena spíše redukční schopnost látek, která na rozdíl od dalších dvou použitých metod nemusí korelovat přímo s antioxidační aktivitou. Pro orientační srovnání vzorků se stejnou povahou jsou však dostačující všechny použité metody. Mezi výsledky získanými různými metodami neexistuje žádný matematický vztah.

Průběh reakce DPPH se vzorky pív je znázorněn na obr. 2, kde jsou pro ilustraci vybráni zástupci jednotlivých tříd pív – světlá výčepní, ležáky, tmavá a nealkoholická. Z obrázku jasně vyplývá, že nealkoholická piva (P20) reagují s DPPH velice pomalu, zatímco piva černá (P17) a pivo speciální (P16) reagují z počátku velice rychle a po cca 3 min se jejich absorbance už prakticky nemění.

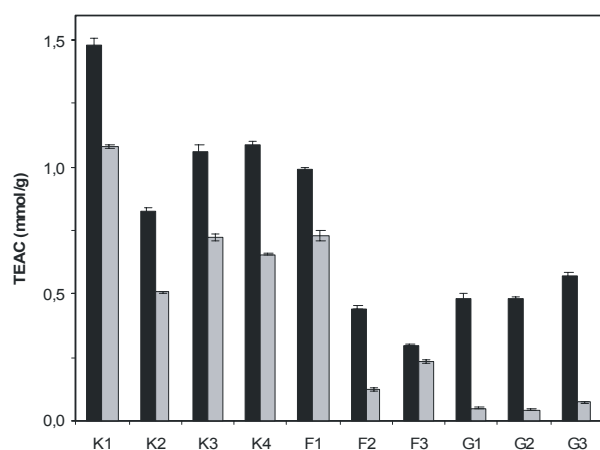
Dále byly proměřeny chmelové extrakty a granule (tab. II). Uvedené vzorky nejsou rozpustné ve vodě, proto bylo stanovení antioxidační aktivity provedeno pouze metodami ABTS a DPPH. Metodu FRAP lze použít pouze ve



Obr. 1. Antioxidační aktivita studovaných vzorků pív vyjádřená v TEAC; porovnání výsledků získaných s využitím metod $\square$ DPPH, $\blacksquare$ ABTS a $\square$ FRAP



Obr. 2. Průběh reakce radikálu DPPH s vybranými vzorky pív; $\blacktriangle$ P3, $\circ$ P8, $\bullet$ P12, $\times$ P14, $+$ P16, $\square$ P17, $\blacksquare$ P20



Obr. 3. Antioxidační aktivita chmelových extraktů a granulí vyjádřená v TEAC; porovnání výsledků získaných s využitím metod ABTS a DPPH; ■ ABTS, □ DPPH

vodném prostředí. Chmelové extrakty a granule byly rozpuštěny v methanolu (ABTS: $c = 1 \text{ g l}^{-1}$, DPPH: $c = 0,5 \text{ g l}^{-1}$) a proměřeny. Celkem byly provedeny čtyři experimenty a průměrné hodnoty byly pomocí kalibrační křivky závislosti změny absorbance na látkovém množství Troloxu přepočteny na TEAC. Hodnoty TEAC byly vztaženy na jednotku vzorku, v tomto případě na 1 g extraktu či granule. Na obr. 3 je uvedeno srovnání výsledků získaných s využitím obou metod (ABTS a DPPH). Jak je patrné, nejvyšší antioxidační aktivitu má chmelový extrakt K1, který byl připraven extrakcí nadkritickou tekutinou (CO_2) a tudíž by obsah polyfenolických látek neměl být tak vysoký jako u alkoholových extraktů. Při přípravě tohoto extraktu byl pravděpodobně využit přídavek alkoholu, který podpořil jejich extrakci. Standardizovaný a isomerizovaný CO_2 extrakt (K2 a K3) má přibližně stejnou antioxidační aktivitu jako alkoholové extrakty (K4 a F1). Nejnížší hodnoty TEAC byly pozorovány u extraktů připravených extrakcí nadkritickou tekutinou bez přídavku alkoholu (F2 a F3). Vzorky granulovaného chmele vykazují přibližně stejnou antioxidační aktivitu pro všechny odrůdy, přičemž číselné hodnoty v porovnání s chmelovými extrakty jsou podstatně nižší.

Závěr

Celková antioxidační aktivita fenolických látek obsažených v pivu a chmelu byla změřena metodami využívajícími schopnosti antioxidantů zhaset syntetické radikály ABTS a DPPH. Byla také odzkoušena a úspěšně použita metoda FRAP, u které působením antioxidantů dochází

k redukci železitého komplexu na železnatý. Tato metoda je vhodná pro měření ve vodném prostředí, proto nemohla být použita pro zjištění antioxidační aktivity polyfenolických látek obsažených ve chmelových extraktech a granulích, které nejsou ve vodě rozpustné. Tato metoda byla použita pouze u vzorků piva. Metodami ABTS a DPPH byly proměřeny vzorky piva i chmelových extraktů a granulí. Všechny získané výsledky byly přepočteny na ekvivalentní množství standardní látky (Trolox) a vzájemně porovnány. Metoda ABTS poskytuje nejvyšší hodnoty, jelikož radikál kation reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu. U metody DPPH jsou hodnoty antioxidační aktivity nižší, protože nereaguje s prenylovanými flavonoidy a některými dalšími polyfenolickými látkami. Nižší hodnoty vykazuje i metoda FRAP, kde je měřena spíše redukční schopnost látek, která nemusí korelovat přímo s antioxidační aktivitou.

LITERATURA

1. Paulová H., Bochoráková H., Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 (2004).
2. Gliszczynska-Swiglo A.: Food Chem. 96, 131 (2006).
3. Ou B. X., Huang D. J., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: J. Agric. Food Chem. 50, 3122 (2002).
4. Ou B. X., Hampsch-Woodill M., Prior R. L.: J. Agric. Food Chem. 49, 4619 (2001).
5. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Free Radical Biol. Med. 26, 1231 (1999).
6. Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M., Arnao M. B.: Phytochem. Anal. 9, 196 (1998).
7. Yokozawa T., Chen C. P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G. I., Nishioka I.: Biochem. Pharmacol. 56, 213 (1998).
8. Benzie I. F. F., Strain J. J.: Anal. Biochem. 239, 70 (1996).

M. Fidler and L. Kolářová (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice): **Analysis of Beer and Hop Antioxidants**

This work is focused on the determination of antioxidant activity of polyphenolics in hop and beer. Methods based on their radical-scavenging activity and ferric reducing antioxidant power were used for the purpose. All the methods were optimized and applied to hop extract and beer samples. The results obtained by different methods were compared and discussed.

NOVĚ IDENTIFIKOVANÉ FENOLICKÉ LÁTKY V PARAZITICKÝCH ROSTLINÁCH *Cuscuta europaea* A *Cuscuta campestris*

PETRA HŘIBOVÁ^{a*}, MILAN ŽEMLIČKA^a,
TOMÁŠ BARTL^b a EMIL ŠVAJDLENKA^a

^a Ústav přírodních léčiv, ^b Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno
cerfpatolog@seznam.cz

Došlo 3.7.08, přijato 19.9.08.

Klíčová slova: *Cuscuta europaea*, *Cuscuta campestris*, HPLC, fenolické látky

Úvod

Rostliny rodu *Cuscuta* (kokotice) jsou řazeny do čeledi Scutellariaceae. Jde o jednoleté stonkovité parazitující byliny, většinou bez vlastního chlorofylu. Dospělý jedinec má nitkovité oranžové nebo žluté stonky, které se omotávají kolem hostitelských rostlin. Kontakt s hostitelem je zajištěn pomocí haustorií, která pronikají do pletiv hostitele a tak zajišťují výživu rostliny. Rostlina je zcela závislá na svém hostiteli, po vyklíčení semene ho musí nalézt do 5 až 10 dnů, jinak umírá¹.

Rod *Cuscuta* zahrnuje asi 150 druhů a je rozšířen celosvětově s výjimkou nejméně chladných oblastí². *C. chinensis* Lam. (kokotice čínská) je hojně využívána v čínském lidovém léčitelství při léčbě onemocnění jater a ledvin³, dále byly u methanolickeho extraktu ze semen této rostliny prokázány protirakovinové účinky⁴, u vodného extraktu imunostimulační a antioxidační účinky⁵.

Na území České republiky a Slovenska je hojně rozšířená *C. europaea* L. (kokotice evropská) a *C. campestris* Yuncker (kokotice ladní)¹. Z nejvýznamnějších obsažených látek byly dosud identifikovány fenolické kyseliny zahrnující chlorogenovou kyselinu, 3,5-dikafeoylchinovou kyselinu, 4,5-dikafeoylchinovou kyselinu, dále flavonoidy kempferol, kempferol-3-*O*-galaktosid, kempferol-3-*O*-glukosid, kvercetin, kvercetin-3-*O*-galaktosid a kvercetin-3-*O*-glukosid⁶. Identifikace dalších látek ze skupiny fenolických kyselin a flavonoidů metodami HPLC a MS byla předmětem této práce.

Experimentální část

Chemikálie

Standard isorhamnetin-3-*O*-glukosid byl zakoupen u firmy Roth (Karlsruhe, Německo), standardy isorhamnetin, kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a rozpouštědla methanol, voda a acetonitril pro HPLC u firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Rostlinný materiál

Sběr *C. europaea* parazitující na kopřivě (*Urticaceae*) byl proveden v červenci roku 2004 v České republice v blízkosti opevnění Stachelberg mezi městy Trutnov a Žacléř, *C. campestris* parazitující na rdesnu (*Polygonaceae*) byla sbírána v červenci 2006 na Slovensku na jižním okraji města Vrátke. Identifikaci rostlinného materiálu provedl Ing. Peter Tóth, PhD. (Katedra ochrany rostlin Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre) a Ing. Milada Pízová (Ústav přírodních léčiv Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně).

Příprava vzorků

Rostlinný materiál (0,2 g) byl krátce po sběru lyofilizován, zmrazen kapalným dusíkem, rozdrcen na prášek a extrahován v 1 ml směsi methanol : voda (1:1). Extrakce byla podpořena ultrazvukem po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Po dekantaci a filtraci (filtr Millipore 0,45 μm) byly extrakty analyzovány pomocí HPLC metodou optimalizovanou pro analýzu polyfenolů.

Přístroje a použitá metoda

Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 (Agilent Technologies), s DAD a hmotnostním detektorem 1100 Series LC/MSD Trap VL. Byla použita kolona ABZ+PLUS (Supelco, USA), 150 mm × 4,6 mm, 3 μm.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (MeCN) a 40 mM mravenčí kyseliny (HCOOH). Gradient od 0 min 10 % MeCN a 90 % HCOOH, do 36 min na 100 % MeCN, další 4 min následovalo promývání kolony 100% MeCN. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml min⁻¹, teplota kolony udržována na 30 °C. Použitá detekce DAD 254 nm. Hmotnostní spektra byla měřena v negativním módu. Zdroj iontů: ESI. Parametry iontové pasti: automatický MS2 mód, skenovací rychlost 13 000 *m/z*/s, tlak nebulizéru 483 kPa, průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹, teplota sušení 350 °C, cílová hmota 300 *m/z*, řízené množství iontů v iontové pasti 30 000, maximální akumulací čas 300 ms, skenovací rozsah 50–1000 *m/z*.

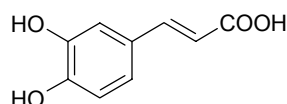
* Petra Hřibová získala za tuto práci zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2008.

Výsledky a diskuse

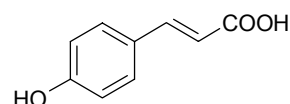
Methanolicke extrakty připravené z *C. europaea* a *C. campestris* byly podrobeny analýze HPLC, která v obou případech prokázala přítomnost celé řady fenolických látek. Sloučeniny byly identifikovány po separaci v analytické koloně srovnáním retenčních časů a UV-VIS spekter se standardy. Identifikace fenolů byla podpořena hmotnostní spektrometrií.

Na chromatografickém záznamu methanolickeho extraktu z *C. europaea* (obr. 1) se vyskytuje několik piků, z nichž dominantní odpovídá chlorogenové kyselině. Další významné píky odpovídají již dříve identifikovaným flavonoidům kempferolu, kvercetin, glukosidu a galaktosidu kvercetinu. Intenzivní pik při 12 min je podle elektronového a hmotnostního spektra jedním z isomerů kyseliny dikafeoylchinové.

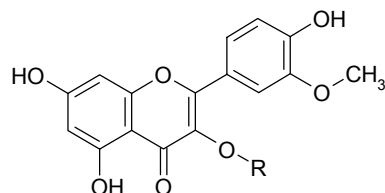
Nově byla v extraktu z *C. europaea* pomocí LC-MS v negativním módu nalezena kávová kyselina (I) s molekulovým iontem $[M-H]^-$ m/z 179, *p*-kumarová kyselina



I

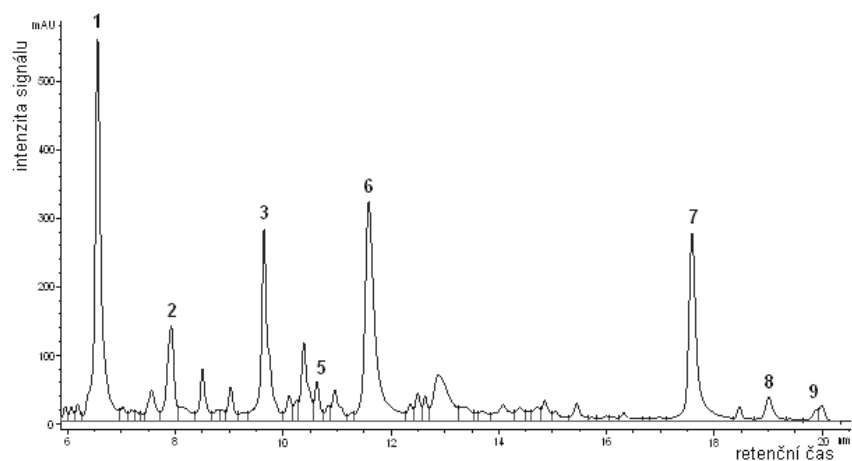


II

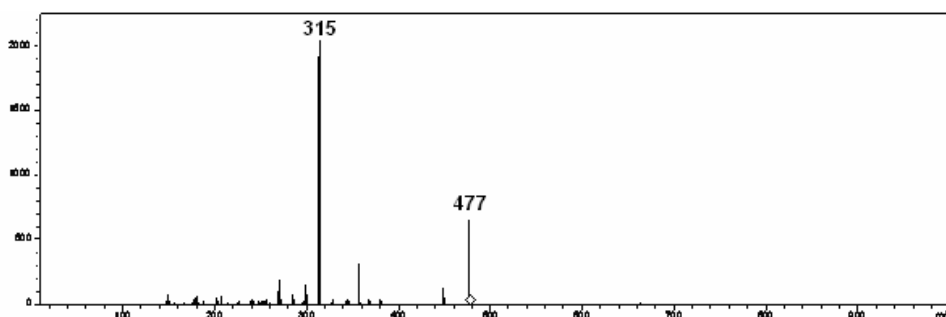


III R = H

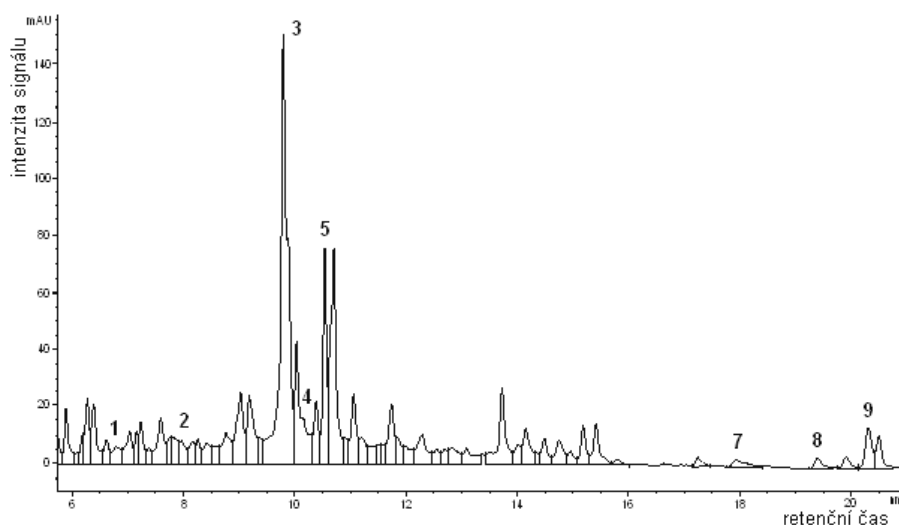
IV R = D-glukosyl



Obr. 1. Chromatogram extraktu *C. europaea*. (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina kávová, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (6) blíže neurčená dikafeoylchinová kyselina, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm



Obr. 2. Hmotnostní spektrum a fragmentace isorhamnetin-3-*O*-glukosidu (negativní mód). Aglykon isorhamnetin ($[M-H]^-$ m/z 315) vznikl odtržením glukosy (m/z 162) z molekulového iontu isorhamnetin-3-*O*-glukosidu ($[M-H]^-$ m/z 477)



Obr. 3. Chromatogram extraktu *C. campestris*. (1) chlorogenová kyselina, (2) kávová kyselina, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (4) *p*-kumarová kyselina, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm

lina (II) s molekulovým iontem $[M-H]^-$ m/z 163 a molekulový ion $[M-H]^-$ m/z 315, který odpovídal isorhamnetinu (III). Jednoznačně byla potvrzena přítomnost isorhamnetinu po jeho izolaci společným nástřikem se standardem. Molekula s $[M-H]^-$ m/z 477, jejíž fragmentací vznikly částice s m/z 162 odpovídající hexose a fragment $[M-H]^-$ m/z 315 odpovídající aglykonu isorhamnetinu, je zřejmě isorhamnetin-hexosid (obr. 2). Po porovnání se standardem byla sloučenina identifikována jako isorhamnetin-3-*O*-glukosid (IV).

V extraktu z *C. campestris* (obr. 3) byla rovněž nalezena kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina, isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Methanolický extrakt z *C. campestris* se od extraktu z *C. europaea* kvalitativně lišil hlavně v obsahu polárnějších látek, kdy extrakt z *C. campestris* obsahoval širší spektrum látek s aromatickým kruhem než extrakt z *C. europaea*.

Závěr

V methanolickém extraktu z rostlin rodu *Cuscuta* byla vedle několika již známých látek ze skupiny fenolických kyselin nově identifikována kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a ze skupiny flavonoidů isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Je pravděpodobné, že právě tyto látky jsou zodpovědné za biologickou aktivitu extraktů z různých druhů *Cuscuta*.

Naše poděkování patří Ing. Petru Tóthovi, PhD. a Ing. Miladě Pízové za identifikaci rostlinného materiálu a PharmDr. Karlu Šmejkalovi, Ph.D. za pečlivé přečtení rukopisu.

LITERATURA

1. Cagán L., Tóth P.: *Metodika ochrany proti parazitickým burinám z rodu kukučína v agroekosystémech Slovenska*. SPU Nitra, Nitra 2005.
2. Holm L., Pancho J. V., Herberger J. P., Plucknett D. L.: *A Geographical Atlas of World Weeds*. John Wiley & Sons, New York 1979.
3. Ye M., Yan Y. N., Guo D. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1469 (2005).
4. Umehara K., Nemoto K., Ohkubo T., Miyase T., Degawa M., Noguchi H.: *Planta Med.* 70, 299 (2004).
5. Bao X., Wang Z., Fang J., Li X.: *Planta Med.* 68, 237 (2002).
6. Löffler C., Czygan F. C., Proksch P.: *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 297 (1997).

P. Hřibová^a, M. Žemlička^a, T. Bartl^b, and E. Švajdlenka^a (^a *Department of Natural Drugs*, ^b *Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Newly Identified Phenolic Compounds in Parasitic Plants *Cuscuta europaea* and *Cuscuta campestris***

Cuscuta europaea and *Cuscuta campestris* (Cuscutaceae) are annual parasitic plants which wrap around host plants and penetrate their tissues using haustoria. There are more than 150 species of *Cuscuta* worldwide; *C. europaea* and *C. campestris* are the most common species in the Czech Republic and Slovakia. In this study phenolics were identified in methanolic extracts of these species by HPLC and MS. Among others, caffeic acid, *p*-coumaric acid, isorhamnetin and isorhamnetin 3-*O*-glucoside were found in the extracts.

POLYFENOLY JABLK

MIROSLAV ONDREJOVIČ^{a,b}, TIBOR
MALIAR^{a,b}, ĽUDOVÍT POLÍVKA^a
a STANISLAV ŠILHÁR^b

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

^b Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Biocentrum, Kostolná 5, 900 01 Modra, Slovensko

ondrejovic@vup.sk

Došlo 17.5.07, prepracované 21.2.08, prijaté 25.2.08.

Kľúčové slová: polyfenoly, jablká, izolácia

Obsah

1. Úvod
2. Polyfenoly jablk
2.1. Fenolové kyseliny
2.2. Flavonoidy
3. Metódy izolácie polyfenolov
3.1. Úprava vstupnej suroviny
3.2. Voľba extrakčnej metódy
4. Záver

1. Úvod

Jablká sa zaraďujú do čeľade *Rosaceae* (ružovité), podčeľade *Pomoideae* (jabloňové) a tvoria samostatný rod *Malus* s väčším počtom druhov. Pôvod dnešných kultivarov patrí botanicky do druhu *Malus domestica* Borkh. – jablň domáca¹. Už od nepamäti je jablko súčasťou ľudskej stravy. I keď jablone patria medzi ovocné stromy pestované hlavne v miernom podnebnom pásme a iba výnimočne sa vyskytujú v chladnejších oblastiach, konzumujú sa takmer na celom svete a to tak v natívnom stave ako aj vo forme rôznych jablčných výrobkov (šťavy, mušty, destiláty, džem, ocot).

Z mnohých epidemiologických štúdií vyplýva, že konzumácia ovocia a teda aj jablk pomáha pri znižovaní rizika vzniku širokej palety chronických ochorení, akými sú napríklad rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, astma a cukrovka^{2,3}. Konzumácia jablk sa tiež spája so znižovaním hmotnosti, zlepšením funkcie pľúc⁴ a celkového zdravotného stavu konzumentov⁵.

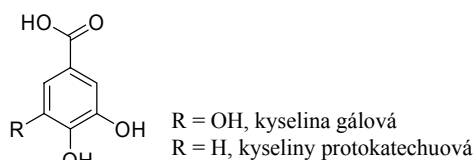
Hlavnými zložkami jablk, ktoré sú v literatúre charakterizované ako biologicky významné sekundárne metabolity zodpovedné za pozitívne účinky na ľudské zdravie, sú polyfenolové látky. Tak ako ostatné sekundárne metabolity

rastlín sú i polyfenoly produkované počas bežného vývoja a v odozve na stresové podmienky (infekcia, poranenie, UV žiarenie, zvýšená salinita pôdy a prítomnosť ťažkých kovov v prostredí). Ich biosyntetické dráhy vychádzajú z fenylalanínu a tyrozínu.

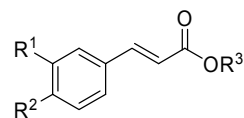
Polyfenoly sú v rastlinách na úrovni pletív, celulárnych a subcelulárnych jednotiek nerovnomerne rozmiestnené. Zatiaľ čo nerozpustné polyfenoly (prevažne ligníny) sú súčasťami bunkových stien a tvoria mechanickú oporu rastlinnej hmoty⁶, rozpustné fenolové látky sú začlenené vo vakuolách a špeciálnych plastidoch^{7,8}. V rastlinách tieto látky pôsobia ako ochrana voči UV žiareniu ale tiež ako fytoalexíny, antifeedanty, atraktanty pre opel'ovačov, pigmenty a antioxidanty.

2. Polyfenoly jablk

Polyfenolové látky jablk možno funkčne rozdeliť do dvoch veľkých skupín, a to skupina fenolových kyselín zahŕňajúca deriváty kyseliny benzoovej (kyselina galová a protokatechuová, obr. 1) a deriváty kyseliny škoricovej (kyselina kumárová, kávová, ferulová, chlorogénová, kumaroylchinónová, obr. 2), a skupina flavonoidov pozostávajúca z flavanolov (kvercetin, izoramnetín a ich glykozidy), flavan-3-olov (katechín, epikatechín, prokyanidíny), dihydrochalkónov (floretnín a jeho glykozidy) a antokyanínov (kyanidín a jeho glykozidy)^{2,9}.



Obr. 1. Deriváty kyseliny benzoovej vyskytujúce sa v jablkách



R¹ = H, R² = OH, R³ = H, k. kumárová
R¹ = OH, R² = OH, R³ = H, k. kávová
R¹ = OH, R² = OCH₃, R³ = H, k. ferulová
R¹ = OH, R² = OH, R³ = k. chinónová, k. chlorogénová
R¹ = H, R² = OH, R³ = kyselina chinónová, k. kumaroylchinónová

Obr. 2. Deriváty kyseliny škoricovej nachádzajúce sa v jablkách

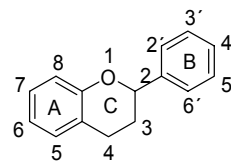
2.1. Fenolové kyseliny

Skupina fenolových kyselín sa delí na základe ich chemickej štruktúry na deriváty kyseliny benzoovej a deriváty kyseliny škoricovej. Deriváty kyseliny benzoovej sa v rastlinách vyskytujú len veľmi zriedkavo. Výnimkou je ovocie a niektoré druhy zeleniny (čierna reďkovka, cibuľa). V týchto komoditách dosahuje koncentrácia derivátov kyseliny benzoovej až niekoľko desiatok miligramov na kilogram natívnej rastlinnej hmoty¹⁰. V prírode sú prítomné prevažne viazané so sacharidmi alebo organickými kyselinami. V jablkách sa nachádzajú hlavne dva deriváty kyseliny benzoovej, a to kyselina protokatechuová a kyseliny galové vyskytujúca sa vo forme hydrolyzovateľných tanínov (galotaníny a elagitaníny). Biologické vlastnosti týchto látok nie sú síce doposiaľ dostatočne preskúmané¹⁰, no napriek tomu už boli publikované antioxidačné¹¹, protizápalové účinky galotanínu inhibíciou expresie chymikínov a cytokínov na molekulovej i molekulárno-biologickej úrovni^{12,13}, antikancerogénne¹⁴ a hypolipidemické účinky inhibíciou skvalénovej dráhy v mieste syntézy farnezyly¹⁵.

Deriváty kyseliny škoricovej sa častejšie vyskytujú ako deriváty kyseliny benzoovej. V natívnom rastlinnom materiáli sa len výnimočne nachádzajú vo voľnej forme, zväčša sú naviazané na sacharidovú časť alebo esterovo viazané s kyselinou chinovou, šikimovou a tartarovou. Ich uvoľnenie zo spomínaných foriem nastáva počas mrazenia, sterilizácie alebo fermentácie daného rastlinného materiálu. Jablká spolu s čučoriedkami, slivkami a čerešňami patria medzi ovocie s najvyššími koncentraciami derivátov kyseliny škoricovej, medzi ktoré zaraďujeme hlavne kyselinu kumárovú, ferulovú, kumaroylchinónovú, kávovú a kyselinu chlorogénovú, ktorej koncentrácia v jablkách sa pohybuje v rozsahu 0,5–2 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Z biologických účinkov derivátom kyseliny škoricovej je asi najznámejšia protinádorová aktivita¹⁶. Okrem nej je známy tiež imunosupresívny účinok¹⁷, inhibičná aktivita voči skupine enzýmov trypsínovej rodiny (príkladom môže byť trypsin spôsobujúci pankreatitídu), trombínu, plazmínu, hemokoagulačných faktorov (pri poruchách koagulácie a fibrinolýzy), faktorom komplementu (pri autoimunitných ochoreniach) a dokonca voči niektorým derivátom schopným zasahovať do hormonálnych procesov prostredníctvom interakcie s príslušnými receptormi¹⁸.

2.2. Flavonoidy

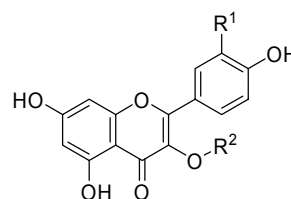
V súčasnosti je známych viac ako 6400 rôznych flavonoidov vyskytujúcich sa v rastlinnej ríši¹⁹. Ich základnú štruktúru tvorí flavánové jadro alebo 2-fenyl-benzo- γ -pyrán (obr. 3). Táto štruktúra je charakteristická pre 3-deoxyflavonoidy (flavóny, flavanóny, izoflavóny a neoflavóny) a 3-hydroxyflavonoidy (flavonoly, antokyaníny, flavan-3,4-dioly a flavan-3-oly). Flavonoidy sa najčastejšie vyskytujú vo forme glykozidov, nakoľko táto forma im umožňuje vyššiu rozpustnosť v bežných fyziologických podmienkach rastlinnej bunky²⁰ a zároveň znižuje ich reak-



Obr. 3. Základná štruktúra flavonoidov – flavánové jadro

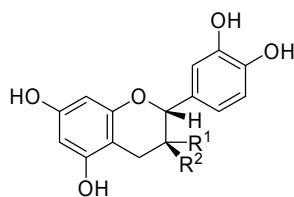
tivitu a zabezpečuje lepšiu stabilitu¹⁹. Naviac, ako uvádzajú Van Buren a spol.²¹, glykozidy flavonoidov nie sú substrátom pre polyfenoloxidázu a teda nepodliehajú tzv. enzýmovému hnednutiu, nakoľko bolo zistené, že cukorná zložka naviazaná na flavonoidový skelet sterickejšie prekáža tomuto enzýmu. Glykozidovou časťou flavonoidov býva obvykle glukóza, galaktóza, ramnóza, xylóza a arabinóza¹⁹.

Flavonoly sú prítomné približne v 80 % vyšších rastlín. Keďže ich biosyntéza je stimulovaná svetlom, nachádzajú sa vo vonkajších obalových pletivách. Sfarbenie flavonolov (vrátane glykozidov) sa pohybuje od slonovinej až po žltú²². V jablkách sú flavonoly zastúpené hlavne kvercetínom a izoramnetínom (3'-O-metyl derivát kvercetínu) (obr. 4). V ovoci sa často ten istý flavonol vyskytuje viazaný na rôzne sacharidy a často vytvára paletu 5 až 10 rôznych glykozidov¹⁰. Vhodným príkladom tohto tvrdenia sú i jablká, Alonso-Salces a spol.⁹ zistili, že vzorka testovaných jabĺk obsahovala šesť rôznych glykozidov kvercetínu a šesť rôznych glykozidov izoramnetínu. Kvercetín a izoramnetín vykazujú antioxidačnú, protirakovinovú, protizápalovú²³ a antimikrobiálnu aktivitu dokázanú *in vitro* ako aj *in vivo*. Okrem toho je známa ich inhibičná aktivita voči špecifickým enzýmom: cyklooxygenázy-1 (COX-1), cyklooxygenázy-2 (COX-2)²⁴, aromátázy, adenylát cyklázy, topoizomerázy, NO syntetázy (NOS-II), proteín kinázy a kalmodulínu, ktoré sú označované ako efekторы zápalových a nádorových ochorení^{25,26}. Okrem



- R¹ = OH, R² = H, kvercetín
 R¹ = OH, R² = galaktóza, kvercetín-3-O-galaktozid
 R¹ = OH, R² = glukóza, kvercetín-3-O-glukozid
 R¹ = OH, R² = ramnóza, kvercetín-3-O-ramnozid
 R¹ = OCH₃, R² = H, izoramnetín
 R¹ = OCH₃, R² = glukóza, izoramnetín-3-O-glukozid
 R¹ = OCH₃, R² = ramnoglukóza, izoramnetín-3-O-ramnoglukozid

Obr. 4. Flavonoly vyskytujúce sa v jablku



R¹ = H, R² = OH, katechín
R¹ = OH, R² = H, epikatechín

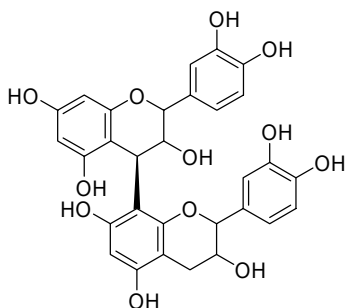
Obr. 5. Flavan-3-oly nachádzajúce sa v jablkách

toho vykazujú i inhibičnú účinnosť voči HIV integrázy, reverznej transkriptázy, HIV proteinázy²⁷.

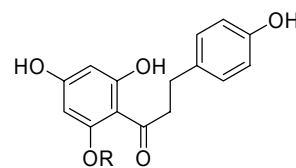
Kvercetin pôsobí tiež ako inhibítor oxidácie LDL (low density lipoprotein) *in vitro*, pri imunologických odpovediach rôzneho typu a spolu s ostatnými flavonoidmi je účinný proti širokému spektru civilizačných ochorení²⁵. Interakcie kvercetinu s DNA sa predpokladajú prostredníctvom hydrofóbnej časti jeho molekuly²⁸.

Flavan-3-oly sa vyskytujú vo voľnej (katechíny) alebo polymernej forme (proantokyandíny) (obr. 5). Výrazným znakom tejto skupiny flavonoidov je to, že netvoria glykozidy. Katechíny sa nachádzajú v rôznych druhoch ovocia¹⁰. V jablkách sa ich koncentrácia pohybuje od 2,6 do 9,6 mg g⁻¹ sušiny²⁹. Vyskytujú sa tu prevažne epiméry katechín a epikatechín. Ich funkcia je pravdepodobne nasmerovaná na ochranu rastliny, pretože, ako uvádzajú Bais a spol.³⁰, katechín i epikatechín vykazujú antioxidačnú^{31–33}, antibakteriálnu a antivírusovú aktivitu^{34,35}. Vo farmaceutickom výskume bola zistená ich antialergická³⁶, protinádorová^{37,38}, hepato- a gastroprotektívna^{36,39} a anti-koagulačná aktivita⁴⁰. V kontraste s glykozylovanými flavonolmi sú flavan-3-oly veľmi dobrým substrátom pre polyfenoloxidázu.

Prokyanidíny (taníny) predstavujú dimérne, oligomérne a polymérne štruktúry katechínových jednotiek pospájaných C4 a C8 (prípadne C6) väzbami¹⁰ (obr. 6). Známa je tvorba esterov s kyselinou galovou⁴¹. V jablčnom mušte sa stupeň polymerizácie týchto látok pohybuje od 4 do 11



Obr. 6. Prokyanidín B2 – predstaviteľ dimérnych katechínových štruktúr spojených C4–C8 väzbou



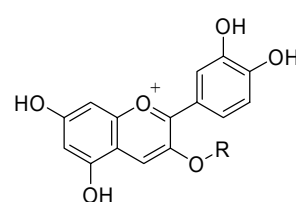
R = H, floretín
R = glukóza, floridzín
R = xyloglukóza, floretín-2'-O-xyloglukozid

Obr. 7. Dihydrochalkóny vyskytujúce sa v jablkách

jednotiek. Taníny vďaka schopnosti tvoriť komplexné zlúčeniny s proteínmi nachádzajúcimi sa v slinách sú zodpovedné za horkastú chuť jabĺk a jablčných štiav^{10,42}. Vykazujú predovšetkým antioxidačnú aktivitu a schopnosť vychytávať reaktívne formy kyslíka a dusíka. Sú tiež známe ich imunomodulačné funkcie^{41,43}.

Floretín je dihydrochalkón, ktorý sa výlučne vyskytuje v jablkách, a to prevažne vo forme glukozidu, presnejšie 5-O-glukozidu floretínu (floridzín) (obr. 7). Floridzín je prítomný predovšetkým v semenách, stonkách, listoch a len v minimálnych množstvách v šupke či dužine. Najčastejšie popisovaný biologický účinok floridzínu je inhibícia sorbie glukózy v intestinálnom trakte prostredníctvom kotransportéru 1-D-glukózy (SGLT1). Táto vlastnosť klasifikuje floridzín ako antidiabetické činidlo. Floretín tiež inhibuje proteín GLUT2 zabezpečujúci ľahší transport glukózy nachádzajúci sa na bázolaterálnom reťazci enterocytov⁴⁴. Cowan⁴⁵ popisuje floretín ako antimikrobiálnu látku so širokým spektrom účinnosti, zatiaľ čo Ehrenkranz a spol.⁴⁶ ho označili za fungicídnu zlúčeninu.

Antokyaníny (obr. 8) dodávajú rastlinám ich charakteristické sfarbenie (ružové, oranžové, červené, modré, fialové). Nachádzajú sa rozpustené vo vakuolách epidermálnych a subepiderálnych buniek kvetov a plodov a niekedy aj vo sférických váčkoch nazývaných antokyanoplasty⁸. Antokyaníny sa vyskytujú v rovnováhe štyroch molekulárnych foriem: červený flavilínový kation, bezfarebná pseudobáza, bezfarebný chalkón a modrá chi-



R = H, kyanidín
R = galaktóza, kyanidín-3-galaktosid

Obr. 8. Antokyaníny nachádzajúce sa v jablku

noidná báza. Ich farba je silne závislá na pH⁴⁷. Vo forme aglykónov sú vysoko nestabilné, a preto sa najčastejšie vyskytujú v glykozidovej forme (glukóza v polohe 3), prípadne stabilizované esterovou väzbou s rôznymi alifatickými (kyselina citrónová a jablčná) či aromatickými kyselinami (deriváty kyseliny škoricovej a benzoovej), čím vzrastá ich tolerancia k svetlu, pH a podmienkam oxidačného stresu. Jednou z ďalších možností stabilizácie antokyanínov je tvorba komplexov s inými flavonoidmi (kopigmentácia). V ľudskej strave sa nachádzajú v ovoci a zelenine prevažne v šupkách a len ojedinele v dužine (čerešne a jahody). V jablkách sa vyskytuje kyanidín v koncentrácii približne 2–4 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Biologické aktivity antokyanidínov sú publikované veľmi široko, z veľkého množstva publikovaných prác možno spomenúť antioxidačné účinky⁴⁸, protinádorové účinky⁴⁹ ako aj gastroprotektívne, anticeluratívne účinky⁵⁰.

3. Metódy izolácie polyfenolov

Rastlinný materiál je tak fyzikálne ako aj látkovo heterogénna surovina vyznačujúca sa rôznorodosťou bunkovej štruktúry. Z hľadiska extrakcie je možné deliť rastlinný materiál na dve časti: (i) stavebný materiál (skelet bunky) a (ii) fytochemikálie vyskytujúce sa v bunkách ako aj v medzibunkovom priestore⁵¹.

Extrakciu fenolových látok z rastlinného materiálu môžu výrazne ovplyvňovať:

- fyzikálno-chemické vlastnosti, kde je možné vykonať predikciu na základe poznania chemickej štruktúry žiadaného fenolu,
- spôsob predúpravy materiálu (sušenie, mrazenie, homogenizácia) má vplyv na zloženie, stabilitu extrahovaných látok a rýchlosť prenosu hmoty pri extrakcii^{51,52},
- voľba extrakčnej metódy je významná hlavne vzhľadom k výťažnosti a náročnosti následnej izolácie a purifikácie polyfenolov^{53,54}.

Keďže fenolové látky v rámci jednotlivých tried i v rámci celej skupiny majú zabudované vo svojom skelete podobné chemické štruktúry, je možné predpokladať, že extrakty rastlinného materiálu budú vždy zmesou rôznych tried fenolových látok, ktoré sú rozpustné za daných podmienok. Preto sa pri izolácii fytochemikálií často všeobecne zaraďujú kroky slúžiace na odstránenie neželaných fenolových látok a tiež nefenolových zlúčenín vystupujúcich ako nečistoty vo výslednom extrakte (napríklad vosky, tuky, terpény a chlorofyly)⁵⁵.

3.1. Úprava vstupnej suroviny

Na získanie maximálnych výťažkov extrakcie je vhodné pred extrakciou daný rastlinný materiál vhodne uskladniť a upraviť. Mrazenie a lyofilizácia vzorky sa volí hlavne v prípadoch, ak izolované látky môžu podliehať nežiadúcim enzymatickým reakciám v samotnom rastlinnom materiáli prípadne prostredníctvom mikrobiálnej

kontaminácie. Inou možnosťou uchovania extrakčného materiálu pred rozkladom je sušenie, ktoré však v určitých prípadoch znižuje výťažnosť extrakcie (napríklad katechínov) a navyš je tu možnosť tepelného rozkladu žiadaných zlúčenín⁵¹.

Predextrakčná úprava vzorky predstavuje odstránenie bariér brániacich difúzii extrahovaných látok. V rastlinných pletivách sú to hlavne membránové útvary a medzibunková pojivová hmota (extracelulárny matrix). Na uľahčenie difúzných procesov pri extrakcii sa často využíva homogenizácia rastlinného materiálu⁵². Vo všeobecnosti poznáme dva typy homogenizácie a to fyzikálnu a chemickú homogenizáciu.

Medzi fyzikálne homogenizačné metódy môžeme zaradiť mechanické rozdrobenie vzorky (na rôzne veľké výsledné častice), sušenie a zmrazovanie. Sušením sa narušujú membránové útvary a vznikajú v nich otvory, cez ktoré môžu intracelulárne látky ľahšie prechádzať do extraktu. Zmrazovanie okrem toho, že je výhodnou možnosťou uchovania rastlinného materiálu, patrí medzi homogenizačné postupy, pretože pri znížení teploty pod bod tuhnutia vody sa v bunkách rastlinného materiálu vytvárajú kryštály ľadu narušujúce integritu buniek, čím sa po rozmrazení uľahčí extrakčný proces⁵².

Hlavnou chemickou homogenizačnou metódou predúpravy vzorky je extrakcia rastlinného materiálu lipofilným rozpúšťadlom. Používa sa hlavne pri vzorkách s vysokým obsahom lipidových zlúčenín. Keďže enzýmy sú zaraďované medzi katalyzátory chemických reakcií, je možné do tejto skupiny zaradiť enzýmovú hydrolýzu bunkových stien. Na tento účel sa používajú hlavne pektínázy a celulázy, ktoré rozrušujú pektíny a celulózu ako hlavné stavebné kamene bunkových stien a medzibunkovej pojivovej hmoty rastlinných pletív.

Uvedené kroky predúpravy vzorky možno vzájomne kombinovať a meniť podmienky, pri ktorých jednotlivé procesy prebiehajú (napríklad pri sušení teplota a doba sušenia). V literatúre sa zväčša používajú sušenie a následná mechanická homogenizácia alebo už autori priamo vychádzajú zo sušeného materiálu vo forme prášku⁵².

3.2. Voľba extrakčnej metódy

Extrakčná metóda zahŕňa niekoľko parametrov výrazne vplyvajúcich na kvantitatívnu a kvalitatívnu kompozíciu extraktov. Medzi najdôležitejšie parametre extrakčných metód patria – voľba extrakčného činidla, pH prostredia, teplota extrakcie, pomer množstva materiálu k množstvu extrakčného činidla, počet stupňov a doba extrakcie.

Voľba extrakčného činidla závisí na rozpustnosti extrahovanej zložky⁵¹. Rozpustnosť fenolových látok v danom rozpúšťadle je určená jej fyzikálno-chemickými vlastnosťami, stupňom glykozylácie fenolových látok alebo ich prítomnosťou vo forme Na solí reakciou s polárnymi bázami sa zvyšuje ich rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách. Menej polárne aglykóny, akými sú izoflavóny, flavanóny, a vyššie metoxylované flavó-

ny a flavonoly, sú rozpustnejšie v nepolárnych rozpúšťadlách. Preto neexistuje univerzálny postup na izoláciu všetkých polyfenolov, prípadne špecificky jednej triedy týchto látok z rastlinného materiálu⁵⁶.

Pri získavaní polyfenolov sa často používa extrakcia vodou (pH 1,5–10), metanolom⁵⁷, etanolom⁵⁸ a acetónom⁵⁹ s následnou extrakciou lipofilnými organickými rozpúšťadlami (*n*-hexán, benzén, chloroform, etylacetát, dietyléter) volenými na základe fyzikálnych vlastností žiadaných fenolových látok^{19,59}. Menej sa používajú propanol, *n*-butanol a dimetylformamid⁶⁰ prípadne dichlórmetán⁶¹. Známe sú i extrakčné činidlá tvorené vodným roztokom metanolu⁶², etanolu⁶³, acetónu⁶⁴ a izopropanolu⁶⁵ a kombináciou spomínaných rozpúšťadiel⁶⁶.

Hodnota pH prostredia extrakcie je významná hlavne vo väzbe na rozpustnosť cieľových zlúčenín pri danom pH. Je vo všeobecnosti známe, že pri pH približne 10 sa vyskytuje väčšina organických kyselín vo forme solí, pri pH 2 je vo forme solí väčšina organických báz, ktoré sú vo vodnom prostredí vysoko rozpustné a naopak nedostupné pre organické rozpúšťadlo.

Teplota extrakcie významne ovplyvňuje výsledný extrakt. Vyššie teploty umožňujú zvýšiť permeabilitu buniek, difúzny koeficient a rozpustnosť extrahovaných látok, ale tiež skrátiť dobu extrakcie a znížiť viskozitu systému. Avšak teploty príliš vysoké môžu spôsobiť rozklad žiadaných látok^{19,52} prípadne zvyšovať rýchlosť nežiadúcich reakcií (oxidačné reakcie pri izolácii polyfenolov), ktoré sa dajú čiastočne tlmiť prídavkom špecifických látok (napríklad butylhydroxytoluén – BHT). V práci Graziani a spol.⁶⁷ sa extrahovali polyfenolové látky z vymrazených jabĺk s 1% metanolovým roztokom BHT.

Pomer množstva materiálu k množstvu výluhu sa volí na základe sorpčnej schopnosti tuhej fázy a rozpustnosti extrahovaných látok⁵¹. Je veľmi dôležité zvoliť správny pomer, nakoľko príliš nízky pomer spôsobuje nedostatočné vyčerpanie suroviny a príliš vysoký pomer môže zhoršiť ďalšiu prácu s extraktom, nakoľko sa do extraktu môže extrahovať väčšie množstvo balastných látok. V štúdií Shahidi a Naczek⁶⁸ sa zistilo, že pri extrakcii kanoly so 70% acetónom zmena pomeru medzi náväzkom rastlinného materiálu a extrakčným činidlom z 1:5 na 1:10 zvýšilo výťažnosť extrakcie kondenzovaných tanínov z 257,3 mg na 321,3 mg/100 g suroviny a celkových polyfenolov z 773,5 mg na 805,8 mg/100 g suroviny.

S počtom extrakčných stupňov stúpa výťažnosť extrakcie. To znamená, že je efektívnejšie extrahovať to isté množstvo materiálu štyrikrát s 50 ml ako jedenkrát s 200 ml rozpúšťadla. Kvantitatívne výťažky sú získavané maximálne 3–5 stupňovou extrakciou. Ďalšie extrakcie sa stávajú neefektívne vzhľadom na množstvo vyextrahovaných látok⁵².

Doba extrakcie sa pohybuje v závislosti od druhu a spôsobu predúpravy rastlinného materiálu a rozpustnosti cieľových zlúčenín od 30 sekúnd až po 2 týždne⁶².

Izolačné postupy získavania polyfenolových látok jabĺk sú v súlade s uvedenými extrakčnými postupmi aplikovateľnými na iné rastlinné materiály^{69–74}.

4. Záver

Z uvedeného je zjavné, že polyfenolové látky jabĺk vykazujú širokú paletu biologických účinkov. Tieto látky je možné získať rôznymi izolačnými postupmi, a to tak zo zrelých a nezrelých jabĺk, ako aj z odpadu po spracovaní jabĺk vznikajúceho pri výrobe jablkových štiav a koncentrátov obsahujúceho relatívne veľké zostatkové množstvo polyfenolových látok (floridzín, kyselina chlorogénová, epikatechín a glykozidy kvercetínu). Pripravené preparáty je možné využiť tak v potravinárskom priemysle vo forme aditívnych prísad do potravín na stabilizáciu a zlepšenie senzorických vlastností potravín, ako aj vo farmaceutickom priemysle ako prírodné preparáty použiteľné na liečenie niektorých civilizačných ochorení, alebo na preventívno-lekárské účely.

LITERATÚRA

1. Cifranič P., Hnádzik F., Hričovský I., Župnik M.: *Poľnohospodárstvo. Príroda*, Bratislava 1978.
2. Aprikian O., Duclos V., Guyot S., Besson C., Manach C., Bernalier A., Morand C., Rémésy C., Demigné C.: *J. Nutr.* 133, 1860 (2003).
3. Shoji T., Akazome Y., Kanda T., Ikeda M.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 959 (2004).
4. Shaheen S. O., Sterne J. A. C., Thompson R. L., Songhurst C. E., Margetts B. M., Burney P. G. J.: *Am. J. Respir. Critical Care Medicine* 164, 1823 (2001).
5. Boyer J., Liu R. H.: *Nutr. J.* 3, 1 (2004).
6. Häkkinen S.: *Dissertation*. University of Kuopio, Kuopio 2000.
7. Beckman C. H.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 101 (2000).
8. Harborne J. B.: *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London 1994.
9. Alonso-Salces R. M., Ndjoko K., Queiroz E. F., Ioset J. R., Hostettmann K., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: *J. Chromatogr., A* 1046, 89 (2004).
10. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727 (2004).
11. Wei T., Sun H., Zhao X., Hou J., Hou A., Zhao Q., Xin W.: *Life Sci.* 70, 1889 (2002).
12. Erdölyi K., Kiss A., Bakondi E., Bai P., Szaböl C., Gergely P., Erdödi F., Virag L.: *Mol. Pharmacol.* 68, 895 (2005).
13. Rapizzi E., Fossati S., Moroni F., Chiarugi A.: *Mol. Pharmacol.* 66, 890 (2004).
14. Al-Ayyoubi S., Gali-Muhtasib H.: *Mol. Carcinog.* 46, 176 (2007).
15. Chen X., Hasuma T., Yano Y., Yoshimata T., Morishima Y., Wang Y., Otani S.: *Anticancer Res.* 17, 2555 (1997).
16. Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S., Nozawa Y.: *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1057 (2003).
17. Tsuzurahara K.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 102 (1977).
18. Chang H. K., Hsu F. L., Liu I. M., Cheng J. T.: *J.*

- Pharm. Pharmacol. 55, 833 (2003).
19. Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mittal G., Kakuda Y., Jiang Y.: Food Rev. Int. 21, 139 (2005).
 20. Erlund I.: *Dissertation*, University of Helsinki, Helsinki 2002.
 21. Van Buren J., De Vos L., Pilnik W.: J. Agric. Food Chem. 24, 448 (1976).
 22. Harborne J. B.: *Comparative Biochemistry of The Flavonoids*. Academic Press, London 1967.
 23. Boyer J., Brown D., Liu R. H.: Nutr. J. 11, 1 (2005).
 24. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., Matsushima-Hibiya Y., Mutoh H., Sugimura T., Wakabayashi K.: Carcinogenesis 21, 959 (2000).
 25. Formica J. V., Regelson W.: Chem. Toxicol. 33, 1061 (1995).
 26. Mamani-Matsuda M., Rambert J., Malvy D., Lejoly-Boisseau H., Daulouéde S., Thiolat D., Coves S., Courtois P., Vincendeau P., Mossalayi M. D.: Antimicrob. Agents Chemother. 48, 924 (2004).
 27. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharis T. C.: Pharmacol. Rev. 52, 673 (2000).
 28. Mendoza-Wilson A. M., Glossman-Mitnik D.: J. Mol. Struct. (Theochem) 681, 71 (2004).
 29. Schieber A., Hilt P., Streker P., Endress H. U., Rentschler C., Carle R.: Innovative Food Sci. Emerging Technol. 4, 99 (2003).
 30. Bais H. P., Walker T. S., Stermitz F. R., Hufbauer R. A., Vivanco J. M.: Plant Physiol. 128, 1173 (2002).
 31. Rossetto M., Vanzani P., Mattivi F., Lunelli M., Scarpa M., Rigo A.: Arch. Biochem. Biophys. 408, 239 (2002).
 32. Pedrielli P., Skibsted L. H.: J. Agric. Food Chem. 50, 7138 (2002).
 33. Singh D., Chander V., Chopra K.: Pharmacol. Rep. 57, 70 (2005).
 34. Hisano M., Yamaguchi K., Inoue Y., Ikeda Y., Iijima M., Adachi M., Shimamura T.: Arch. Dermatol. Res. 295, 183 (2003).
 35. Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H.: Planta Med. 67, 240 (2001).
 36. Shiozaki T., Sugiyama K., Nakazato K., Takeo T.: Yakugaku Zasshi 117, 448 (1997).
 37. Conte A., Pellegrini S., Tagliazucchi D.: Drugs Exp. Clin. Res. 29, 243 (2003).
 38. Fan X. J.: Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 14, 190 (1992).
 39. Perrissoud D., Maignan M. F., Dumont J. M.: Liver 5, 55 (1985).
 40. He Y. S.: Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2, 15 (1982).
 41. Hammerstone J. F., Lazarus S. A., Schmitz H. H.: J. Nutr. 130, 2086 (2000).
 42. Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E. J.: J. Sci. Food Agric. 83, 564 (2003).
 43. Akiyama H., Sato Y., Watanabe T., Nagaoka M. H., Yoshioka Y., Shoji T., Kanda T., Yamada K., Totsuka M., Teshima R., Sawada J., Goda Y., Maitani T.: Federation Eur. Biochem. Soc. 579, 4485 (2005).
 44. Crespy V., Aprikian O., Morand Ch., Besson C., Manach C., Demigné C., Rémésy C.: Nutrient Metabolism – Res. Commun. 2001, 3227.
 45. Cowan M. M.: Clin. Microbiol. Rev. 12, 564 (1999).
 46. Ehrenkranz J. R. L., Lewis N. G., Kahn C. R., Roth J.: Diabetes Metab. Res. Rev. 21, 31 (2005).
 47. Clifford M. N.: J. Sci. Food Agric. 80, 1063 (2000).
 48. Afaq F., Syed D. N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Kweon M. H., Khan N., Zaid M. A., Mukhtar H.: J. Invest. Dermatol. 127, 222 (2007).
 49. Lin X.X., Zhu S.M.: Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 30, 1147 (2005).
 50. Magistretti M. J., Conti M., Cristoni A.: Arzneimittelforschung 38, 686 (1988).
 51. Hanika J.: *Speciální separační procesy*. VŠCHT, Praha 1999.
 52. Santos-Buelga C., Williamson G.: *Methods in Polyphenol Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
 53. Yrjönen T.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2004.
 54. Peng J., Fan G., Chai Y., Wu Y.: J. Chromatogr., A 1102, 44 (2006).
 55. Robbins R. J.: J. Agric. Food Chem. 51, 2866 (2003).
 56. Robards K., Antolovich M.: Analyst 112, 11 (1997).
 57. Delaporte R. H., Sarragiotto M. H., Takemura O. S., Sánchez G. M., Filho B. P. D., Nakamura C. V.: J. Ethnopharmacol. 95, 229 (2004).
 58. Ponce M. A., Scervino J. M., Erra-Balsells R., Ocampo J. A., Godeas A. M.: Phytochemistry 65, 1925 (2004).
 59. Martini N. D., Katerere D. R. P., Eloff J. N.: J. Ethnopharmacol. 93, 207 (2004).
 60. Nacz M., Shahidi F.: J. Chromatogr., A 1054, 95 (2004).
 61. Mendoza L., Wilkens M., Urzúa A.: J. Ethnopharmacol. 58, 85 (1997).
 62. Nitta T., Arai T., Takamatsu H., Inatomi Y., Murata H., Iinuma M., Tanaka T., Ito T., Asai F., Ibrahim I., Nakanishi T., Watabe K.: J. Health Sci. 48, 273 (2002).
 63. Pessini G. L., Filho B. P. D., Nakamura C. V., Cortez D. A. G.: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 1115 (2003).
 64. Rauha J. P.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2001.
 65. Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J.: Bioresour. Technol. 96, 1709 (2005).
 66. Molnár-Perl I., Füzfa Z.: J. Chromatogr., A 1073, 201 (2005).
 67. Graziani G., D'Argenio G., Tuccillo C., Loguercio C., Ritieni A., Morisco F., Del Vecchio Blanco C., Fogliano V., Romano M.: Gut 54, 193 (2005).
 68. Nacz M., Shahidi F., Sullivan A.: Food Chem. 45, 51 (1992).
 69. Alonso-Salces R. M., Korta E., Barranco A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: J. Chromatogr., A 933, 37 (2001).
 70. Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau

- J. F.: J. Agric. Food Chem. 46, 1698 (1998).
71. Guyot S., Doco T., Souquet J. M., Moutounet M., Drilleau J. F.: *Phytochemistry* 44, 351 (1997).
72. Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P.: *Chem. Listy* 100, 522 (2006).
73. Cvengroschová M., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 101, 287 (2007).
74. Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horácková V.: *Chem. Listy* 101, 584 (2007).

M. Ondrejovič^{a,b}, T. Maliar^{a,b}, E. Polívka^a, and S. Šilhár^b (^a*Department of Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of St. Cyril and Methodius, Trnava, Slovak Republic*, ^b*Food Research Institute, Bio-centre, Modra, Slovak Republic*): **Apple Polyphenols**

The short review is focused on apple polyphenols – their classification, biological activities and methods of isolation. The polyphenols are classified according to their chemical structure. Specific isolation methods for selected compounds are given.

KATIONICKÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY

TEREZA NEUBAUEROVÁ^{a,b}, MARTINA
MACKOVÁ^{a,b}, TOMÁŠ MACEK^{a,b}
a BOHUMÍR KOUTEK^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

tereza.neubauerova@vscht.cz;

martina.mackova@vscht.cz; tom.macek@uochb.cas.cz;

bohumir.koutek@uochb.cas.cz

Došlo 3.7.08, přijato 16.1.09.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, kationické peptidy, imunitní odezva, buněčná membrána, rezistence k antibiotikům

Obsah

1. Význam a historické aspekty antibiotik
2. Imunitní systém
 - 2.1. Imunitní systém hmyzu
 - 2.2. Signální kaskády – nástroje ovládající expresi indukovatelných antimikrobiálních peptidů
 - 2.3. Imunitní systém obratlovců
 - 2.4. Imunitní systém rostlin
3. Antimikrobiální peptidy
 - 3.1. Obecná kritéria pro působení antimikrobiálních peptidů
 - 3.2. Specifita a selektivní toxicita antimikrobiálních peptidů
 - 3.3. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů
 - 3.4. Typy kationických antimikrobiálních peptidů
 - 3.4.1. Antimikrobiální proteiny
 - 3.4.2. Lineární peptidy
 - 3.4.3. Peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky
 - 3.4.4. Posttranslační modifikace antimikrobiálních peptidů
 - 3.5. Použití antimikrobiálních peptidů

1. Význam a historické aspekty antibiotik

Objev penicilinu sirem Alexandrem Flemingem v roce 1929 znamenal velký průlom v boji proti infekcím. Od roku 1943 byl penicilin zařazen do klinické praxe a byla objevena řada antibiotik bakteriálního původu: baci-

tracin (*Bacillus subtilis*), streptomycin (*Streptomyces griseus*), chloramfenikol (*Streptomyces venezuelae*), oxytetracyklin (*Streptomyces rimosus*), erythromycin (*Streptomyces erythreum*) a další¹. Jejich aktivita směřovaná proti patogenním mikroorganismům a jejich cílené využití v lékařství, zejména v chirurgii či chemoterapiích, prodloužilo průměrnou délku života o 8 let (cit.²).

Přes prvotní úspěchy antibiotik mělo jejich užití i negativní dopad. Díky adaptabilitě mikrobiálního a především bakteriálního genomu – vznik mutací a výměna plasmidů kódující rezistenci – reagovaly bakteriální kmeny tvorbou různých mechanismů, díky kterým se staly rezistentní na dostupná antibiotika^{2,3}. Nedůsledné až zbytečné používání antibiotik včetně jejich přidávání do krmiv hospodářských zvířat nežádoucí rozvoj mikrobiální rezistence urychlilo. Objev několika nových rodin antibiotik v posledních třiceti letech nedostatečně reagoval na nárůst rezistentních bakteriálních kmenů a infekční onemocnění začala opět představovat hrozbu⁴.

V roce 1940, ještě před uvedením penicilinu do klinické praxe, se objevily první rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* na penicilin. Byla připravena další beta-laktamová antibiotika, která byla zpočátku dobře účinná, avšak začátkem 60. let se objevily kmeny, které byly rezistentní i k těmto beta-laktamovým antibiotikům včetně methicilinu. V 70. letech se kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA) staly po celém světě hlavní příčinou nosokomiálních infekcí. Zastoupení rezistentních kmenů MRSA v ČR vzrostl mezi roky 2000 až 2005 ze 4,3 % na 12,9 % (cit.⁵). Na tyto kmeny dosud účinně působí pouze vankomycin, ale v roce 1997 byly izolovány i první kmeny vykazující rezistenci vůči vankomycinu⁶. Podobně krizová situace je např. i u bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, která způsobuje tuberkulózu. Následkem její multirezistence vůči antibiotikům a chemoterapeutikům se odhaduje, že každý desátý případ plicní tuberkulózy je smrtelný. Častá tvorba multirezistencí je spojena s nosokomiálními infekcemi, které postihují zejména pacienty s oslabenou imunitou.

V současné době výroba antibiotik představuje jedno z největších odvětví farmaceutického průmyslu, ale mnoho nových typů antibiotik nepřibývá⁷. Hledání látek s novým mechanismem účinku obrátilo pozornost k nejstarším obranným mechanismům – kationickým peptidům.

2. Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismů. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává potenciální patogeny od hostitelských buněk. Imunitní systém se obecně skládá z odvětvých nespecifických kaskád a reakcí a evolučně

mladších, specifických mechanismů (T- a B- lymfocyty – tzv. buňky s pamětí). Pouze u obratlovců byly pozorovány oba typy imunity, přesto miliony let staré mechanismy nespecifické imunity časem vytvořily efektivní formu obrany imunitního systému a daly možnost rostlinám a bezobratlým, v čele s nejpocetnější a nejrozšířenější třídou zahrnující hmyz, stát se evolučně nejúspěšnějšími skupinami na Zemi (třída – hmyz: 1 milion druhů a 10^{18} jedinců). Důraz je při nespecifických imunitních reakcích věnován hbité a dlouhotrvající odpovědi. Neadaptivní imunitní systémy rostlin a bezobratlých jsou v určitých základních rysech shodné s neadaptivní částí imunity u obratlovců⁸.

2.1. Imunitní systém hmyzu

Nejvíce prostudovaný obranný mechanismus přirozené imunity hmyzu byl popsán u octomilky *Drosophila melanogaster*. Prvotní bariérou tvořenou vnější kutikulou a epitelem trávicí soustavy je náročné proniknout, některé mikroorganismy narušují kutikulu tvorbou a působením enzymu chitinasy. Poranění kutikuly aktivuje iniciační enzym proteolytické kaskády, jež katalyzuje přeměnu pro-fenoloxidas na fenoloxidasu. Dále tento enzym katalyzuje oxidaci fenolických sloučenin s následnou polymerací a tvorbou černého pigmentu melaninu⁹.

Po proniknutí do těla hmyzu jsou mikroorganismy vystaveny působení imunitní odpovědi na humorální a buněčné úrovni. Humorální odpověď způsobuje rychlou produkci antimikrobiálních peptidů, přičemž některé jsou přítomny i konstitutivně, a reaktivních sloučenin kyslíku. Tyto peptidy jsou produkovány převážně tukovým tělískem, funkčním ekvivalentem savčích jater, a jsou sekretovány do hemolymfy, kde jejich koncentrace může dosáhnout až $100 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Genom octomilky kóduje minimálně 34 antimikrobiálních peptidů, mezi které patří peptidy se širokým spektrem účinku, například cecropiny (gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, houby), nebo úzkospektré: na glycin bohaté attaciny (gram-negativní bakterie), drosomycin (houby). Tvorba těchto peptidů reaguje na typ patogenu (gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, houby) v těle hmyzu¹⁰.

Imunitní odpověď na buněčné úrovni je zprostředkována také hemocyty – krevními buňkami, které cirkulují v hemolymfě. Hemocyty dělíme podle morfologie na plasmatocyty (fagocytující), lamellocyty (tvorba větších kapslí), a krystalové buňky (obsahující fenoloxidasu a podílející se na proteolytické kaskádě)¹⁰.

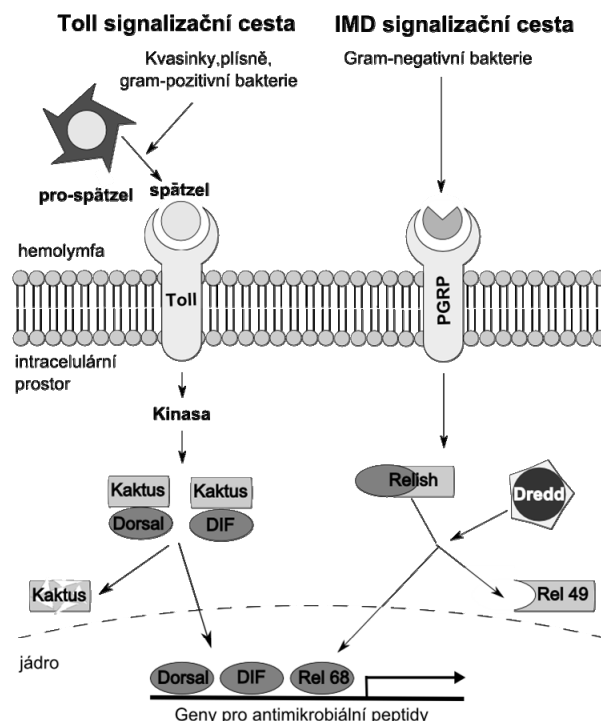
Vymezit hranice mezi humorální a buněčnou imunitou není snadné. Některé humorální faktory ovlivňují funkci hemocytů, které jsou zároveň zdrojem antimikrobiálních peptidů.

2.2. Signalizační kaskády – nástroje ovládající expresi indukovatelných antimikrobiálních peptidů

Po aseptickém poranění kutikuly jsou v hemolymfě přítomny vedle konstitutivních antimikrobiálních peptidů i indukované antimikrobiální peptidy s různým účinkem. Tvorbu těchto indukčních antimikrobiálních peptidů aktivují dvě signalizační cesty Toll a IMD (obr. 1)¹¹.

Toll signalizační dráha byla paralelně identifikována u savců i u octomilky *Drosophila melanogaster*¹², dále také u rostlin a ostatních živočichů (homologie se savčími „Toll-like-receptory“)¹³. Toll signalizační kaskáda je aktivována gram-pozitivními bakteriemi a houbami. Ligand „spätzle“, který je štěpený serinovými proteasami, se naváže na Toll membránový receptor a aktivuje tak signalizační kaskádu. Výsledkem kaskády je fosforylace a následná degradace „Kaktusu“ a uvolnění transkripčního faktoru „DIF/Dorsal“ a jeho translokace do jádra, kde se spustí transkripce genu specifického antimikrobiálního peptidu. U drosofilů tato cesta reguluje geny odpovědné za expresi antimikrobiálních peptidů účinným proti houbám a gram-pozitivním bakteriím¹². Hlavními zástupci peptidových rodin vznikajících touto kaskádou jsou defensin účinný proti gram-pozitivním bakteriím, drosomycin a metchnikowin, které jsou účinné proti houbám¹¹.

Odpověď na infekci způsobenou gram-negativními bakteriemi je kontrolována odlišnou cestou. IMD cesta se



Obr. 1. Schéma signalizačních drah Toll a Imd u octomilky; převzato a upraveno z cit.⁴³

podobá savčí TNF- α dráze a je zakončena expresí peptidů antimikrobiálních peptidových rodin jako je attacin, cecropin, drosocin a dipteracin, které prokazují značnou účinnost proti gram-negativním bakteriím. IMD cesta je zahájena aktivací peptidoglykanového rozpoznávacího proteinu (PGRP), který reaguje na složku obsaženou v bakteriální stěně gram-negativních bakterií a aktivuje tak signalizační kaskádu. Výsledkem kaskády je štěpení pretranskripčního faktoru označovaného „Relish“ kaspasou pojmenovanou „Dredd“ za uvolnění transkripčního faktoru „Rel-68“. Tento faktor je translokován do jádra, kde aktivuje transkripci výše uvedených peptidů¹⁴.

2.3. Imunitní systém obratlovců

Expresí antimikrobiálních peptidů β -defensinů v epitelových buňkách dýchacího ústrojí u skotu je stimulována lipopolysacharidy (LPS), interleukinem-1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizujícím faktorem (TNF). Další analýzy 5'-koncových regionů indukovatelných epitelových antimikrobiálních peptidů ze savců a žab odhalily vazebné místo NK κ B, analog transkripčních faktorů u hmyzu (DIF, Dorsal a Rel). Jako odpověď na infekci klesá intracelulární úroveň NK κ B, který je translokován do jádra a dochází k aktivaci genu pro příslušný antimikrobiální peptid. Receptor pro IL-1 β (IL-1R) je strukturně blízce příbuzný receptoru Toll a spolu se signalizační kaskádou a transkripčním faktorem NK κ B tvoří signalizační dráhu podobnou Toll signalizační dráze u hmyzu. U savců jsou IL-1 vylučovány monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami a poraněnými epitelovými buňkami. Objevení funkce Toll a Toll-podobných receptorů (TLRs) při expresi genů pro antimikrobiální peptidy u hmyzu a savců vedlo ke snaze hledat další homologní struktury u člověka. Pozdější studie prokázaly, že u člověka se vyskytuje nejméně deset těchto genů (TLRs). Současné experimenty prokázaly vazbu LPS přímo na TLRs (cit.¹³).

2.4. Imunitní systém rostlin

Rostliny, stejně jako živočichové, exprimují antimikrobiální peptidy jako defensiny a thioniny konstitutivně a jako odpověď na mikrobiální útok. Prvotní vazby jsou zprostředkovány specifickými receptory podobné Toll a Toll-podobných receptorům (TIR-ND-LRR). Ty aktivují specifickou odpověď proti specifickému organismu, tento systém obrany u rostlin byl nazván „gene for gene“ strategií^{12,15,16}.

3. Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiálních peptidů existuje několik druhů – kationické, anionické (enkelytin, dermcidin), aromatické dipeptidy (*N*- β -alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxy-fenylalanin) a deriváty proteinů vážící kyslík (deriváty hemokyaninu a hemoglobinu, laktoferrin). Nejpočetnější

skupinou z nich jsou kationické peptidy, jež zároveň vykazují mnohonásobně vyšší aktivitu než ostatní druhy. Dosud jich bylo charakterizováno přes 700 a více než polovina jich byla izolována z hmyzu¹⁷.

3.1. Obecná kritéria pro působení antimikrobiálních peptidů

Nezbytnými parametry antimikrobiálních peptidů pro jejich působení jsou konformace, náboj, hydrofobicita, hydrofobní moment, amfipaticita a polární úhel. Je důležité zdůraznit, že tato kritéria jsou v rovnováze a navzájem na sobě závislá, změna jednoho je obvykle kompenzována změnou ostatních. Extrémní odchylky v těchto vlastnostech mohou vést ke snížení antimikrobiální aktivity a selektivní toxicity¹⁴. Prakticky všechny antibakteriální peptidy tvoří při vazbě na membránu amfipatické struktury, nejčastější strukturou je α -helix¹⁸.

Kationické antimikrobiální peptidy obsahují méně než 50 aminokyselin. Díky přítomnosti aminokyselin lysinu a nebo argininu je jejich celkový náboj od +2 do +10 (cit.¹⁹). Minimální množství kladného náboje pro interakci peptidu s membránou patogenu, která je nabitá záporně, je právě +2. Nižší hodnoty již nejsou dostatečné pro signifikantní selektivitu k mikroorganismům. Zvyšování kladného náboje antimikrobiálních peptidů záměnou aminokyselin může v určitém rozsahu zvýšit jejich antimikrobiální účinky²⁰. Někdy však může zvýšení kladného náboje naopak plně potlačit antibakteriální aktivitu a zvýšit např. hemolytické účinky namířené proti hostitelským buňkám²⁰.

Hydrofobicita, která je dána procentem hydrofobních aminokyselin v peptidovém řetězci, se většinou pohybuje kolem 50 %. Přestože je nezbytná pro efektivní membránovou permeabilizaci, zvyšování hydrofobicity silně koreluje s toxicitou vůči savčím buňkám a ztrátou specifity vůči buňkám mikrobiálním²¹.

Polární úhel vyjadřuje prostorové uspořádání hydrofobních a hydrofilních aminokyselin, které tvoří domény kooperujících na permeabilizaci membrány. Polární úhel se také ukázal být v úzkém vztahu s celkovou stabilitou a poločasem rozpadu membránových pórů indukovaného přítomností peptidů^{20,22}.

3.2. Specifita a selektivní toxicita antimikrobiálních peptidů

Působení peptidu proti bakteriálním infekcím chrání hostitele, a proto je kladen důraz na selektivní působení antimikrobiálních peptidů pouze proti patogenům, především bakteriím. Toto rozpoznání umožňují rozdíly ve struktuře, složení a transmembránovém potenciálu mezi bakteriální a eukaryotní membránou.

Všechny biologické membrány jsou tvořeny fluidní mozaikou tvořenou fosfolipidy. Fosfolipidy jsou amfipatické povahy, to znamená že v rámci molekuly obsahují současně hydrofobní i hydrofilní část. Bakterie jsou navíc obaleny buněčnou stěnou, jejíž složení se liší u gram-

Tabulka I
Vybrané kationické peptidy a proteiny¹⁷

Struktura a zástupci peptidů	Výskyt	Antimikrobiální aktivita
<i>Antimikrobiální proteiny</i>		
BPI protein	člověk	bakterie
Kathepsin G	člověk	bakterie
<i>Lineární peptidy tvořící α-helix</i>		
Cekropin	hmyz, prase	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry, protozoa, metazoa
Klavanin, styelin	pláštěnci	bakterie
Magainin, dermaseptin	obojživelníci	bakterie, protozoa
Buforiny	obojživelníci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
<i>Lineární peptidy obohacené určité aminokyselinou</i>		
Bohaté na prolin:		
Drosocin, metchnikowiny	octomilka	bakterie
Pyrrhocoricin, metalnikowin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Bohaté na glycin:		
Diptericiny, attaciny	dvojkřídli	bakterie
Bohaté na histidin:		
Histatin	člověk	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Bohaté na tryptofan:		
Indolicin	kráva	bakterie
<i>Peptidy s jednou disulfidovou vazbou</i>		
Thanatin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Breviny	žába	bakterie
<i>Peptidy se dvěma disulfidovými vazbami</i>		
Tachyplesin II	krab trnitý	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry
Androctonin	škorpión	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Protegrin I	prase	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry
<i>Peptidy se třemi disulfidovými vazbami</i>		
α -Defensiny	savci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
β -Defensiny	savci	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Defensiny	hmyz	bakterie, mikroskopické vláknité houby, protozoa
<i>Peptidy s více disulfidovými vazbami</i>		
Tachycitin	krab trnitý	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Drosomycin	octomilka	mikroskopické vláknité houby
Helimicin	blanokřídli	bakterie, mikroskopické vláknité houby
Defensiny	rostliny	mikroskopické vláknité houby

pozitivních, gram-negativních bakterií a hub.

Membrány bakterií jsou bohaté na fosfolipidy (fosfatidylglycerol, fosfatidylserin a kardiolipin) a spolu s dalšími složkami bakteriální stěny (glykolipidy, lipoproteiny a u gram-negativních jsou to navíc lipopolysacharidy) vytvářejí negativní náboj. Naproti tomu fosfolipidová dvojvrstva vyšších živočichů obsahuje ve velké míře obo-

jetné ionty fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a molekuly cholesterolu, které udávají membráně náboj neutrální. Rozdílná distribuce jednotlivých molekul ve vnitřní a vnější straně membrány vytváří nábojovou asymetrii, vedoucí k tvorbě transmembránového potenciálu ($\Delta\Psi$). Například normální savčí buňka vykazu-

je $\Delta\psi$ -90 až -110 mV. U bakteriálních patogenů v logaritmické fázi růstu je $\Delta\psi$ -130 až -150 mV. Hodnota transmembránového potenciálu je důležitým faktorem pro elektrostatické přiblížení kationického peptidu k membráně²⁰.

3.3. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

Prvním krokem při působení antimikrobiálních peptidů je přiblížení a interakce s membránou. Důvodem migrace k bakteriální membráně jsou elektrostatické interakce a membránový potenciál. Následuje několik možností narušení buněčné membrány – fatální depolarizace membrány, vytváření selektivních kanálů nebo „děr“ a ztráta buněčného obsahu, aktivace destruktivních procesů, jež zahrnuje aktivaci hydrolas buněčné stěny, narušení funkce membrány translokací lipidů – a nakonec průnik některých peptidů až k intramolekulárnímu cíli¹³.

Peptidy, které narušují celistvost biomembrán, jsou převážně ze skupiny α -helikálních peptidů²³. Tvorba iontově selektivních kanálů může vést ke ztrátě transmembránového potenciálu, a tedy ztrátě energetické funkce bio-

membrány. Větší „díry“ mohou vést ke ztrátě životně důležitých látek a způsobují smrt. Včlenění antimikrobiálních peptidů paralelně s dvojvrstvou, mezi hydrofobní a hydrofilní část, vytváří místo, kde se následně agregují další molekuly peptidu. Po dosažení kritické koncentrace se peptidy reorientují za tvorby vodivých kanálů, které umožňují únik protonů a jiných iontů, popřípadě větších molekul (princip mechanismů vzniku sudové skruže, např. magainin²⁰). Poněkud odlišný je tzv. kobercový mechanismus, kdy dochází k agregaci peptidů vně membrány a po dosažení kritické koncentrace dochází ke vzniku toroidního póru nebo micelizaci a prolomení membrány, tento mechanismus vykazují např. sapeciny²⁴ (obr. 2).

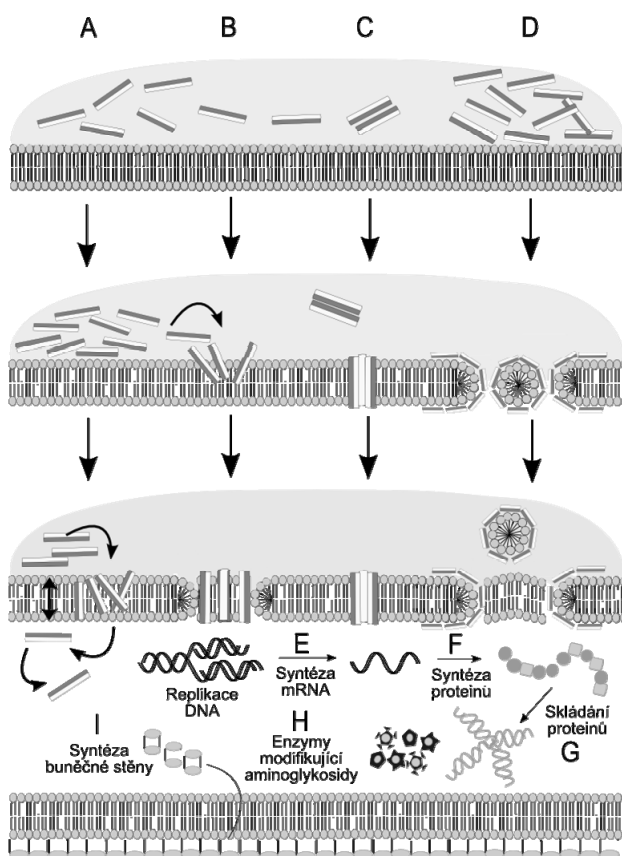
Některé antimikrobiální peptidy jsou však translokovány membránou bez jejího znatelného narušení. Uvnitř buňky způsobují např. inhibici cytoplasmatického „heat-shock“ chaperonu DnaK (pyrrhocoricin, apidaecin a drosocin)²⁵. Některé peptidy silně narušují syntézu DNA a inhibují syntézu RNA a proteinů nebo způsobují jejich nesprávnou translaci (indolicin)¹⁹.

3.4. Typy kationických antimikrobiálních peptidů

Kationické peptidy rozdělujeme na základě struktur a převažujících motivů do čtyř základních tříd: *i*) antimikrobiální proteiny (mají přes 100 aminokyselin), *ii*) lineární peptidy s α -helikálními doménami (asi 290 aminokyselin), *iii*) lineární peptidy se zvýšeným obsahem dané aminokyseliny (asi 44 aminokyselin), *iv*) cyklické peptidy obsahující disulfidové vazby (asi 380 aminokyselin). Pro klasifikaci antimikrobiálních peptidů bakteriálního původu a nedávno nalezených peptidů u rostlin a živočichů byly navíc vyčleněny tyto třídy: *v*) peptidy bez disulfidických můstků, *vi*) peptidy s cyklickou strukturou, *vii*) kovalentně vázané dimery^{26,27}.

3.4.1. Antimikrobiální proteiny

Tyto proteiny jsou produkovány různorodými organismy v různém kontextu. Savčí krevní buňky jsou bohaté na tyto proteiny. Vedle lysozymu jsou zde obsaženy serprocidiny, kathepsin G, laktoferrin a protein BPI. BPI je vysoce kationický protein (55 kDa) s aktivitou zaměřenou proti gram-negativním bakteriím, váže se na lipopolysacharidy buněčné stěny a způsobuje poškození buněčné membrány. Z hmyzu bylo izolováno několik polypeptidů (20–30 kDa) aktivitou zaměřených proti gram-negativním bakteriím – attaciny a sarkotoxiny II. Attaciny se váží k lipopolysacharidům v buněčné stěně gram-negativních bakterií a inhibují syntézu membránových proteinů. Pro strukturu attacinů a sarkotoxinů II je typický vysoký obsah glycinu. Různé druhy plžů produkují antimikrobiální glykoproteiny achacinové rodiny, které jsou aktivní proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Z rostlin byly izolovány puroindoliny a thaumatiny podobné proteiny (např. zeamin, 20 kDa). Bakterie produkují antimikrobiální proteiny pro potlačení růstu jiných bakteriálních kmenů, působí na membránovou permeabilitu a interferují se syntézou proteinů nebo nukleových kyselin. Gram-



Obr. 2. Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů; A – agregací model, B – model toroidního póru, C – model sudové skruže, D – kobercový model, E–I mechanismy působení antimikrobiálních peptidů, převzato a upraveno z cit.⁴⁴

Tabulka II
Vybrané nekationické peptidy¹⁷

Struktura a zástupci peptidů	Výskyt	Antimikrobiální aktivita
<i>Anionické peptidy</i>		
Deriváty neuropeptidu:		
Enkelytin	kráva, člověk	bakterie
Peptid B	kráva, člověk, pijavice, mušle	bakterie
Bohaté na kyselinu asparagovou:		
H-GDDDDDD-OH	ovce	bakterie
Dermicin	člověk	bakterie
<i>Aromatické dipeptidy</i>		
N-β-Alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin	masařka	bakterie, mikroskopické vláknité houby
p-Hydroxycinnamaldehyd	blanokřídli-širopasí	bakterie, mikroskopické vláknité houby
<i>Peptidy odvozené od proteinů vážící kyslík</i>		
Deriváty hemokyaninu	kreveta	bakterie
Deriváty hemoglobinu	klišť	bakterie
Lactoferin	člověk	bakterie, mikroskopické vláknité houby, viry

negativní kmeny produkují koliciny s molekulovou hmotností 30–90 kDa a gram-pozitivní kmeny produkují druhy bakteriocinů (přes 20 aminokyselin)²⁶.

3.4.2. Lineární peptidy

Tato třída zahrnuje antimikrobiální peptidy s méně než 100 aminokyselinami. V databázích těchto peptidů zabírají asi polovinu. Nejpočetnější skupinu tvoří peptidy s amfipatickou, α-helikální strukturou (asi 300 peptidů).

Lineární amfipatické peptidy tvořící α-helixy

Délka řetězce těchto peptidů se pohybuje mezi 16 a 40 aminokyselinami. α-Helikální domény se vyskytují většinou na N-konci a u některých peptidů jsou i amidované. Vedle těchto struktur jsou přítomny i sekundární α-helikální domény, smyčky nebo malé cyklické motivy. Přítomnost α-helikálních domén je nezbytná pro antimikrobiální účinek, kterým je permeabilizace buněčné membrány za pomoci nespécifických interakcí s membránovými fosfolipidy. Některé z těchto peptidů jsou specifické proti bakteriím, ale některé se vyznačují i hemolytickým působením na erytrocyty²⁶.

Zástupcem této třídy jsou cekropiny – skupina lineárních peptidů o molekulové hmotnosti 3–4 kDa, tvořících dva α-helikální segmenty (silně bazická N-terminální doména a dlouhý hydrofobní C-terminální helix), které jsou spojeny krátkou „stopkou“. První cekropin byl charakterizován v 80. letech 20. století u motýla *Hyalophora cecropia*.

Další molekulou patřící mezi tyto peptidy je magainin izolovaný z kůže žáby *Xenopus laevis*. Relativně novou skupinou těchto kationických peptidů jsou buforiny (2 až 4 kDa) izolované z rybího epitelu, strukturně jsou podobné

cekropinům. Cekropiny, magaininy a buforiny působí na širokou škálu bakterií, houby a parazity¹⁷. U savců včetně člověka byly izolovány α-helikální antimikrobiální peptidy patřící do rodiny katelcidinů, jsou produkovány hlavně fagocyty. Spektrum jejich účinku je stejné jako u cekropinů^{28,29}.

Krátké lineární peptidy

Žáby rodu *Rana* produkují lineární antimikrobiální peptidy, které patří mezi nejmenší v přírodě. Jedná se o temporiny s 13 aminokyselinami, amidovaným C-koncem, vykazující aktivitu proti některým gram-pozitivním bakteriím a kvasinkám. Jiný rod žab *Bombina* produkuje peptidy bombininy čítající 20 aminokyselin s širokým spektrem účinku. Obě tyto peptidové rodiny vykazují hemolytickou aktivitu²⁸.

Peptidy bohaté na prolin

Tyto peptidy byly nalezeny jak u savců, tak u hmyzu. Vedle aminokyseliny prolin je také hodně zastoupen arginin jako bazická aminokyselina. Antimikrobiální aktivita je zaměřena proti gram-negativním bakteriím a není doprovázena hemolytickým působením. Vedle rozrušení bakteriálních membrán působí i na intracelulární cíle. Savčí peptidy patří do rodiny katelcidinů (baktenečin, porcín PR-39 a profeniny) a mají 40 až 80 zbytků. Téměř všechny jsou amidovány na C-konci.

Několik těchto peptidů bylo izolováno z hmyzu a můžeme je rozdělit podle délky řetězce na krátké a dlouhé. Krátké mají 15 až 20 zbytků a zahrnují apidaeciny, formaeciny, drosocin, pyrrothokoricin a metalnikowniny. Apidaeciny a metalnikowniny působí proti gram-

negativním bakteriím, avšak mechanismus účinku je pomalejší než u α -helikálních peptidů a defensinů. Antimikrobiální aktivitu ovlivňují optické vlastnosti aminokyselin. Průnik do buňky je totiž uskutečňován specifickými transportními mechanismy a ne vznikem nespecifických pórů. Hlavními intracelulárními cíli jsou například „heat-shock“ proteiny. Dlouhé hmyzí peptidy bohaté na prolin zahrnují abaeciny, lebeciny a metchnikowin. Drosocin, pyrrhococcin, formaeciny a lebeciny jsou *O*-glykosylované a byl prokázán vliv glykosylace na antimikrobiální aktivitu^{26,30}.

Peptidy bohaté na glycin

Tyto peptidy jsou produkovány pouze hmyzem a můžeme je rozdělit do tří skupin: peptidy s doménou podobnou attacinu, peptidy bohaté na Pro/Gly a peptidy bohaté na His/Gly. Do první skupiny patří hymenoptaeciny, holotricin 2, koleoptericy, hemiptericin, gloverininy a akaloleptiny a jejich aktivita je zaměřena proti gram-negativním bakteriím. U gloverinu byla objevena interakce s membránovými lipopolysacharidy a následná inhibice syntézy membránových proteinů. Diptericein je zástupcem druhé skupiny, jeho N-doména je bohatá na aminokyselinu prolin a C-doména na aminokyselinu glycin. U diptericeinu A bylo prokázáno, že glykosylace nemá vliv na aktivitu. Do třetí skupiny řadíme tři antifungální peptidy: holotricin 3, tenecin 3 a antifungální protein z masařky (*Sarcophaga peregrina*). Obsahují 67 až 84 aminokyselinových zbytků. Antifungální protein z masařky vykazuje synergismus se sarkotoxinem I izolovaným z téhož organismu²⁶.

Peptidy bohaté na histidin

Tyto peptidy s velkým zastoupením aminokyseliny histidin byly izolovány ze slin lidí a primátů a nazývají se histatiny¹⁷. Jejich aktivita je namířena proti kvasinkám a plísním. Tyto peptidy po průniku do buňky napadají mitochondrie. Působí i na azol-rezistentní kvasinky a plísně a vykazují nízkou toxicitu, což z nich dělá skvělé kandidáty na chemoterapeutika²⁶.

Peptidy bohaté na tryptofan

Dosud jsou známy pouze dva takové peptidy a to indolicin a tritrypticin. Mají široké spektrum účinku: gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, plísně, kvasinky a dokonce i obalený virus HIV. Nevýhodou z hlediska potenciálního využití jsou hemolytické a cytotoxické působení proti T-lymfocytům.

3.4.3. Peptidy bohaté na cystein tvořící disulfidové můstky

Téměř polovina všech antimikrobiálních peptidů v databázích obsahuje dva nebo více cysteinových aminokyselin, které často tvoří disulfidové můstky. Jsou produkovány různými druhy bakterií, plísní, rostlin, obratlovců i bezobratlými živočichy.

Peptidy se dvěma nebo čtyřmi cysteiny

Tyto peptidy tvoří vláseňkové struktury nebo tzv. „ranaboxy“. Disulfidové můstky stabilizují strukturu. Tyto peptidy jsou produkovány savci, bezobratlými, rostlinami,

a i gram-pozitivními mléčnými bakteriemi²⁶.

Žába rodu *Rana* produkuje tyto peptidy: brevininy, eskuletiny a tigerinin. Brevininy a eskuletiny obsahují amfipatické α -helikální struktury končící motivem „ranaboxy“. Podobný cyklický motiv byl objeven i u hmyzího thanatinu. Tyto peptidy působí proti bakteriím i kvasinkám a plísním membranolýtickým mechanismem a vykazují i hemolytickou aktivitu.

Savčí peptid protegrin obsahuje čtyři cysteinové zbytky. Působí jako dimer na širokou škálu i běžně rezistentních patogenů.

V rostlinách nebyly nalezeny peptidy s jednou disulfidovou vazbou, ale jen se dvěma.

Peptidy se šesti a více cysteiny

Tyto peptidy jsou rozšířeny zejména u eukaryotních organismů. Struktura je stabilizována vznikem β -struktur, ale není vyloučena i přítomnost α -helixu. Tyto peptidy jsou souhrně nazývány defensiny. Tři druhy defensinů (α -, β - a θ -) se vyskytují u obratlovců včetně člověka, čtvrtý druh u rostlin a pátý u hmyzu. α -Defensiny mají 29 až 35 aminokyselin se třemi disulfidovými můstky. Lidské α -defensiny mají pozice disulfidových můstků konzervované, doposud jich u člověka bylo identifikováno šest druhů³¹. Jsou produkovány neutrofily. Jejich struktura se skládá z C-koncové vlásenky spojené smyčkou ke třetímu N-koncovému β -listu. β -Defensiny mají podobnou strukturu jako α -defensiny, jen se liší v aminokyselinovém složení. Jsou to širokospektrální antimikrobiální peptidy vyznačující se expresí v různých tkáních (epitely dutiny ústní, horních cest dýchacích, ledviny, slinivka břišní, močové cesty a ženské pohlavní orgány), kde potlačují spolu s přirozenou mikroflórou různé infekce. Již u čtyř lidských β -defensinů (hBD-1 až 4) byly exprese a funkce již dobře popsány, avšak studium genomu předpokládá existenci dalších 28 nových lidských β -defensinů³². Dalším peptidem, jež obsahuje vysoký obsah cysteinů, je hepcidin, který obsahuje 24 aminokyselin, z nich osm cysteinů, které tvoří disulfidové můstky. Lidská játra produkují tento antimikrobiální peptid do moči. Analoga byla nalezena u všech živočichů, u bezobratlých jsou tyto na cystein bohaté peptidy produkovány tukovým tělískem³³.

Velký počet defensinů byl objeven u hmyzu, a jejich homology byly nalezeny u jiných bezobratlých (škorpión). Tyto peptidy jsou dlouhé 33–51 aminokyselin a působí na cytoplasmu gram-pozitivních bakterií. Tím doplňují roli α -helikálních hmyzích peptidů, které působí proti gram-negativním bakteriím. U defensinů blanokřídlých (včela medonosná) byl C-koncový α -helix amidovaný. Další peptid podobný hmyzím defensinům produkuje octomilka *Drosophila melanogaster* a nazývá se drosomycin. Vedle β -struktur a α -helixu jsou C- a N-konce spojeny čtyřmi disulfidovými můstky, antimikrobiální aktivita byla zaznamenána pouze proti mikroskopickým vláknitým houbám.

Dále k antimikrobiálním peptidům s vysokým počtem cysteinových zbytků řadíme mytiliny a myticiny z mušle, illuciny produkováné plísní *Rhizomucor pusillus* či anti-

fungální protein plísně *Aspergillus giganteus* nebo tachyplesiny a tachystatiny klepítkatce *Tachypleus tridentatus*³⁶.

V roce 1999 byla definována nová skupina cyklických peptidů se třemi disulfidovými můstky a β -listy označená cyklotidy. Poprvé byly izolované z rostlin, dále i z bakterií a živočichů. Mají široké spektrum biologických aktivit: hemolytické, antimikrobiální, antivirové, insekticidní, jsou také inhibitory neurotensinů a trypsinů³⁴.

Z rostlin byl dále izolován peptid snakin-1, který obsahuje 63 aminokyselin, z toho 12 cysteinů, jež mohou tvořit až 6 disulfidových můstků a stabilizovat tak strukturu. Již v koncentraci pod $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ je aktivní proti bakteriálním a fungálním infekcím³⁵.

Peptidy s kovalentně vázanými dimery

Některé antimikrobiální peptidy bakteriálního původu obsahují i jiné kovalentní vazby než disulfidovou. Například lantibiotika, patřící mezi bakteriociny, tvoří můstky díky přítomnosti aminokyseliny lanthioninu (je tvořená dvěma zbytky alaninu propojenými přes β -uhlík thioetherovou vazbou). Lantibiotika působí na membránu gram-pozitivních bakterií, jejich zástupci jsou nisin a mersacidin^{26,36}.

3.4.4. Posttranslační modifikace antimikrobiálních peptidů

Nejběžnější formou posttranslační modifikace u antimikrobiálních peptidů a proteinů je tvorba disulfidových můstků. Ty jsou nezbytné pro správné uspořádání popřípadě dimerizaci peptidů, což má ve většině případů, ale ne ve všech, vliv na biologickou aktivitu. Dalším druhem modifikací jsou glykosylace. Asi třetina peptidů v databázích je glykosylována. Přítomnost cukru není nezbytná pro antimikrobiální aktivitu, avšak v mnoha případech glykosylace tuto aktivitu zvyšuje. Experimenty s glykosylovanými a neglykosylovanými peptidy a různými bakteriálními kmeny však prokázaly, že není souvislost mezi vlivem glykosylace a mechanismem účinku^{26,37}. Studie drosocinu pomocí NMR spektroskopie prokazuje, že disacharid otevírá těsné sevření centrálního ohybu peptidové páteře, díky níž dochází ke stabilizaci C-koncového ohybu a lepší vazbě na cílovou molekulu³⁸.

Také amidace C-konce, která se často vyskytuje u antimikrobiálních peptidů, zvyšuje antimikrobiální potenciál díky zvýšení kationicity.

3.5. Použití antimikrobiálních peptidů

Spektrum působení antimikrobiálních peptidů je velice široké a zahrnuje i řadu mikroorganismů rezistentních proti dostupným antibiotikům. Navrhované aplikace těchto antimikrobiálních peptidů zahrnují léčbu, popřípadě prevenci, systémických bakteriálních, kvasinkových a virových infekcí, ale i onemocnění způsobených parazity. Bylo prokázáno i působení na rakovinné buňky. Využití je dále zaměřeno proti patogenům ohrožující pacienty s cystickou fibrózou (kathelicidin), žaludečními vředy, kožními nádory, onemocněním dutiny ústní, očními choro-

bami, sexuálně přenosnými nemocemi a sepsí. Také se uvažuje o použití těchto peptidů v oblasti genových terapií, pro sterilizaci nemocničního a chirurgického materiálu, produkci sterilních obzavových materiálů, pro použití v kosmetice a potravinářství^{26,39}.

Na trh se zatím dostalo jen pár antimikrobiálních peptidů bakteriálního původu: kationické peptidy polymyxin B a gramicidin S, které jsou používány v klinické praxi již dlouho, a kationické lantibiotikum nisin používaný jako konzervační prostředek do potravin^{26,40}.

Přes možnosti, které dnes nabízí navrhování nových peptidů nebo proteinů, je jejich úspěšnost limitována klinickými testy. Dodnes se pouze čtyřem peptidům nebo proteinům podařilo dospět do 3. fáze klinických testů – testů účinnosti. Byly navrženy k léčbě nebo prevenci impetiga a diabetických vředů na nohách (derivát žabiho magaininu MSI-78, Pexiganan, firma Genaera), mukózy dutiny ústní (derivát prasečího protegrinu IB-367, Isegan, firma Intrabiotics), sepse (derivát lidského BPI proteinu rBPI₂₃, Neuprex, firma Xoma) a s katetrizací spojených infekcí (varianta kraviho indolocinu CP-226, Omiganan, firma Migenix). Pouze dva peptidy prokázaly dostatečnou účinnost. Pexiganan při orálním užití spolu s ofloxacinem vedl k vyléčení nebo zlepšení u 90 % pacientů. Avšak Americký úřad pro potraviny a léky (FDA) neschválil tento lék pro klinické využití. Omiganan v 3a fázi klinických testů dosáhl statisticky významného úspěchu při redukci infekcí vedoucích z katetrů a jejich kolonizaci na katetrech. Přesto, že toto nebyl původně navržený cíl tohoto peptidu, postoupil do další fáze testování 3b (cit.^{41,42}).

Zájmu o antimikrobiální peptidy napomáhá i fakt, že by mohly být produkovány endogenně pomocí geneticky modifikovaných organismů. Jedny z navržených peptidů jsou defensiny. Působí širokospektrálně a jejich hladina v krvi při infekci vzrůstá – byla indikována např. u pacientů s cystickou fibrózou. Jejich produkce ve větším měřítku však není zcela vyřešena, přestože produkce defensinů produkovaných neutrofily a jejich analog byla již popsána. Produkce defensinů rekombinantní technologií se již také objevuje, ale popisuje pouze produkci v menším měřítku. Také byly prováděny pokusy, při kterých byla úspěšně provedena transformace rostlin s následnou expresí defensinů jako součást obrany proti infekcím. Takto ošetřené rostliny projevily zvýšenou odolnost vůči infekcím ve srovnání s konvenčním ošetřením²⁶.

Antimikrobiální peptidy izolované z obojživelníků (hlavně žab) nabízejí také rozmanité využití v terapeutických a biotechnologických aplikacích, ale vyžadují další studie.

Tato studie byla podpořena granty GA ČR 522/09/1693 a 305/09/H008, FRVŠ 942/2009/G4, MSM 6046137305 a výzkumnými záměry Ministerstva školství Z 40550506.

Seznam zkratk

BPI baktericidní, protein zvyšující permeabilitu mem-

	brán (Bactericidal/Permeability-Increasing protein)
DIF	imunitní faktor příbuzný s Dorsalem (Dorsal-related Immunity Factor)
FDA	Americký úřad pro potraviny a léky (US Food and Drug Administration)
IMD	imunitní nedostatečnost (Immune Deficiency)
LPS	lipopolysacharidy
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NK	nukleární faktor (Nuclear Factor)
PGRP	peptidoglykany rozpoznávající protein (Peptidoglycan Recognition Protein)
TNF	tumor nekrotizující faktor (Tumor Necrosis Faktor)

LITERATURA

- Spížek J.: Vesmír 1999 78, 27 (1999).
- Palumbi S. R.: Science 293, 1786 (2001).
- Hancock R. E.: Lancet Infect. Dis. 1, 156 (2001).
- Davies J.: Science 264, 375 (1994).
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System: <http://www.rivm.nl/earss/database>, staženo 23. května 2008.
- Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2001; 10(5):180.
- Breithaupt H.: Nat. Biotechnol. 17, 1165 (1999).
- Vilmos P., Kurucz E.: Immunol Lett. 62, 59 (1998).
- Royet J.: Mol. Immunol. 41, 1063 (2004).
- Hultmark D.: Curr. Opin. Immunol. 15, 12 (2003).
- Hoffmann J. A., Reichhart J. M.: Nature Immunology 3, 121 (2002).
- Leclerc V., Reichhart J. M.: Immunol. Rev. 198, 59 (2004).
- Zaslöff M.: Nature 415, 389 (2002).
- Kim T., Kim Y. J.: J. Biochem. Mol. Biol. 38, 121 (2005).
- Jones J. D. G., Dangi J. L.: Nature 444, 323 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Vizioli J., Salzert M.: Trends Pharmacol. Sci. 23, 494 (2002).
- Bulet P., Stocklin R., Menin L.: Immunol. Rev. 198, 169 (2004).
- McPhee J. B., Hancock R. E. W.: J. Pept. Sci. 11, 677 (2005).
- Yeaman M. R., Yount N. Y.: Pharmacol. Rev. 55, 27 (2003).
- Saido-Sakanaka H., Ishibashi J., Momotani E., Amano F., Yamakawa M.: Peptides 25, 19 (2004).
- Lee M. T., Chen F. Y., Huang H. W.: Biochemistry 43, 3590 (2004).
- Powers J. P. S., Hancock R. E. W.: Peptides 24, 1681 (2003).
- Shai Y.: Biochim. Biophys. Acta 1462, 55 (1999).
- Otvos L., Rogers M. E., Consolvo P. J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M.: Biochemistry 39, 14150 (2000).
- Tossi A., Sandri L.: Curr. Pharm. Des. 8, 743 (2002).
- Brogden K. A.: Nat. Rev. Microbiol. 3, 238 (2003).
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A.: Biopolymers 55, 4 (2000).
- Zanetti M., Gennaro R., Romeo D.: FEBS Lett. 374, 1 (1995).
- Otvos L.: Cell. Mol. Life Sci. 59, 1138 (2002).
- Yamasaki K., Gallo R. L.: Eur. J. Dermatol. 18, 11 (2008).
- Schutte B. C., Mitros J. P., Bartlett J. A., Walters J. D., Jia H. P., Welsh M. J., Casavant T. L., McCray P. B., Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 2129 (2002).
- Park C. H., Valore E. V., Waring A. J., Ganz T.: J. Biol. Chem. 276, 7806 (2001).
- Craik D. J., Daly N. L., Mulvénna J., Plan M. R., Trahi M.: Curr. Protein Pept. Sci. 5, 297 (2004).
- Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: Mol. Plant. Microb. Interact. 12, 16 (1999).
- Altena K., Guder A., Cramer C., Bierbaum G.: Appl. Environ. Microbiol. 66, 2565 (2000).
- Hoffman R., Bulet P., Lazslo U., Lazslo O. Jr.: Biochim. Biophys. Acta 1426, 459 (1999).
- McManus A. M., Otvos L. Jr., Hoffmann R., Craik D. J.: Biochemistry 38, 705 (1999).
- Papo N., Shai Y.: Cell. Mol. Life Sci. 62, 784 (2005).
- Rollema H. S., Kuipers O. P., Both P., Vos W. M., Siezen R. J.: Appl. Environ. Microbiol. 61, 2873 (1995).
- Hancock R. E. W., Sahl H. S.: Nat. Biotechnol. 24, 1551 (2006).
- Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. F.: Cent. Eur. J. Biol. 2, 1 (2007).
- Beinke S., Ley S. C.: Biochem. J. 382, 393 (2004).
- Jensen H., Hamill P., Hancock R. E. W.: Clin. Microbiol. Rev. 19, 491 (2006).

T. Neubauerová^{a,b}, M. Macková^{a,b}, T. Macek^{a,b}, and B. Koutek^b (^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Antimicrobial Cationic Peptides**

The resistance of microorganisms to antibiotics is an increasing public health problem. Hence, substances with new mechanisms of antimicrobial action, such as cationic peptides, are of interest. Cationic peptides play an important role in the innate immunity of all living organisms. Over 700 of the peptides have been isolated. Half of them were isolated from insects; their biosynthesis was described. They show a broad antimicrobial activity and act against tumor cells and viruses.

OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ V BUNĚČNÉ KULTUŘE *Silybum marianum* PŘÍDAVKEM ELICITORU PARAQUAT

LENKA TŮMOVÁ^a a JIŘÍ TŮMA^b

^a Katedra farmakognosie, Farmaceutická fakulta UK v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,

^b Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Universita Hradec Králové, Váta Nejedlého 573, 500 03 Hradec Králové
tumova@faf.cuni.cz

Došlo 17.6.08, přepracováno 17.10.08, přijato 23.10.08.

Klíčová slova: elicítace, flavonoidy, *Silybum marianum*, methylviologen, paraquat

Úvod

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi 30 000 známých přírodních produktů je z více než 80 % rostlinného původu a asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty¹. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je i využití rostlinných explantátových kultur¹. Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami, jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek je metoda elicítace.

Elicítací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny či rostlinného explantátu, které vedou, mimo jiné, ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů². Elicítace rostlinných kultur za účelem zvýšené produkce sekundárních látek je v současné době studována především pro svoji jednoduchost. Navíc se jedná o metodu ekonomicky výhodnou bez velkých nároků na prostory. Základním předpokladem úspěšné elicítace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor².

Cílem práce bylo zjistit vliv potenciálního elicitoru – methylviologenu na produkci flavonolignanů a v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*.

Methylviologen (paraquat)

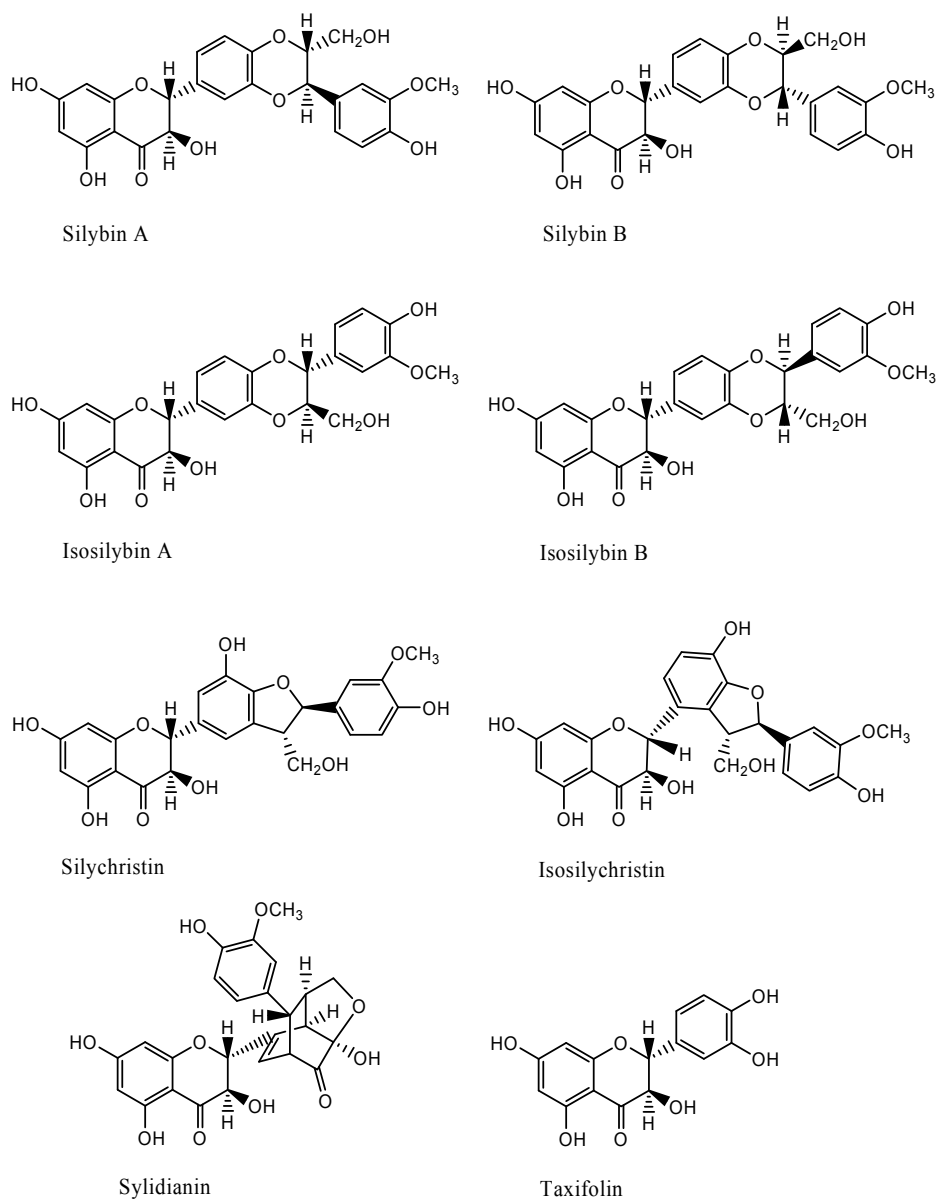
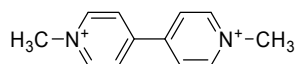
Methylviologen neboli paraquat lze zařadit mezi bipyridilové herbicidy, které jsou využívány jako kontaktní herbicidy či vysušovačla polí. Základní mechanismus působení oxidativního stresu bipyridilů je dán tím, že po jejich působení dochází ke vzniku volných hydroxylových radikálů, které jsou toxické a reagují s membránovými lipidy (peroxidace lipidů)³. Působením methylviologenu se zvyšuje v rostlinách či kulturách *in vitro* množství aktivních forem kyslíku (ROS). Jako zdroj ROS je často používán ke sledování působení oxidačního stresu na rostliny a může tudíž ovlivnit produkci sekundárních látek⁴.

Vliv methylviologenu byl testován na kultuře *Silybum marianum in vitro*. Jako droga se používá v terapii *Cardui mariae fructus* (usušený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) GAERTN.). Musí obsahovat nejméně 1,0 % silymarinu, počítaného jako silybin⁵.

Obsahové látky a terapeutické účinky *Silybum marianum*

Hlavními obsahovými látkami *Silybum marianum* je skupina flavonolignanů komplexně nazývaná silymarin (1,5–3 %). Silymarin je isomerická směs obsahující silybin, isosilybin (1:1 směs diastereoisomerů), silychristin a silydianin. Další významné flavonolignany identifikované v *Silybum marianum* jsou 2,3-dehydrosilybin, 2,3-dihydrosilychristin, dále flavonoidy jako taxifolin, apigenin a jeho 7-*O*-glukosid, 7-*O*-glukuronid, 4,7-diglukosid, dále kaemferol, jeho 7-*O*-glukosid a 3-sulfát, luteolin a jeho 7-glukosid. Z dalších látek byly prokázány sitosterol a jeho glukosid, polyacetyleny, kyselina fumarová⁶.

U silymarinového komplexu byla prokázána antioxidační, antihepatotoxická, antiflogistická a protialergická aktivita. Hepatoprotektivní účinky se projevují u alkoholem indukované, akutní a chronické virové hepatitidy, hepatitidy navozené organickými látkami, toxiny a drogami⁷. Dále byly prokázány účinky antitumorové. Se stabilizací buněčných membrán souvisí antialergická aktivita (stabilizuje buněčnou stěnu žírných buněk), což souvisí s antioxidačním účinkem silymarinu, jeho schopností vychytávat volné radikály a inhibovat lipidovou peroxidasu⁷. Působí jako choleretikum a slabé spasmolytikum. Silymarin se dobře vstřebává z trávicí soustavy a rychle se vylučuje žlučí (max. hladina asi 1 h po podání). Vlivem zpětné resorpce z tlustého střeva se silymarin zadržuje v enterohepatálním oběhu a tím je podmíněn jeho ochranný účinek proti hepatotoxinům a při jaterních cirhózách⁸. V nedávné době byly přesně určeny struktury silybinu A a B a popsány některé zcela nové mechanismy účinků na signální procesy ve zdravých a nádorových buňkách⁹.

Obr. 1. Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu⁶

PQ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion)

Obr. 2. Chemická struktura methylviologenu (paraquat)⁴

Experimentální část

Materiál a metody

Přístroje

Kolona LiChrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; mikrofiltry (0,45 μm), Tessek, ČR; předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko; termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko.

Chemikálie

Methanol HPLC grade, Merk, Německo; methanol p.a., Penta, ČR; methylviologendichlorid hydrát, Sigma-Aldrich, ČR; Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Biologický materiál

Byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíční rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. v 34.–40. pasáži.

Pasážování a kultivace

V prostředí laminárního boxu bylo do sterilizovaných Erlenmayerových baněk přeneseno inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) na můstek z filtračního papíru (u kalusové kultury) nebo přímo do živného media Murshigeho a Skooga (MS)¹¹ (u suspenzní kultury, po mechanickém rozmělnění kalusu). Baňky s naočkovánými kulturami byly opět uzavřeny hliníkovou folií. Kultivace probíhala za normálního světelného režimu (16 h světlo, 8 h tma). Kultura rostla po dobu 30 dnů při 25 °C. Suspenzní kultura byla kultivována na třepačce (120 ot min⁻¹) za stejných světelných a teplotních podmínek.

Elicitace kalusových kultur

Jako elicitor byl použit roztok methylviologendichlorid dihydrátu v ethanolu, ve třech koncentracích, a to:

$c_1 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$),

$c_2 = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$),

$c_3 = 0,1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$).

Na základě vyhodnocení růstové a produkční křivky tkáňové kultury *Silybum marianum* v předchozí studii¹² byl zvolen optimálním dnem k aplikaci elicitoru 30. den po subkultivaci. Po 30 dnech od subkultivace byl do 30 baněk pipetován vždy 1 ml elicitoru. Elicitor byl přidáván za aseptických podmínek pomocí sterilních nástrojů. Kalusy byly z baněk odebírány v šesti časových intervalech od aplikace elicitoru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Tkáňové kultury byly po uvedené době z baněk vyjmuty a usušeny na filtračním papíru za laboratorní teploty. Získané usušené kalusy byly rozetřeny v třecí misce a použity ke stanovení obsahu flavonolignanů. Jako kontrola byla zvolena tkáňová kultura pěstovaná bez přidavku elicitoru.

Bylo sledováno i vylučování metabolitů do živného média. Vzorové média nebyly odebírány pravidelně. Odebrané médium (6 ml) bylo odpařeno na vakuové odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v 6 ml methanolu a analyzován.

Elicitace suspenzních kultur

Suspenzní kultury byly získány mechanickým rozmělněním kalusu ve 30 ml živného média. Tyto kultury byly kultivovány 30 dnů na třepačce 120 ot min⁻¹, která zabezpečovala promíchávání a provzdušňování živné půdy. Elicitace suspenzních kultur a jejich následné zpracování bylo stejné jako u kultur kalusových.

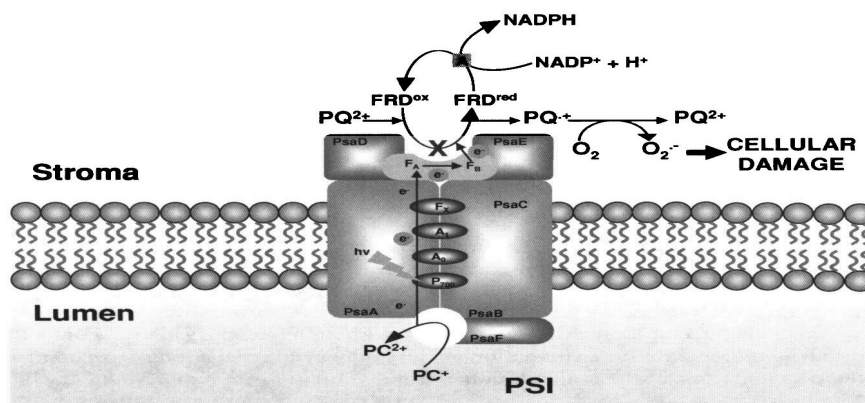
Stanovení obsahu flavonolignanů v kalusu

Parametry HPLC analýzy

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250 × 4 (5 μm) s ochranou předkolonkou. K detekci byl použit DAD detektor (190 až 450 nm). Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm. Objem nástriku byl 20 μl. Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově, z 0 % methanolu v čase $t = 0$ do 50 % methanolu v čase $t = 5$ min. Následovala isokratická eluce 50% methanolem do času $t = 25$ min. Mobilní fáze obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné. Průtok byl 1,4 ml min⁻¹. Standardy: Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Validace HPLC analýzy

Instrumentální validace byla zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco), a to normou ISO 9001



Obr. 3. Mechanismus herbicidního účinku methylviologenu⁴; PSI – fotosystém 1, PC – plastocyanin, FRD – feredoxin, PQ – plastoquinon, NADP – nikotinamadeninindinukleotid, NADPH – nikotinamadeninindinukleotid redukovaný, Cellular damage – poškození buňky

(International Organization for Standardization).

Způsobnost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. testem na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearit (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání: *Asymetrie píku a počet teoretických pater*¹³. Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry: Správnost metody – jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)^{14,15}. Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %)^{14,15}.

Byl použit standard silymarinu, který obsahoval průměrně 5,230 % taxifolinu, 24,731 % silychristinu, 3,094 % silydianinu, 23,831 % silybinu A, 30,009 % silybinu B, 7,159 % isosilybinu A a 2,216 % isosilybinu B (uvedená procenta jsou vypočtena jako poměr plochy příslušného píku k celkové ploše všech píků ve standardu). Kalibrační přímky pro jednotlivé látky byly sestaveny metodou nejmenších čtverců, a to na základě analýz standardu silymarinu a výpočtu jejich množství z průměrného obsahu. Opakovatelnost metody (měřeno na standardu silymarinu) jsme charakterizovali směrodatnou odchylkou ($s_x = 0,0009$), která dosahovala výše 0,9 % průměrné hodnoty. Odchylka byla pod limitem dovolené difference pro opakovatelnost metody ($R_{\max} = 0,00664$), na hladině významnosti $P = 0,95$).

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U této metody byly meze detekce následující: taxifolin 0,0005 %, silychristin 0,0001 %, silydianin 0,0006 %, silybin A 0,0001 %, silybinu B 0,0001 %, isosilybin A 0,0005 % a isosilybin B 0,0010 %.

Tabulka I

Obsah flavonolignanů (%) v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenu [mol l^{-1}]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota test. kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,002	0,0004	3,7283
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0100	0,0024	5,2633
	12	0,0030	0,0003	7,9046
	24	0,0040	0,0024	1,8044
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0040	0,0004	9,4779
	12	0,0030	0,0005	5,4828
	24	0,0040	0,0006	7,3522
	48	0,0040	0,0004	9,4779
	72	0,0070	0,0004	21,9996
	168	0	0	0

^a OK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení

Postup stanovení

Sušené vzorky kalusů a suspenzí kultur (300 až 500 mg) byly po rozdrobnění v třecí misce dvakrát extrahovány vždy 10 ml methanolu po dobu 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Oba extrakty byly spojeny a doplněny na 20 ml. Po filtraci přes mikrofiltr (0,45 µm) bylo asi 1,7 ml roztoku převedeno do zkumavky a analyzováno metodou HPLC. Vzorky média byly nejprve vysušeny na vakuové odparce a poté rozpuštěny v methanolu a po filtraci převedeny do zkumavek a analyzovány metodou HPLC. Obsah flavonolignanů byl vztažen na suchou hmotnost kultury *in vitro*. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení.

Výsledky a diskuse

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů byl použit t-test rozdílů dvou průměrů. Pro zvolenou hladinu významnosti $P=0,05$ a pro 4 stupně volnosti $v=4$ je kritická hodnota testovacího kriteria 2,78.

V kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonolignanů pouze po 6 hodinové elicitaci methylviologinem

o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a to o 1250 %. Po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů zvýšil jen nepatrně nebo naopak významně poklesl (tab. I). U zbývajících testovaných koncentrací elicitoru při aplikaci k suspenzní kultuře byl nárůst produkce flavonolignanů minimální.

V suspenzní kultuře *Silybum marianum* byla produkce flavonolignanů po aplikaci u všech tří koncentrací methylviologenu nepatrná, jen jednou dosáhla stejné produkce ve srovnání s kontrolním vzorkem, a to po 6 hodinové elicitaci methylviologinem o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (tab. II). Gallová¹² detegovala v kalusové kultuře *Silybum marianum* pouze silychristin. Řimáková¹⁶ našla v kalusových kulturách *Silybum marianum* po elicitaci prekurzorem konyferylalkoholem taxifolin a silydianin a to silydianin u kontrolních vzorků i v živném médiu, taxifolin pouze v živném médiu. Po elicitaci suspenzní kultury *Silybum marianum* chitosanem nebyla detegována žádná ze složek silymarinového komplexu. V kontrolních vzorcích média byl však detegován taxifolin. V buňkách kontrolních vzorků kalusové kultury ani v kalusové kultuře *Silybum marianum* Řimáková¹⁶ neprokázala po elicitaci UV zářením žádnou ze složek silymarinového komplexu, jen vysoké koncentrace fenolových kyselin.

V této studii byla detegována v kalusové kultuře kro-

Tabulka II

Obsah flavonolignanů (%) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenu [mol l^{-1}]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0,0020	0,0004	4,3815
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0030	0,0006	1,7715
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0,0040	0,0003	5,3717
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0010	0,0004	6,7331
	168	0	0	
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0,0010	0,0003	7,8779
	72	0,0020	0,0003	5,2786
	168	0,0010	0,0002	8,3236

Tabulka III

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	ISO B ^d [%]	Silymarin komplex
	OK ^a	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0,002	0	0,002
	12	0	0	0	0
	24	0,001	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0,011	0	0	0
	168	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0	0,008	0,002	0,01
	12	0,016	0,003	0	0,003
	24	0	0,004	0	0,004
	48	0	0	0	0
	72	0,002	0	0	0
	168	0,002	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0,001	0,004	0	0,004
	12	0	0,003	0	0,003
	24	0,001	0,004	0	0,004
	48	0	0,004	0	0,004
	72	0	0,007	0	0,007
	168	0	0	0	0

^a OK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^b TAX – taxifolin, ^c SILCHR – silychristin, ^d ISO B – isosilybin B

mě taxifolinu, silychristinu ještě další složka silymarinového komplexu – isosilybin B a to pouze v nepatrném množství (0,002 %) po 6 hodinovém působení elicitoru methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ (tab. III).

V suspenzní kultuře byly zjištěny tyto složky silymarinového komplexu: isosilybin A (po působení methylviologenu (MV) 12 hodin o koncentraci $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po působení 72 hodin MV o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), isosilybin B (po 12 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po 48 h působení MV o $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), silybin A (po 72 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) a silychristin (po 6 a 72 h působení MV o $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹), dále pak taxifolin (u všech tří koncentrací MV). Všechny složky byly zastoupeny pouze v minimálních množstvích, podrobněji tab. III a IV.

V kontrolních vzorcích suspenzní i kalusové kultury *Silybum marianum* nebyl taxifolin zaznamenán vůbec, pouze v kontrolách suspenzních kultur bylo detegováno nepatrné množství silybinu A a B. Všechny složky silymarinového komplexu zjištěné jak u suspenzních, kalusových kultur, tak v živném médiu byly prokázány pouze v nepatrných množstvích (tab. III, tab. IV).

Při náhodném odběru vzorků média při kultivaci suspenzní kultury byl stanoven pouze silybin A (0,001 %)

po 12 hodinovém působení methylviologenu o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹.

U suspenzních i kalusových kultur *Silybum marianum* po působení různých koncentrací methylviologenu bylo zajímavě zvýšení obsahu taxifolinu. Dá se tedy předpokládat, že methylviologen působí jako stresový faktor vyvolávající zvýšenou tvorbu obranných látek – flavonoidů (v tomto případě taxifolinu). Důvodů nízké produkce flavonolignanů v kultuře *Silybum marianum* může být několik. Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této studii byly použity kalusové a suspenzní kultury v 34.–40. pasáži. Gallová¹² ve své studii použila kalusovou a suspenzní kulturu v 10.–25. pasáži. Obsah flavonolignanů však prokazatelně klesal a již ve 34. pasáži byla jejich produkce nulová. Řimáková¹⁶ použila ve své studii nově odvozenou kulturu a elicitací pokusy byly zahájeny od 5. pasáže. Také Alikardis a spol.¹⁷ ve své studii pozorovali pokles produkce flavonolignanů kulturou *Silybum marianum* v závislosti na jejím stáří. Dalším faktorem mohla být volba živného média nebo volba růstových regulátorů. Podle typu a koncentrace auxinů může docházet k pozitivnímu nebo negativnímu ovlivnění biosyntézy nebo akumulace sekundárních produktů¹⁸. Dalším důvodem mohl být nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem

Tabulka IV

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	SIL A ^d [%]	ISO A ^e [%]	ISO B ^f [%]	Silymarin komplex
	OK ^a	0	0	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0,001	0,001	0,002
	24	0,003	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0	0
	72	0	0	0,003	0	0	0,003
	168	0	0	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0,003	0,004	0	0	0	0,004
	12	0,002	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,001	0	0	0	0	0
	72	0	0,001	0	0	0	0,001
	168	0,001	0	0	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0,001	0,001
	72	0,001	0	0	0,001	0	0,002
	168	0,001	0	0	0	0	0,001

^a OK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^b TAX – taxifolin, ^c SILCHR – silychristin, ^d SIL A – silydianin, ^e ISO A – isosilybin A, ^f ISO B – isosilybin B

úspěšné elicitace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení. Sánchez-Sampedro a spol.¹⁹ ve své studii dosáhli největší produkce silymarinu použitím elicitoru methyljasmonátu v koncentraci 100 μM, a to o 600 % oproti kontrole. Chen a spol.²⁰ ve své studii sledovali vztah mezi působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a produkcí fytoalexinu v kulturách *Salvia miltiorrhiza*. Jako původce superoxido-vého anionu použili methylviologen. Působení methylviologenu (MV) na rozdíl od působení peroxidu vodíku spustilo produkci fytoalexinu kryptotanshinonu ve všech sledovaných kulturách. Zároveň MV inhiboval tvorbu biomasy a snížil obsah fenolových kyselin.

Práce vznikla díky podpoře Výzkumného úkolu MSM 0021620822 -Výzkum nových léčkových struktur.

LITERATURA

- Vodrážka Z.: *Biotechnologie*, str. 7, 63. Academia, Praha 1992.
- Beiderbeck R., Reichling J.: *Biologie* 5, 453 (1989).
- Abdollahi M., Rajnbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A.: *Med. Sci. Monitor.* 10, 141 (2004).
- Ke D. S., Sun G. C., Wang Z. X.: *Plant Growth Reg* 51, 83 (2007).
- Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005*. Grada Publishing, Praha 2005.
- Wichtl M.: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, str. 121. Medfarm, Marburg 1994.
- Kosina P., Bartek J.: *Chem. Listy* 94, 115 (2000).
- Flora M. D. K., Hahn M. D. M., Rosen M. D. H., Banner M. D. K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).
- Fraschini F., Demartini G., Esposti D.: *Clinic. Drug Investig.* 22, 51 (2002).
- Křen V., Gažák R., Walterová D., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 565 (2006).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant* 15, 473 (1962).
- Gallová K.: *Rigorózní práce*. Universita Karlova, Praha 2003.
- Kolektiv autorů.: *European Pharmacopeia*, 4. vyd. EDQM, Strsburg 2002.
- Kolektiv autorů.: ČSN ISO 3534-1, Statistika-slovník,

- značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994.
15. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1994.
 16. Řimáková J.: *Disertační práce*. Universita Karlova, Praha 2005.
 17. Alikaris F., Papadakis D., Pantelia K., Kephelas T.: *Fitoterapia* 71, 379 (2000).
 18. Tůmová L., Gallová K., Řimáková J.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 135 (2004).
 19. Sánchez-Sampedro M. A., Fernández-Tárrago J., Corchete P.: *J. Biotechnol.* 110, 60 (2005).
 20. Chen H., Chen F.: *Biotechnol. Lett.* 22, 715 (2000).

L. Tůmová and J. Tůma (^a *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*, ^b *Department of Biology, Pedagogical Faculty, University, Hradec Králové*): **Affecting Production of Secondary Metabolites in *Silybum marianum* Cell Culture by Paraquat Elicitor Treatment**

Elicitation is one of the methods used for increasing the production or accumulation of secondary metabolites. The present study investigates the effect of time and concentration of methylviologen (paraquat) as abiotic elicitor on the flavonolignan production by *Silybum marianum* callus and suspension cultures. The cultures were cultivated on a Murashige-Skoog medium with addition of 10 mg l^{-1} of 1-naphthylacetic acid. The content of flavonolignans was determined by HPLC. The maximal content of flavonolignans was obtained at the methylviologen concentration in callus cultures $c = 2.19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. The production of flavonolignans in suspension culture was little influenced by elicitation.

VYUŽITÍ CHEMICKY MODIFIKOVANÝCH HOŘKÝCH LÁTEK V PIVOVARSTVÍ

MARCEL KARABÍN, TOMÁŠ BRÁNYIK,
RADIM KRULIŠ, MARKÉTA DVOŘÁKOVÁ
a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
karabinm@vscht.cz

Došlo 6.1.09, přijato 26.3.09.

Klíčová slova: pivo, chmel, hořké kyseliny, hořkost

Obsah

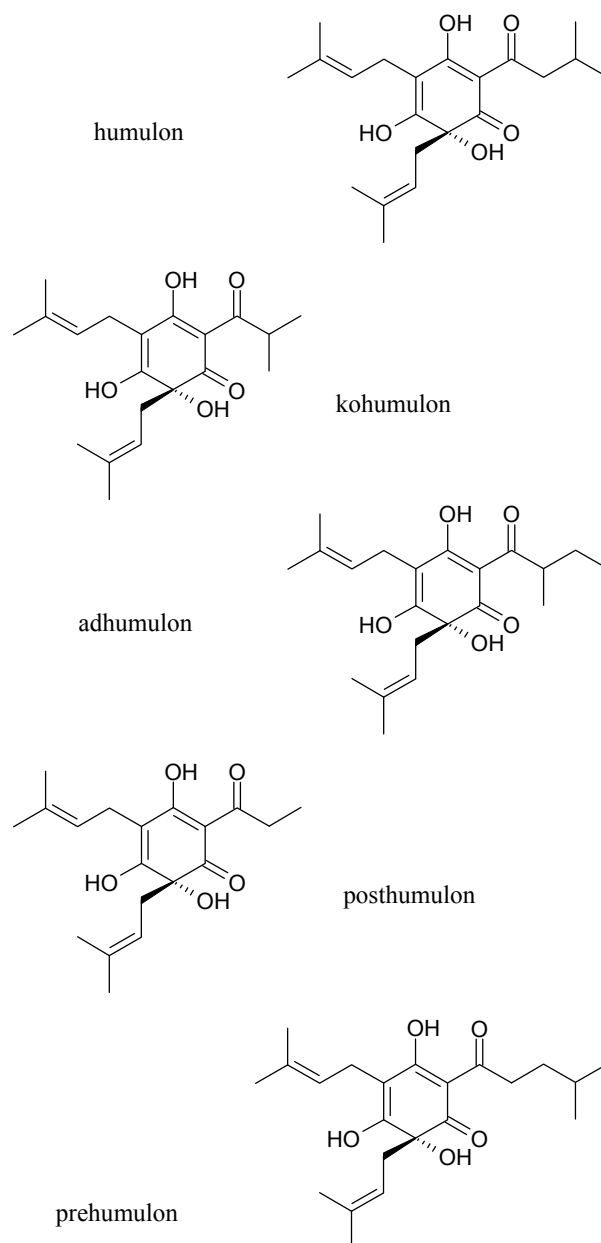
1. Úvod
2. Hořké kyseliny, jejich struktura a pivovarský význam
 - 2.1. α - a iso- α -hořké kyseliny
 - 2.2. Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny
3. Legislativní rámec a technologické možnosti využití redukováných forem hořkých kyselin v pivovarství
 - 3.1. Současný stav legislativy
 - 3.2. Technologie použití redukováných hořkých kyselin
4. Metody stanovení iso- α -hořkých kyselin a jejich redukováných forem
5. Závěr

1. Úvod

Jedním z faktorů, ovlivňujících oblíbenost piva, je jeho specifická příjemná hořkost. Ta je způsobena zejména přítomností skupiny látek, tzv. iso- α -hořkých kyselin, které mají svůj původ ve chmelu¹ a během varného procesu přecházejí do mladiny a následně hotového piva. V posledních letech se při výrobě stále častěji používá průmyslově připravených výrobků, ať už v podobě různě upravených extraktů, které nahrazují chmel v „hořké“ části pivovarské technologie, nebo i přípravků obsahujících chemicky modifikované (zejména hydrogenované) analogy iso- α -hořkých kyselin, které se využívají zejména k tzv. studenému chmelení v průběhu kvasného procesu, nebo i po něm. Motivem pro použití těchto přípravků jsou hlavně technologické a ekonomické důvody (skladování, dávkování, cena), ale i chemicko-fyzikální vlastnosti těchto látek, které mají za následek např. lepší stabilitu pивní pěny, vyšší senzoričnou hořkost a odolnost vůči světelné degradaci.

Vzhledem k tomu, že doposud používané metody

stanovení látek ze skupiny iso- α -kyselin neumožňovaly stanovení jednotlivých isomerů a hydrogenovaných iso- α -kyselin, a použití těchto látek není prozatím zahrnuto v odpovídající evropské legislativě, vyvstala nutnost vytvoření analytické metody schopné, pokud možno v jedné analýze, stanovit obsahy maximálního počtu látek odvozených od iso- α -hořkých kyselin.



Obr. 1. Strukturní vzorce α -hořkých kyselin

2. Hořké kyseliny, jejich struktura a pivovarský význam

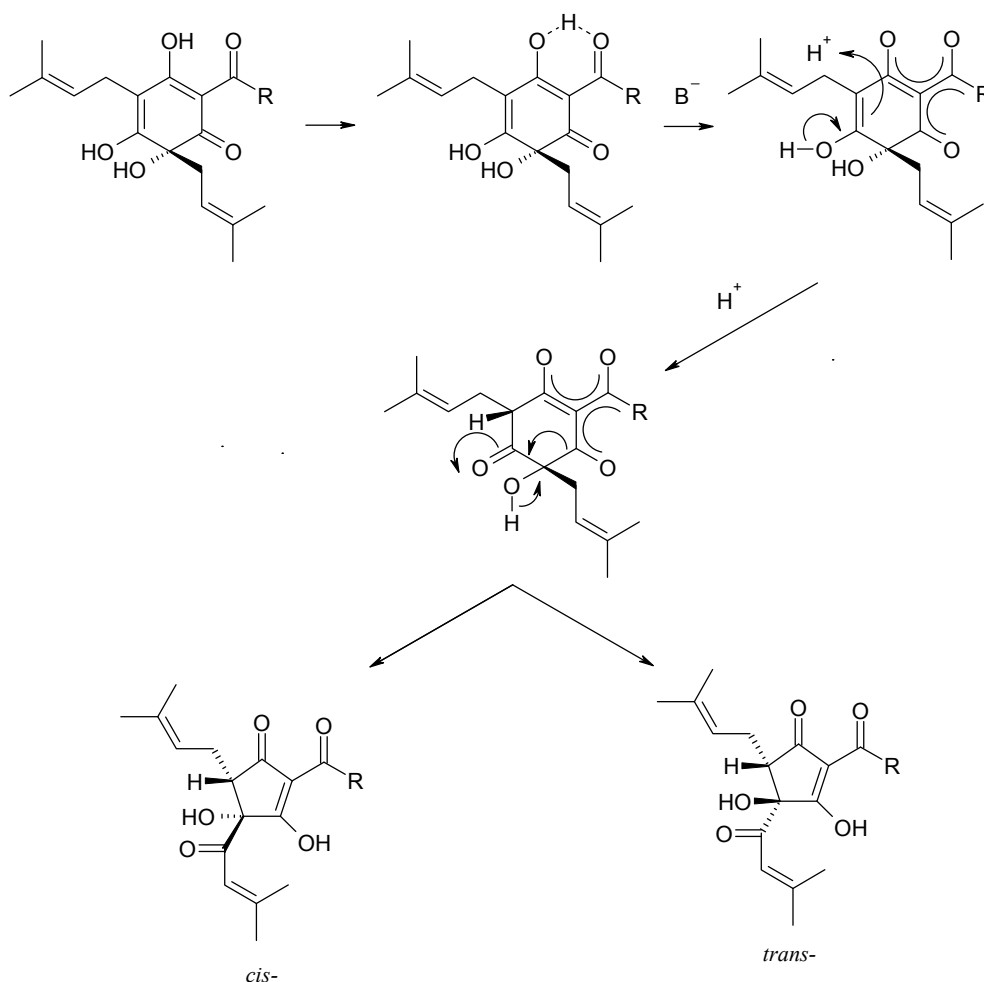
2.1. α - a iso- α -hořké kyseliny

α -Hořké kyseliny jsou základním prekurzorem iso- α -hořkých kyselin vznikajících během pivovarského procesu. Obsah α -hořkých kyselin ve chmelu otáčivém (*Humulus lupulus* L.) je značně závislý nejen na pěstebních podmínkách, ale zejména na odrůdě, takže se podle obsahu těchto látek jednotlivé odrůdy dělí i z hlediska jejich technologického využití². Obvykle se obsah α -hořkých kyselin pohybuje v rozmezí 3–10 hm.%. Struktury jednotlivých homologů se liší pouze postranním acylovým řetězcem a jsou uvedeny na obr. 1. Dominantními isomery ve chmelu jsou humulon, kohumulon a adhumulon, přičemž jejich poměry jsou u jednotlivých odrůd dosti odlišné³.

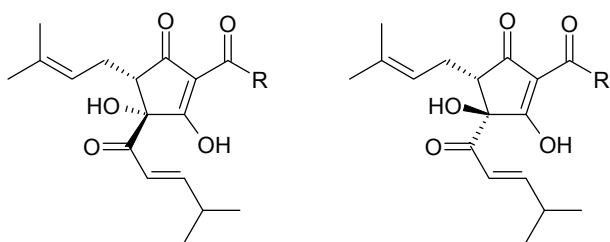
Během chmelovaru dochází k isomeraci α -hořkých kyselin na odpovídající iso- α -hořké kyseliny⁴ (obráz. 2). Vý-

znam této reakce spočívá hlavně ve zvýšení rozpustnosti isomerovaných hořkých kyselin ve vodě (přibližně 120 mg l⁻¹ oproti 3 mg l⁻¹ u α -hořkých kyselin) a z toho vyplývající několikanásobně vyšší organoleptické hořkosti⁵. Intenzita a rychlost isomerace je příznivě ovlivněna vyšším pH, přítomností kovových (měďnatých a hořečnatých) iontů a v případě chmelení granulami též velikostí fázového rozhraní⁶. Výsledkem reakce jsou dva geometrické isomery každé iso- α -hořké kyseliny, přičemž jejich poměr v pivu je prakticky neměnný a pohybuje se okolo 68:32 ve prospěch *cis*-isomerů. Je třeba také zdůraznit, že vzniklé iso- α -hořké kyseliny nejsou konečným produktem reakce a v průběhu chmelovaru se dále rozkládají na další produkty, které nebyly doposud přesně chemicky popsány⁷.

Iso- α -hořké kyseliny jsou zodpovědné za přibližně 70 % hořké chuti piva a ovlivňují zejména prvotní senzorický vjem⁸. Zbývající podíl hořké chuti piva je způsoben mimo jiné řadou vedlejších produktů isomerační reakce, označovaných jako allo-, anti- a abeo-iso- α -hořké kyseliny³. Allo-iso- α -hořké kyseliny (obráz. 3) mají senzorickou

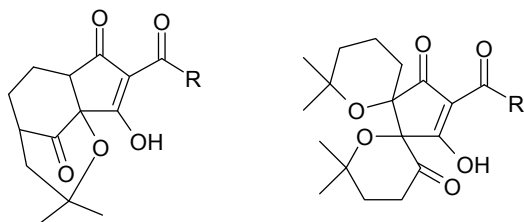


Obr. 2. Mechanismus isomerace humulonů³

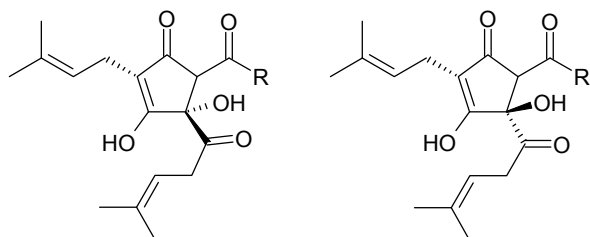


Obr. 3. Strukturní vzorce *cis*-allo-iso- α -hořké kyseliny a *trans*-allo-iso- α -hořké kyseliny

hořkost podobnou iso- α -hořkým kyselinám. Abeo-iso- α -hořké kyseliny (obr. 4) mají složité di- až tricyklické molekuly, nevykazují výraznou senzorickou hořkost, ale mají příznivý vliv na pěnivost piva a na přilnavost pивní pěny. Anti-iso- α -hořké kyseliny (obr. 5) se změněnou konfigurací řetězců na centrálním pětiuhlikatém jádru vykazují až dvakrát vyšší hořkost než iso- α -hořké kyseliny. Jedná se o derivát iso- α -hořkých kyselin s nejvyšší senzorickou hořkostí.



Obr. 4. Příklady strukturních vzorců abeo-iso- α -hořkých kyselin



Obr. 5. Strukturní vzorce *cis*-anti-iso- α -hořké kyseliny a *trans*-anti-iso- α -hořké kyseliny

2.2. Hydrogenované iso- α -hořké kyseliny

Struktura a průmyslová výroba^{3,9}

Látky ze skupiny redukováných iso- α -hořkých kyselin jsou odvozeny od iso- α -hořkých kyselin pocházejících z chmele a dělí se do skupin podle stupně redukce dvojných

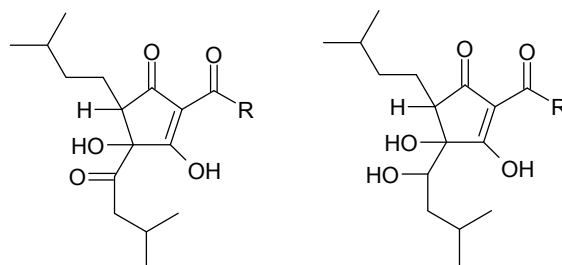
resp. karbonylových vazeb na postranních řetězcích na:

- dihydro-iso- α -hořké kyseliny (Rho),
- tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny,
- hexahydro-iso- α -hořké kyseliny.

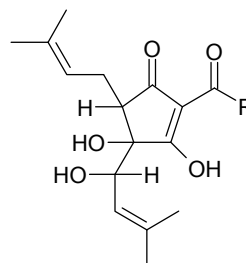
Struktury redukováných iso- α -hořkých kyselin jsou uvedeny na obr. 6 a 7. U rho-iso- α -hořkých kyselin je redukována primárně karbonylová skupina v postranním (4-methyl-3-pentenyl) řetězci za vzniku sekundárního alkoholu s novým chirálním centrem. Z každé iso- α -kyseliny tak vzniknou dva rho-isomery. Naproti tomu u tetrahydroiso- α -hořkých kyselin jsou redukovány v první řadě dvojné vazby na postranních řetězcích. Tento rozdíl se pak promítá i do odlišného způsobu výroby, jehož principem je použití sledu hydrogenací a isomeračních reakcí, přičemž pořadí a způsob provedení se liší podle stupně hydrogenace hořké kyseliny⁹.

Rho-iso- α -hořké kyseliny se vyrábějí dvěma možnými cestami. První možností je redukce předem připravených iso- α -hořkých kyselin v podobě isomerizovaného chmelového extraktu, druhou cestou pak je souběžná isomerace a redukce α -hořkých kyselin, v obou případech je redukčním činidlem borohydrid sodný. Oba procesy probíhají při zvýšené teplotě v alkalickém prostředí, zbytky redukčního činidla jsou následně odstraněny okyselením HCl a vzniklé redukované iso- α -hořké kyseliny jsou následně převedeny na odpovídající soli hydroxidem draselným.

Tetra-iso- α -hořké kyseliny se vyrábějí celou řadou způsobů, lišících se počáteční surovinou, kterou mohou být jak α -, tak i β -hořké kyseliny. U výroby založené na



Obr. 6. Obecné vzorce tetrahydro- a hexahydro-iso- α -hořkých kyselin



Obr. 7. Obecný vzorec p-iso- α -kyseliny

použití α -hořkých kyselin jsou surovinou opět buď předem vyrobené iso-hořké kyseliny, méně často pak neisomero-
vané hořké kyseliny. Na rozdíl od výroby rho-iso- α -
hořkých kyselin jsou redukovány v kapalně fází plynným
vodíkem na palladio-uhlíkovém katalyzátoru. Důvody pro
využití β -hořkých kyselin k výrobě hydrogenovaných ana-
logů jsou čistě ekonomické, protože β -hořké kyseliny jsou
vedlejším produktem výroby iso- α -hořkých kyselin a nee-
xistuje pro ně doposud jiné komerční využití. Celý postup,
který je poměrně komplexní a výrazně složitější než výro-
ba z α -hořkých kyselin, je zahájen hydrogenací na palla-
dio-uhlíkovém katalyzátoru, následnou oxidací vzniklého
produktu (tetrahydrodeoxy- α -hořkých kyselin) kyselinou
peroctovou a nakonec isomerací vzniklých tetrahydro- α -
hořkých kyselin.

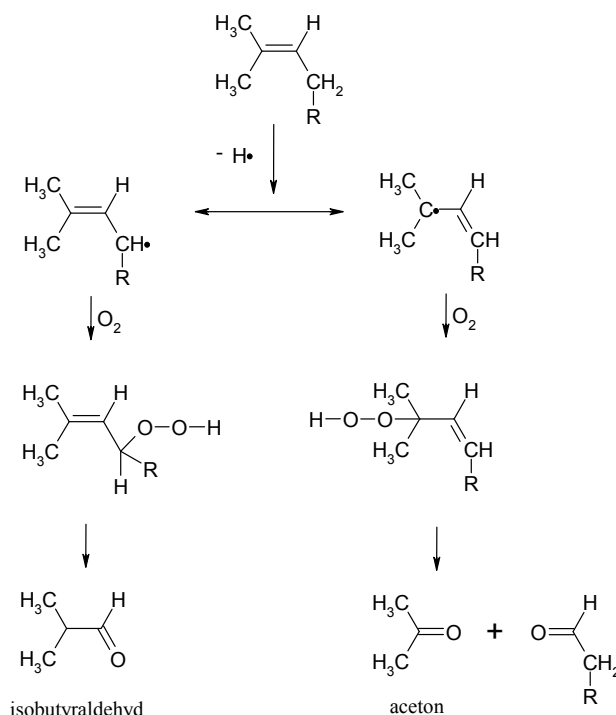
Surovinou pro výrobu hexahydroiso- α -hořkých kysel-
lin jsou produkty předchozích redukčních postupů, při-
čemž je na každý z nich použit doplňkový hydrogenační
krok, tj. rho-iso- α -hořké kyseliny jsou redukovány vodí-
kem na palladio-uhlíkovém katalyzátoru a tetrahydroiso-
 α -hořké kyseliny borohydridem sodným.

Výhody použití redukováných iso- α -hořkých kyselin

Z technologického hlediska přináší použití moderních
chmelicích preparátů značné výhody. Proto také pivovary
stále ve větší míře přistupují k náhradě granulovaného
chmele chmelovými extrakty a zejména v poslední době
i výrobky obsahujícími hydrogenované iso- α -hořké kyseliny¹⁰. Tyto výrobky se snadněji dávkuje, vzhledem
k vysokým koncentracím vyžadují méně prostoru pro skla-
dování, jsou zcela homogenní s přesně známým složením
a oproti hlávkovému chmelu nebo chmelovým granulím
mají výrazně vyšší chemickou stabilitu. Kromě toho po-
skytují redukované formy iso- α -hořkých kyselin řadu vý-
hod souvisejících s jejich odlišnými fyzikálně chemickými
vlastnostmi. Jedná se zejména o:

- vyšší hořkost (s výjimkou rho-kyselin),
- odolnost proti světelné degradaci,
- schopnost zlepšovat stabilitu pивní pěny.

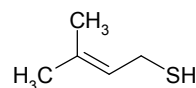
Rho-iso- α -kyseliny dodávají pивu slabší senzoričnou
hořkost než ekvivalentní množství nemodifikovaných iso-
 α -kyselin (přibližně o 30 %), na druhou stranu je však tato
hořkost při senzoričném hodnocení označována jako
„jemnější“, což může znamenat lepší hodnocení pивa spo-
třebitelem. Naproti tomu tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny
sice poskytují hořkost výrazně intenzivnější (až o 70 %
oproti nemodifikovaným iso-hořkým kyselinám), tato hoř-
kost je však vnímána jako „drsnější“ a tudíž méně příjem-
ná¹¹. Určitým kompromisem by mohlo být použití hexa-
hydro-iso- α -hořkých kyselin, v dalším textu však budou
zmíněny vlastnosti těchto látek, které omezují jejich použi-
tí pouze na adjustaci hořkosti. Vzhledem ke zmíněným
skutečnostem je tedy vhodné, aby si každý výrobce našel
svou vlastní cestu v používání těchto preparátů, tak aby co
nejlépe vyhovovala specifickým senzoričným vlastnostem
konkrétního výrobku.



Obr. 8. Autooxidace 3-methylbut-2-enylových postranních řetězců³

Je známo, že při skladování pивa dochází k rozkladu
iso- α -kyselin vlivem autooxidace¹² a reakcí s reaktivními
formami kyslíku¹³. Tyto reakce neprobíhají ve významné
míře při nízkých teplotách, avšak nabývají na významu
během expedice a skladování v prodejních řetězcích. Bylo
zjištěno, že *trans*-iso- α -kyseliny podléhají rozkladu
v daleko větší míře než *cis*-iso- α -kyseliny^{14,15}. To je prav-
děpodobně způsobeno bližší vzájemnou polohou dvojných
vazeb v 3-methyl-2-butenylových a 4-methyl-3-pente-
nylových postranních řetězcích¹⁶. Nenasycené postranní
řetězce jsou napadány volnými radikály na uhlíku sousedí-
cím s dvojnou vazbou a vzniklé hydroperoxy se štěpí na
isobutyraldehyd a aceton (obr. 8).

Další možnou cestou vzniku senzoričnou nežádoucích
produktů je reakce 3-methyl-2-butenylového radikálu
s thiolovou skupinou siričných aminokyselin za vzniku
3-methylbut-2-en-1-thiolu (obr. 9), látky s velice nízkým
prahem vnímání (2–20 ng l⁻¹)¹⁷, která je zdrojem charakte-
ristické „letinkové“ příchuti¹⁸. Redukované iso- α -kyseliny
(di-, tetra- i hexahydro-) v důsledku nepřítomnosti reakti-
vní α -hydroxyketoskupiny, resp. nasycení postranního ře-



Obr. 9. 3-Methylbut-2-en-1-thiol

Tabulka I

Srovnání jednotlivých látek ovlivňující hořkost piva³

Produkt	Relativní hořkost	Zlepšení pěnivosti při ekvivalentní hořkosti	Fotostabilita
Iso- α -kyseliny	1,00	*	ne
ρ -Iso- α -kyseliny	0,65	*	ano
Tetrahydro-iso- α -kyseliny	1,7	***	ano
Hexahydro-iso- α -kyseliny	1,1	**** (nepřirozeně hustá)	ano

těžce, těmto degradačním reakcím nepodléhají¹⁹. Využívají se proto často při výrobě piv se zvýšenou odolností proti senzorickým vadám způsobeným těmito procesy (piva stáčená do čirých lahví).

Druhou významnou předností redukováných iso- α -kyselin je jejich schopnost zlepšovat tvorbu pивní pěny a prodlužovat dobu jejího rozpadu, zvláště za přítomnosti hydrofobních polypeptidů. Vzhledem k nepolárnímu charakteru jsou iso- α -kyseliny hydrofobní a společně s kationty dvojmocných kovů a bílkovinami tvoří základ stabilního povrchu membrán pивních bublin. Další zvýšení hydrofobicity u redukováných iso- α -hořkých kyselin dále pozitivně ovlivňuje hustotu pивní pěny a její přilnavost ke stěně pивní sklenice, čímž brzdí její rozpad²⁰. Nevýhodou zejména hexahydro-iso- α -hořkých kyselin je skutečnost, že při nadměrném používání těchto látek vzniká pěna nepřirozeně hustá a stálá, která je spotřebitelem vnímána spíše negativně²¹. Tento fakt je dalším argumentem pro opatrné využívání těchto derivátů při výrobě piva.

Některé technologické vlastnosti redukováných iso- α -kyselin jsou shrnuty v tab. I.

3. Legislativní rámec a technologické možnosti využití redukováných forem hořkých kyselin v pivovarství

3.1. Současný stav legislativy

Legislativní rámec použití redukováných forem iso- α -hořkých kyselin pro výrobu piva se značně liší pro Evropskou unii a pro země, pro které je závazné rozhodnutí U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Prozatím neexistuje žádná směrnice Evropské unie, která by upravovala použití chemicky modifikovaných chmelových výrobků, obsahujících hydrogenované formy iso- α -hořkých kyselin, takže se jejich použití řídí místní legislativou jednotlivých zemí, podle toho, zda jsou tyto výrobky považovány za aditiva, nebo za modifikované chmelové extrakty. Typickým historickým příkladem nulové tolerance k používání jiných než čistě přírodních surovin může být německý zákon o čistotě piva (Reinheitsgebot). Toto ustanovení pocházející ze 16. století, přestože bylo již v roce 1982 odmítnuto Evropskou komisí, stále přetrvává ve zvykové podobě i jako součást německých daňových zákonů a prakticky zapovídá použití

všech chemicky upravených chmelových výrobků pro pivovarské účely v Německu²². V současné době je připravována společná evropská směrnice²³, která podle svého aktuálního znění předpokládá zařazení výrobků obsahujících redukované iso- α -hořké kyseliny mezi potravinářská aditiva. V souvislosti s touto skutečností bude zřejmě nutno vyznačovat použití těchto výrobků na obalech a lze tedy očekávat snahu o vytvoření uznaných analytických metod pro stanovení redukováných iso- α -hořkých kyselin.

V České republice se problematika klasifikace těchto výrobků řešila pouze v rámci projektu přidělování značky kvality „Klasa“. Ministerstvo zemědělství v rámci posuzování žádostí poskytla administrátorovi projektu, Zemědělskému garančnímu a intervenčnímu fondu, jednoznačné vyjádření (respektující právní názor resortu). V něm konstatuje, že s ohledem na prohlášení výrobce a vzhledem k závěrům vyplývajícím z odborné literatury (výrobky, obsahující redukované iso- α -hořké kyseliny mohou být použity k produkci ke světlu stabilních piv a přidávány do piva v malých množstvích ke zlepšení vzhledu pěny i její stability)⁹, i s ohledem na skutečnost, že jde o chemicky významně pozměněné produkty, které nelze chemicky identifikovat s hořkými látkami ve chmelu ani v mladíně, je třeba považovat je za přídatné látky typu stabilizátorů pěny, které je nutno před aplikací nechat schválit a uvádět na etiketě jako aditivum.

Jednodušší je situace ve Spojených státech amerických, kde byly rozhodnutím FDA tyto výrobky zařazeny mezi modifikované chmelové extrakty a jejich používání se řídí stejnými právními úpravami jako používání isoextraktů²⁴.

3.2. Technologie použití redukováných hořkých kyselin

Jak už bylo uvedeno, na rozdíl od přírodního nebo mechanicky a fyzikálně upraveného chmele nebo chmelového výrobku, jehož použití se prakticky bez výjimky omezuje na varní část pivovarské technologie²⁵, je možno chemicky modifikované preparáty aplikovat i v pozdějších fázích výroby²³. Rho-iso- α -hořké kyseliny, obvykle dodávané v podobě 35 hm.% roztoku draselných solí je možno přidávat buď během chmelovaru, nebo častěji po naředění (10 hm.%) přímo do hotového piva po ukončení kvašení²⁶. Další alternativou je použití směsi rho-iso- α -hořké kyselin, β -hořkých kyselin a chmelových silic (tzv. „light sta-

ble kettle extract“), jejímž použitím přímo na varné získá pivo intenzivnější chmelové aroma, které je v případech, kdy je pro chmelení piva použito výhradně chmelových extraktů, často potlačeno^{27,28}. Tetra- a hexahydro-iso- α -hořké kyseliny jsou dodávány v koncentracích okolo 10 hm.% a po ředění na 2 až 5 hm.% jsou dávkovány buď do prokvašeného piva, nebo je možné i dávkování až během stáčení²⁶. Nevýhodou dávkování těchto preparátů do hotového piva jsou ekonomické náklady spojené s nutností instalace speciálního dávkovacího zařízení při stáčení.

4. Metody stanovení iso- α -hořkých kyselin a jejich redukovaných forem

Klasickou metodou pro stanovení iso- α -hořkých kyselin v pivovarství je metoda podle EBC (European Brewery Convention), spočívající ve spektrofotometrickém stanovení v UV oblasti po předchozí extrakci do iso-oktanu²⁹. Přestože tato metoda plně postačuje pro orientační určení obsahu hořkých látek, přináší s sebou její použití řadu obtíží. V první řadě se jedná o skupinové stanovení všech hořkých látek, takže nejenže není možno stanovit obsahy jednotlivých isomerů, ale výsledek stanovení je ovlivněn přítomností dalších chemicky podobných látek. Navíc není tato metoda použitelná pro odlišení redukovaných analogů hořkých kyselin. Stejně tak pomocí dříve používaných chromatografických metod³⁰ nebylo možno oddělit *cis*- a *trans*-isomery. Tak vznikl požadavek na metodu, schopnou přesně detegovat a kvantifikovat iso- α -kyseliny a redukované iso- α -kyseliny v pivu, která by mohla poskytnout širší spektrum informací o obsahu látek použitých ke chmelení piva.

Základem pro tyto nové metody je obvykle HPLC, i když v literatuře jsou zmiňovány i metody založené na SDS-kapilární elektroforéze v kombinaci s diode-array (DAD) detekcí³¹. Většina současných prací však využívá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na kolonách s reverzní (nejčastěji C18) fází v kombinaci s UV (DAD) nebo MS¹ detekcí^{32–34}. Kvantifikace jednotlivých látek je značně zjednodušena dostupností komerčních standardů iso-, dihydro-, tetrahydro- i hexahydro-iso- α -kyselin³⁵.

Prvním, obvykle nezbytným krokem stanovení, je koncentrování stanovovaných látek. Klasická extrakce kapalina-kapalina je vzhledem ke zdlouhavosti procesu nahrazována šetrnější extrakcí na pevné fázi (SPE), kde zatím největší uplatnění našly sorbenty s různými reverzními fázemi obvykle vázanými na silikagel. Harms³³ ověřil použitelnost oktylových, oktadecylových, fenylových modifikovaných silikagelů a polystyrenových SPE sorbentů, přičemž zjistil, že ačkoli všechny fáze jsou pro stanovení daných analytů použitelné, nejvhodnější se jeví reverzní fáze oktylové, resp. oktadecylové. Výhodou postupů založených na SPE je kromě menší časové náročnosti i omezení chyb vyplývajících z oxidace a světelné a termické degradace analyzovaných látek v důsledku použití poměrně krátkého a k analytu citlivého postupu. Určitou nevýhodou

může být určitá nejednotnost v kvalitě jednotlivých šarží kolonek³⁶.

HPLC eluce je nejčastěji gradientová, přičemž vzhledem k počtu a chemické podobnosti stanovovaných látek byla odzkoušena celá řada mobilních fází na bázi směsi methanolu, acetonitrilu nebo ethanolu s nejrůznějšími pufrů, tak aby se pH mobilní fáze pohybovalo v neutrální nebo mírně alkalické (pH 6–9) oblasti^{33,35}. Konkrétně byla ověřena srovnatelnost získaných výsledků získaných za použití pufrů na bázi mravenčanu amonného, octanu amonného a fosforečnanu, citrátu a octanu sodného³⁷. K analýze je možno použít široké spektrum běžně komerčně dostupných kolon, jejichž reverzní fáze je tvořena oktadecylovým silikagelem. Nejnovější metodika stanovení a kvantifikace iso- α -kyselin se opírá o využití nových typů kolon s rigidní „monolitickou“ strukturou silikagelu umožňujících analýzy s vysokým průtokem mobilní fáze. Použití těchto kolon by umožnilo zvýšit celkovou rychlost analýzy nejen zkrácením doby zdržení vzorku na přístroji, ale také možností vynechat předchozí krok SPE³⁸.

K detekci se využívá nejčastěji UV detektorů, přičemž v poslední době se stále více prosazují detektory na bázi diodového pole, které umožňují měření profilu absorbance v celé šíři UV spektra, který je pro látky více či méně charakteristický a v důsledku toho umožňují i kvalitativní charakteristiku neznámého vzorku. Spektra všech analogů iso- α -kyselin byla již změřena a i přes určité problémy způsobené opět značnou fyzikálně-chemickou podobností jednotlivých iso- α -kyselin, která má za následek zaměnitelnost jejich spekter, nám využití DAD detektoru umožňuje zbavit se chyb způsobených případnou koelucí jiných látek^{37–39}. Někteří autoři využili při analýze hmotnostního detektoru v negativním módu, po předchozí „electrospray“ ionizaci. Takto byly stanoveny nominální hmoty (*m/z*) i pro několik dalších isomerů hydrogenovaných iso- α -kyselin, jejichž analýza nebyla pomocí jiných metod možná³⁷.

Intenzivní snaha jednotlivých pracovišť vyústila ve vznik řady nových metodik, schopných v průběhu jedné analýzy spolehlivě stanovit obsahy redukovaných i neredukovaných iso- α -hořkých kyselin, včetně obsahů *cis*- a *trans*-isomerů⁴⁰, takže bude v budoucnu možné kontrolovat použití isomerovaných a redukovaných chmelových výrobků během procesu výroby piva a ověřit tak způsob chmelení a původ surovin deklarovaných výrobcem.

Závěr

V současné době je možno pro výrobu piva použít nejen přírodních, minimálně upravených chmelových výrobků, ale také velké množství preparátů, obsahujících široké spektrum sloučenin, které se v původní pivovarské surovině, chmelu, vůbec nevyskytují. Tyto chemicky modifikované látky poskytují při výrobě celou řadu technologických výhod, např. zlepšení pěnivosti, hořkosti a senzorycké stability. Na druhou stranu jejich použitím ztrácí pivo

svůj charakter „přírodního“ nápoje.

V souvislosti s těmito skutečnostmi probíhá v současnosti široká diskuse, týkající se zařazení těchto preparátů do legislativního rámce výroby nápojů tak, aby bylo jednoznačně stanoveno, zda se jedná o modifikované chmelové výrobky, nebo o potravinářská aditiva.

Pokud by tyto látky byly zařazeny do skupiny aditiv, přineslo by to automaticky požadavky na vyvinutí nových moderních analytických metod, schopných jednoznačně prokázat přítomnost látek nepocházejících z přírodních surovin. Tyto postupy, založené na HPLC by měly být schopny v jedné analýze souběžně stanovit iso-, dihydro-, tetrahydro- i hexahydro-iso- α -hořké kyseliny včetně jejich geomerické isomery a poskytnout tak komplexní informaci o obsazích nejdůležitějších látek, odpovědných za hořkou chuť i celou řadu dalších senzorických vlastností piva.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (1M0570 a MSM6046137305).

LITERATURA

- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 895 (2007).
- Verzele M., De Keukeleire D.: *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids*. Elsevier, Amsterdam 1991.
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens R.: *Brewing Science and Practice*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge 2004.
- De Keukeleire D., Verzele M.: Tetrahedron 27, 4939 (1971).
- Peacock V.: Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am. 35, 4 (1998).
- Kunze W.: *Technology Brewing and Malting*, VLB, Berlin 1999.
- Malowicki M. G., Shellhammer T. H.: J. Agric. Food Chem. 53, 4434 (2005).
- Techakriengkrai I., Paterson A., Taidi B., Piggot J. R.: J. Inst. Brew. 110, 51 (2004).
- Roberts T. R., Wilson R. J. H.: *Handbook of Brewing*, (Priest F. G., Stewart G. G., ed.), 2. vyd. Taylor and Francis, London 2006.
- De Cooman L., Aerts G., De Rouck G., Syryn E., Van Opstaele F., Goiris K., De Ridder M., Joos P., De Keukeleire D.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 24, 276, 2003.
- Todd P. H., Johnson P. A., Worden L. R.: Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am. 9, (1972).
- Kaneda H., Kano Y., Osawa T., Kawakishi S., Kameda K.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 47, 49 (1989).
- Wackerbauer K., Hardt R.: Brauwelt Int. 4, 320 (1997).
- De Cooman L., Aerts G., Witters A., De Ridder M., Boeykens A., Goiris K., De Keukeleire D.: Cerevisia 26, 155 (2001).
- Araki S., Takashio M., Shinotsuka K.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 60, 26 (2002).
- De Cooman L., Aerts G., Overmeire H., De Keukeleire D.: J. Inst. Brew. 106, 169 (2000).
- Irwin A. J., Bordeleau J., Barker R. L.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 51, 1 (1993).
- Sakuma S., Rikimaru Y., Kobayashi K., Kowaka M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 49, 162 (1991).
- Huvaere K., Andersen, M. L., Skibsted L. H., Heyerick, A., De Keukeleire, D.: J. Agric. Food Chem. 53, 1489 (2005).
- Čížková H., Dostálek P., Fiala J., Kolouchová I.: Chem. Listy 100, 478 (2006).
- Bamforth C. W., Kanauchi M.: J. Sci. Food Agric. 8, 1045 (2003).
- Donhauser S., v knize: *Modern Methods of Plant Analysis – Beer Analysis* (Linskens H. F., Jackson J. F., ed.), sv. VII, Springer-Verlag, Heidelberg 1988.
- Amended proposal for a: REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on food additives, COM(2007) 673 final, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/com/2007/com2007_0673en01.pdf, staženo 9.10.2008.
- FDA: Code of Federal Regulations, 21CFR - Food and drugs, 172.560 (U.S. FDA 2008), <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.560>, staženo 18.9.2008.
- Cvengroschová M., Šmogrovičová D.: Chem. Listy 101, 287 (2007).
- http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/hop_products.htm, staženo 18.9.2008.
- <http://www.hopsteiner.com/pdf/products/LSKE04.pdf>, staženo 18.9.2008.
- Wilson R. J. H., Roberts T., Smith R. J., Biendl M.: Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am. 38, 11 (2001).
- European Brewery Convention – Analytica EBC*, kap. 7.8, Getränke Fachverlag, Nürnberg 1998.
- European Brewery Convention – Analytica EBC*, kap. 9.8, Getränke Fachverlag, Nürnberg 1998.
- Royle L., Ames J. M., Hill C. A., Gardner D. S. J.: Food Chem. 74, 225 (2001).
- Vanhoenacker G., De Keukeleire D., Sandra P.: J. Chromatogr., A 1035, 53 (2004).
- Harms D., Nitzsche F.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 59, 28 (2001).
- Hofta P., Dostálek P., Sýkora D.: J. Inst. Brew. 113, 48, (2007).
- Biendl M., Hartl A.: Monatsschr. Brauwiss. 48, 102 (1995).
- Jurková M., Kellner V., Čulík J.: Kvasny Prum. 49, 258 (2003).
- Ting P. L., Kay S., Ryder D.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 65, 9 (2007).
- Bolívar A., Gasparri M., Zufall C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 64, 39 (2006).
- Khatib A., Kyong K. H., Wilson E. G., Verpoorte R.: J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 29, 293 (2006).
- Straková L., Hofta P., Dostálek P., Průcha P.: Kvasny Prum. 53, 70 (2007).

M. Karabín, T. Brányik, R. Kruliš, M. Dvořáková, and P. Dostálek (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Application of Chemically Modified Bitter Compounds in Brewing**

Iso- α -acids or isohumulones are hop-derived beer constituents formed in the brewing process. Iso- α -acids are light-sensitive; they play a key role in the origin of the well-known light-struck off-flavour of beer. To prevent the

negative effect of light, beers are generally stored in light-proof cans or dark bottles. Alternatively, reduced iso- α -acids, resistant to light-induced degradation, can be added to beer. These substances also show a positive effect on foam stability. This paper describes the impact of iso- α -acids, reduced iso- α -acids, tetrahydro-iso- α -acids, and hexahydro-iso- α -acids on brewing; their food legislation frame is also mentioned. Chemical and physical methods of analysis of the substances are also reviewed.

PRÍRODNÉ LÁTKY RASTLINNÉHO PÔVODU A ICH VYUŽITIE V TERAPII ONKOLOGICKÝCH OCHORENÍ

PETRA CIBÍKOVÁ, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ
a MICHAL MARUNA

*Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univer-
zita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
petracibik@yahoo.com*

Došlo 27.3.08, prepracované 5.11.08, prijaté 9.11.08.

Kľúčové slová: rastlinné protirakovinové látky, inhibítory
tubulínu, topoizomerázy

Obsah

1. Úvod
2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín
 - 2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov
 - 2.1.1. Vinca alkaloidy
 - 2.1.2. Epipodofylotoxíny
 - 2.1.3. Combretastatíny a kolchicín
 - 2.1.4. Kamptotecíny
 - 2.1.5. Taxány
 - 2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách
 - 2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I
 - 2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu
 - 2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulínové inhibítory
 - 2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku
3. Záver

1. Úvod

Malígne nádory predstavujú druhú najčastejšiu príčinu smrti, hneď za srdcovo-cievnyimi ochoreniami. Hlavnou prekážkou v boji proti rakovine je nešpecifický účinok používaných chemoterapeutík. V minulosti bránilo možnosti cielene útočiť voči rakovinovým bunkám neúplné poznanie rozdielov medzi nimi a normálnymi bunkami, keďže sú v mnohých ohľadoch veľmi podobné. Koncom 80. rokov výskum v oblasti molekulovej biológie a genetiky odhalil rozdiely v signálnych dráhach regulujúcich bunkovú proliferáciu a odštartoval systémovú evolúciu boja proti rakovine. V 90. rokoch sa výrazne transformoval prístup k vyvíjaniu protirakovinových liečiv, začala

sa „era cielej terapie“, a hľadania liečiv selektívne účinných na kľúčové proteíny¹. Príroda je atraktívnym zdrojom terapeutických zlúčenín, ktoré sú vhodné pre dnešný molekulovo orientovaný prístup k vývoju liečiv ako aj ich vzájomnému kombinovaniu, nakoľko vyvolávajú menej nepriaznivých vedľajších účinkov a pôsobia ako tonikum. Dnes je viac ako 50 % využívaných liečiv prírodného pôvodu a takmer polovica z 25 svetovo najpredávanejších farmaceutických produktov je odvodená z prírodných látok².

2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín

Rastliny používané pre etnofarmakologické účely sa stali primárnymi zdrojmi pre vyhľadávanie prírodných liečiv v medicíne. Výskum liečiv z rastlín je dnes založený hlavne na izolácii a štúdiu bioaktivity na základe ich pôsobenia. Ďalším krokom je charakterizácia spojená s modifikáciami, úpravami liečiva s cieľom zvýšiť jeho aktivitu a potlačiť toxické vplyvy, zlepšenie farmakologického profilu ako aj syntéza analógov. Modifikácia štruktúry prebieha za pomoci štyroch typov štúdií³:

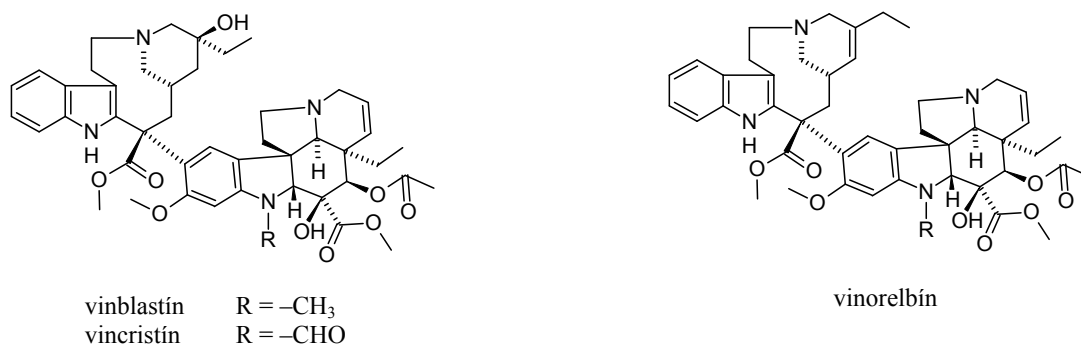
- vzťah štruktúra – aktivita (SAR), zahŕňa kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu,
- mechanizmus účinku, vzťah liek – receptor a špecifické enzýmové inhibície,
- štúdie metabolizmu liečiv vrátane identifikácie bioaktívnych metabolitov a blokovanie metabolickej inaktívácie,
- modelové molekulové štúdie a stanovenie trojrozmerných farmakofórov.

2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov

Pri liečbe rakoviny je v súčasnosti úspešne používaných viacero zlúčenín získaných z rastlín.

2.1.1. Vinca alkaloidy

K jedným z najvýznamnejších protirakovinových liečiv v klinickej praxi patrí skupina vinca alkaloidov, izolovaných z rastlín zimozelene (*Catharanthus roseus*), ktoré rastú v pralesoch Madagaskaru, a *Vinca sp.* vyskytujúce sa v Európe. Vincristín, jeho chemické analógy vinblastín a vinorelbín patria k mitotickým inhibítormi (obr. 1). Sú schopné naviazať sa na tubulínové diméry, vytvoriť stočené špirálovité agregáty a zabrániť formovaniu mikrotubulínovej štruktúry. To vedie k zastaveniu mitózy v metafáze, čo má vplyv najmä na rapídne sa deliace rakovinové bunky, avšak aj intestinálny epitel a kostnú dreň. Rozsah špiralizujúceho potenciálu u jednotlivých



Obr. 1. Štruktúra najznámejších vinca alkaloidov

derivátov je: vincristín > vinblastín > vinorelbín > vinflunín, čo zodpovedá klinickým dávkam, kde platí vincristín < vinblastín < vinorelbín⁴. Používajú sa hlavne v kombinácii s ostatnými chemoterapeutikami na liečbu leukémie, lymfómov, Kaposiho sarkómu, nemalobunkového karcinómu pľúc a rakoviny prsníka. Zavedenie vinca alkaloidov vincristínu a vinblastínu do klinickej praxe zvýšilo počet vyliečených pacientov Hodgkinsovej choroby a používajú sa aj pri niektorých formách leukémie⁵.

2.1.2. Epipodofylotoxíny

Biologicky aktívna zložka podofylotoxín a jeho známe lignany sa prejavujú veľkou gastrointestinálnou toxicitou a preto iba glykozidy⁶ etoposidu a tienofenového analógu tienoposidu, ktoré majú zníženú toxicitu, sa klinicky využívajú na liečbu lymfómov, rakoviny dýchacích ciest, testi-

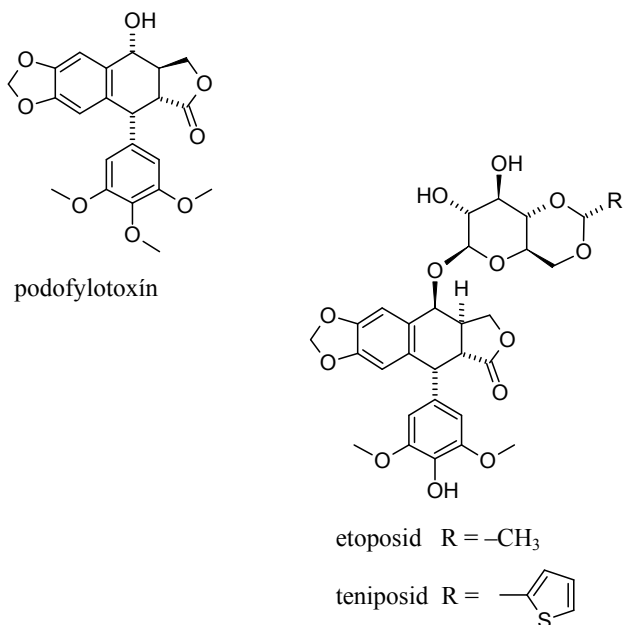
kulárnej rakoviny (obr. 2). Prírodný podofylotoxín je používaný ako prekursor pre chemickú syntézu protirakovinových biologicky aktívnych látok etoposidu a tienoposidu. Etoposid významne zvýšil úspešnosť liečenia testikulárnej rakoviny pri použití s bleomycínom (taktiež odvodený z prírodného produktu) a cisplatinou. Etoposid a prírodný produkt podofylotoxín (PPT), bioaktívny komponent *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodi* a *Podophyllum pleianthum*, sú štruktúrne veľmi podobné s tromi významnými rozdielmi:

- opačná stereochemia na C-4 (β v etoposide a α v PPT),
- rozdielny substituent na C-4 (glykozyl na etoposide, OH na PPT),
- na C-4' má etoposid OH, na rozdiel od PPT, ktorý má naviazaný OCH_3 .

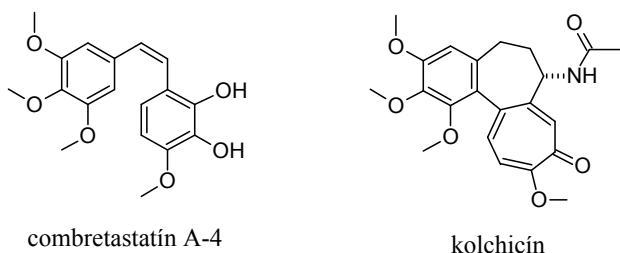
Tieto dve zlúčeniny majú tiež rozdielny mechanizmus účinku. Podofylotoxín sa reverzibilne viaže na tubulín a inhibuje tvorbu mitotického vretienka. Etoposid inhibuje DNA topoizomerázu II a následne stimuluje DNA štiepenie. Biooxidácia etoposidu na *E*-kruhu orto-chinónu spôsobuje kovalentné viazanie na proteíny a hydroxylované radikály tvorené metal-etoposidovými komplexami s následným metal- a fotoindukovaným štiepením DNA³.

2.1.3. Combretastatíny a kolchicín

Combretastatín A-4 (obr. 3) bol prvýkrát izolovaný z juhoafrickej vŕby *Combretum caffrum*⁷. Combretastatíny, deriváty stilbénu s esenciálnym trimetoxylým postranným reťazcom, predstavujú novú skupinu terapeutických vaskulárne cielených zlúčenín. Tieto látky sa využívajú pri ochoreniach a patologických rakovinových stavoch, kde abnormálny rast krvných ciev je nevyhnutný pre progresiu choroby. Účinne pôsobia na mikrotubuly, ktoré formujú cytoskelet endotelových buniek tak, aby sa podporilo prekrvenie nádora. Keď sa tubulínová štruktúra naruší, zmenia svoj tvar z plochého na okrúhly, čím dochádza k zastaveniu prítoku krvi cez kapiláry s následným vyhľadovaním nádora a zničením. Combretastatín A-4 pôsobí primárne na nádory, pretože tam sa formujú nové cievy. Aktín, proteín, ktorý chráni tubulín, je prítomný iba v dospelých bunkách, nie však v nových. Napriek svojmu



Obr. 2. Štruktúra hlavných zástupcov skupiny epipodofylotoxínov



Obr. 3. Predstaviteľ nových vaskulárne cielených zlúčenín a kolchicín

protirakovinovému potenciálu má combretastatín postranné účinky v normálnych tkanivách. Tento problém môže byť čiastočne eliminovaný namierením liečiva špecificky na nádorové bunky. Určité adhezívne molekuly bunky ako $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory sú nadmerne exprimované na aktívnom proliferujúcom endotele nádora. Tieto povrchové markery rozlišujú nádorové endotelové bunky od normálnych, a preto sa môžu používať ako cieľ pre protivaskulárne liečivo. Peptidy s aminosekvenciou Arg-Gly-Asp (RGD) viazanou na cyklickom skelete sa viažu na $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory, čo sa využilo pre vytvorenie lipozómu s cyklickými RGD peptidmi ako ligandu pre prenos combretastatínu A-4. Tento nosič zvýšil protinádorovú aktivitu liečiva a potenciálne zlepšil terapeutický benefit v porovnaní s dávkovaním v roztoku alebo bez lipozómu⁷.

Vo vode rozpustný alkaloid kolchicín (obr. 3) bol pôvodne izolovaný z *Colchicum autumnale* (jesenný krokus) a je jedným z najdlhšie používaných liečiv (dnes lieči dnu a mediteránsku horúčku). Jeho potenciálna protirakovinová aktivita voči P388 a L1210 leukémii myši je pripísaná jeho silnému antimitotickému efektu. Kolchicín naviazaním inhibuje polymerizáciu tubulínu a proces mitózy, ktorý je nevyhnutný pre delenie bunky. Avšak nízke hodnoty terapeutického indexu limitujú jeho využitie ako protirakovinového liečiva⁸.

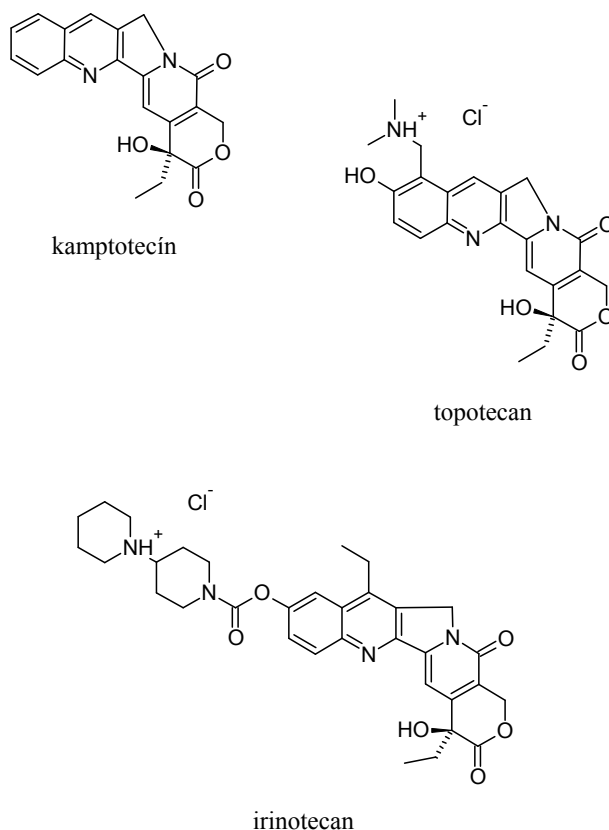
2.1.4. Kamptotecíny

Medzi dôležité protirakovinové lieky patrí skupina klinicky používaných aktívnych zlúčenín odvodených od kamptotecínu, ktorý bol izolovaný na juhu Číny z okrasného stromu *Kamptotheca acuminata* (Decne) (obr. 4). Ako bohatý zdroj tejto zlúčeniny bol objavený aj indický vždyzelený strom *Nothapodytes foetida* (Wight) (predtým *Mapiia foetida*)⁹. Kamptotecín patrí do skupiny chinolínových alkaloidov, pozostáva z pentacyclickej štruktúry, ktorá zahŕňa pyrolóvu skupinu a jedno asymetrické centrum s α -hydroxy laktónovým kruhom. Je to sekundárny rastlinný metabolit používaný ako protirakovinové liečivo. Ovplyvňuje aktivitu topoizomérázy I, ktorá štiepi, odtáča a znovu liguje DNA¹⁰. Po naviazaní kamptotecínu na topoizomérázu I dôjde k štiepeniu, avšak nie ligácii DNA, čo spôsobí jednoduché zlomy DNA vlákna. Kamptotecín bol uvedený do skúšobných klinických testov NCI (National Cancer

Institute, USA) v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia ako inhibítor DNA topoizomérázy I, ale bol stiahnutý pre vysokú toxicitu. Intenzívnym výskumom sa došlo k objaveniu efektívnejších vo vode rozpustných, menej toxických derivátov topotecanu a irinotecanu (obr. 4).

Topotecan sa používa na liečbu rakoviny pľúc ak zlyhá chemoterapia prvej línie a liečbu rakoviny vaječníkov po zlyhaní prvej cisplatinovo-taxánovej chemoterapie u ľudí senzitivných a rezistentných na cisplatinu¹¹, alebo následnej chemoterapii, ďalej pri ne-Hodgkinovom lymfóme, myelodysplastickom syndróme, leukémii a vybraných pediatrických typoch rakoviny. Topotecan prechádza bariéry medzi krvným riečišťom a mozgom¹², vykazuje dobré výsledky ako monoterapeutikum u pacientov s metastázami mozgu a je schopný zvyšovať účinok ožarovania.

Irinotecan spolu s inými liekmi v chemoterapii lieči rakovinu kolorekta, kde je považovaný za jedno z najdôležitejších liečiv. Na základe výsledkov fázy III experimentov sa napriek stále vysokej mortalite a toxicite predpokladá významná úloha irinotecanu pri liečbe pacientov s rakovinou gastrointestinálneho traktu¹³.



Obr. 4. Kamptotecíny – liečivá s protirakovinovým účinkom

2.1.5. Taxány

Taxány sú diterpenoidy izolované z rastlinného materiálu, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sa považujú za účinné protinádorové a antileukemické látky. Dnes sa už aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú taxol alebo docetaxel (taxotere) na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov¹⁴. Výskumy naznačujú, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla¹⁵ (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože. Okrem známej chemoterapeutickej aktivity taxánov sú známe aj antiproliferačné, antiangiogénne a protizápalové vlastnosti¹⁶. Taxol sa skúma ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex a reumatoidnej artritíde. Hlavný zástupca tejto skupiny látok taxol (paclitaxel) bol pôvodne izolovaný z kôry pacifického tisu *Taxus brevifolia*, ako súčasť náhodnej zbierky programu pre NCI. Zlá rozpustnosť ($0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$) vyžaduje koinjektáž v nosiči zloženom z Cremophoru EL[®], ktorý spôsobuje hypersenzitívne reakcie a pacienti liečení týmto prípravkom vyžadujú premedikáciu. Na vyriešenie tohto problému sa vytvorili nové systémy nosičov ako emulzie, lipozómy, polymérne mikro/nanočastice (vodorozpusťné prodrugs), ktoré však bývajú často fagocytované alebo vylúčené z bunky membránovými transportérmi a tiež nízko toxické polymérne micely s hydrofóbnymi liečivami uzavretými v jadre. Polymérne micely obsahujúce paclitaxel sa hromadia v nádore s vyššou permeabilitou a postupne ho uvoľňujú v závislosti od pH bez straty aktivity¹⁷. Taxol sa používa na liečbu Kaposiho sarkómu, rakoviny prsníkov, pľúc, vaječníkov, kde indukuje apoptózu rakovinových buniek. Skúmaním rakovinových buniek vaječníkov SKOV3 sa zistilo, že účinok taxolu spočíva vo fosforylácii Bcl-2 (B-cell lymfóm-2) a v mitochondriálnej depolymerizácii¹⁸. Taxol stabilizuje mikrotubuly a inhibuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteinové štruktúry, ktoré zastavia bunkový

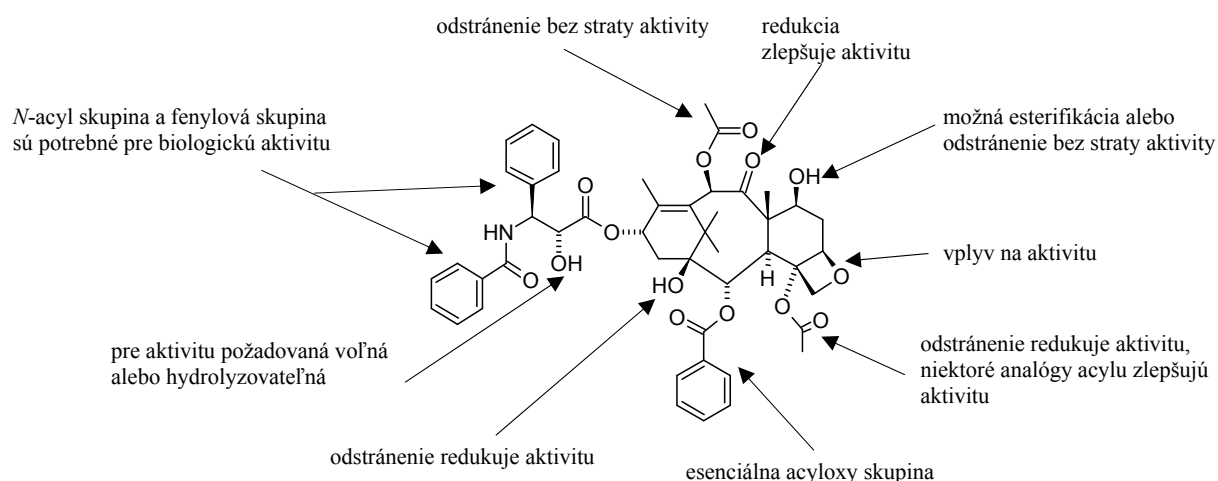
cyklus v G₂/M fáze, a tým i rast nádorových buniek¹⁹. Taxány sú jednými z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom. Paclitaxel má na bunky protimigrujúcu aktivitu. Môže selektívne inhibovať pohybovú aktivitu rakovinových buniek hrubého čreva a tiež buniek rakoviny vaječníkov²⁰.

Keďže paclitaxel zohráva významnú úlohu v boji proti rakovine, intenzívne štúdium vzťahu štruktúra – aktivita (SAR) viedlo k niektorým zovšeobecneniam (obr. 5). Jedno z najdôležitejších poukazuje na tri kľúčové postranné reťazce v južnej hemisfére molekuly: C-13 *N*-benzoyl fenylozoserín, C-2 benzoát a C-4 acetát. Všetky sú po stránke konštitúcie atómov a molekulovej konformácie kritické pre naviazanie taxánu na tubulín a ich cytotoxicitu. SAR štúdie C-2 pozície poukázali, že stereochemia 2-benzoyl-skupiny v taxole zásadne determinuje jeho aktivitu. Na druhej strane, veľa taxolových analógov s aroyl- alebo alkylovou esterovou skupinou na C-2 pozícii sa vyznačuje ešte vyššou cytotoxicitou²¹. Oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 sú tiež nevyhnutné pre zabezpečenie cytotoxicity.

Docetaxel je semisyntetický člen taxánových zlúčenín, efektívne pôsobí pri liečbe pacientov s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie a v dávkach 100 mg m^{-2} povrchu tela²². Pozitívne sa prejavilo jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, rakoviny hrubého čreva (HCT 116) alebo rakoviny močových ciest²³.

2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách

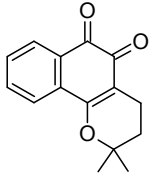
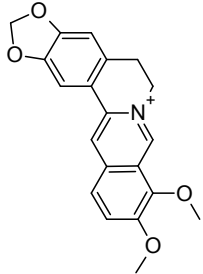
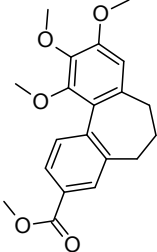
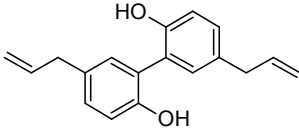
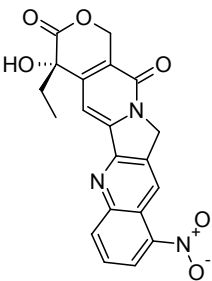
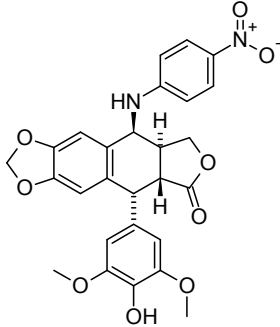
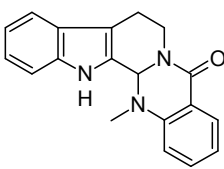
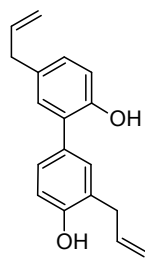
Objavujú sa nové technológie, pomocou ktorých sa zlúčeniny vylúčené z klinických štúdií pre vysokú toxicitu v predchádzajúcich obdobiach dostávajú opäť do záujmu



Obr. 5. Taxol a jeho vzťah medzi štruktúrou a biologickou aktivitou²¹

Tabuľka I

Štruktúry rastlinných protirakovinových derivátov aktuálne v klinických štúdiách

Zlúčeniny izolované z rastlín s inhibičným účinkom na:			
topoizomerázu I	topoizomerázu II	tubulín	iný mechanizmus
			
β -lapachon	berberín	allokolchicín	magnolol
			
rubitecan	GL331	evodiamín	honokiol

vedcov (tab. I). Možnosť technologicky pripojiť rôzne molekuly k vhodným „nosičom“ ich umožňuje priviesť špecificky priamo k nádorom. Takéto efektívne značenie vysoko cytotoxických prírodných látok je výhodné hlavne z hľadiska neškodnosti pre zdravé bunky organizmu, čím sa rieši problém toxicity a problém nízkej rozpustnosti vo vodných roztokoch⁶.

2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I

Základná látka kamptotecín má limitujúcu dostupnosť z prírody a je zle rozpustná vo vode, preto štruktúrne modifikácie smerujú na vytvorenie užitočnejších chemoterapeutík. Prírodné a syntetické deriváty kamptotecínu ako 9-amino- a 10-hydroxykamptotecín patria k potenciálnym protirakovinovým agensom inhibujúcim DNA topoizomerázu I (Topo I). Rubitecan, orálne podávaný kamptotecínový analóg a výrazný inhibítor Topo I, preukázal klinickú aktivitu v gemcitabin-senzitívnych nádoroch, ako sú nádory pankreasu, prsníkov, vaječníkov a gemcitabin-rezistentných druhoch rakoviny. Synergický účinok medzi inhibítormi topoizomerázy I a gemcitabínom (nukleozidový analóg) zistený v preklinickom výskume, ako aj žiad-

ne prekrývajúce sa toxicity, umožnili zavedenie do klinických štúdií pre rakovinu pankreasu a žľazníka, kde bola predbežne pozorovaná výrazná aktivita²⁴. CT-2106 je nový kamptotecínový (CPT) konjugát, inhibítor topoizomerázy I novej generácie, vytvorený na dodanie vyšších, efektívnejších dávok chemoterapeutika do nádorového tkaniva s nižšou toxicitou k normálnym bunkám. Zložený je z kamptotecínu kovalentne naviazaného cez hydroxylovú skupinu k biodegradovateľnému vodorozpustnému poly-L-glutamátglycínovému polyméru, ktorý zabraňuje otvoreniu laktónového kruhu a následnému naviazaniu CPT na albumín. CPT-polymérové spojenie zabezpečuje väčšiu stabilitu CPT v cirkulácii, zvýšenú permeabilitu a zadržanie v nádorových bunkách. CT-2106 demonštroval signifikantnú protinádorovú aktivitu vo viacerých ľudských nádorových líniiach a bol počas klinickej štúdie dobre tolerovaný s miernymi vedľajšími účinkami. Bol vo fáze I/II ako samostatné liečivo a plánovali sa kombináčn experimenty²⁵. Ďalším klinicky študovaným rastlinným derivátom s inhibičným účinkom na DNA topoizomerázu I je β -lapachon, 1,2-naftochinón izolovaný z kôry stromu *Tabebuia avellaneda*. Cytotoxický účinok β -

lapachonu súvisí s NAD(P)H-chinón-oxidoreduktázou 1 (NQO1), flavoproteínom nadmerne exprimovaným (až 20×) v bunkách rakoviny vaječníkov, hrubého čreva, pľúc, rakoviny prostaty a prsníkov²⁶. NQO1 indukuje nepatrné zmeny v štruktúre β -lapachonu, zlúčenina cykлизuje medzi jej hydrochinónom, semichinónom a chinónovou formou, uvoľňuje pritom NAD(P)H a vedie k vzniku hydroxylových radikálov poškodzujúcich DNA. Liečba β -lapachonom vedie k NQO1-dependentnému zvýšeniu cytosolového Ca^{2+} , čo má za následok stratu mitochondriálneho membránového potenciálu, vyčerpanie ATP, proteolýzu substrátu, DNA fragmentáciu a apoptózu bunky²⁷. NQO1 je vďaka hlavnej úlohe v β -lapachonom sprostredkovej smrti využiteľný cieľ pre liečbu rakovinových buniek, ktoré nadmerne exprimujú tento enzým. Nešpecifická distribúcia a polycyklický charakter, zodpovedný za vysokú hydrofobicitu, prekážajú konvenčnému intravenóznemu použitiu na preklinické a klinické využitie. Možnosť, ako zlepšiť vodorozpustnosť β -lapachonu, je cez jeho naviazanie s hydroxypropyl- β -cyklodextrínom. Rýchla disociácia β -lapachonu a cyklodextrínu robí liečivo prístupné agregácii a rapidnému spotrebovaniu. Využitie nanoterapeutického nosiča zaručuje efektívne rozpustenie liečiva a jeho dopravenie do pevného nádora²⁷. Indenoizochinolíny sú novou triedou nekamptotecínových inhibítorov topoizomerázy I, ktorých mechanizmus účinku zahŕňa uväznenie kovalentného komplexu utvoreného medzi DNA a Topo I počas bunkových procesov. Nie všetky deriváty indenoizochinolínu majú rovnaký spôsob účinku ako protirakovinové agens. Napríklad, dihydro-zlúčeniny sú všeobecne slabšími inhibítormi Topo I, avšak majú výraznú cytotoxickú aktivitu na viaceré bunkové línie. Ich kryštálová štruktúra v komplexe s DNA a Topo I indikuje stérické zábrany interkalácie neplanárných dihydroindenoizochinolínov s DNA na zlomovej strane. Je potrebné najskôr metabolizovať dihydro-deriváty *in vivo* pomocou dvojelektrónovej oxidácie, čím sa získajú planárne indenoizochinolíny, ktoré môžu stéricky interkalovať medzi párami DNA báz²⁸. Pred niekoľkými rokmi bola NSC 314622 (1) zlúčenina implikovaná ako inhibítor Topo I a jej cytotoxický profil bol obdobný ako u známych inhibítorov Topo I, kamptotecínu, irinotecanu a topotecanu. Použitie NSC 314622 (1) ako protirakovinového liečiva je limitované jeho miernym cytotoxickým účinkom a inhibičným účinkom voči Topo I, syntetizujú sa ďalšie indenoizochinolíny s vyššou cytotoxicitou voči rakovinovým bunkám a inhibíciou Topo I.

2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu

Berberín, prírodný izochinolínový alkaloid izolovaný z koreňov a kôry medicínsky dôležitých rastlín ako sú *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, a *Tinospora cordifolia*, bol od nepamäti používaný ako potenciálne liečivo v indiánskej a čínskej medicíne. Berberín sa vyznačuje protizápalovou aktivitou a má protinádorový účinok *in vitro*. Inhibuje aktivačný proteín 1, kľúčový transkripčný faktor zápalov a karcinogenézy v ľudských

nádorových bunkách a účinne inhibuje transkripčnú aktivitu cyklooxygenázy-2 v bunkách rakoviny hrubého čreva u ľudí. Berberín inhibuje DNA topoizomerázu II (Topo II) a proliferáciu buniek rakoviny prostaty v závislosti od koncentrácie ($10\text{--}100\ \mu\text{mol l}^{-1}$) a času podávania (24 až 72 h). Inhibícia proliferácie súvisí s blokovaním G1-fázy bunkového cyklu, čo je spôsobené inhibíciou exprese cyklinov D1, D2, E a cyklín-dependentných kináz. Berberín výrazne zvyšuje apoptózu rakovinových buniek prostaty (DU145 a LNCaP) narušením membránového potenciálu mitochondrií a aktiváciou kaspázy-9, kaspázy-3 a poly(ADP-ribóza) polymerázy²⁹. Derivát GL331 s *p*-nitroanilínovou skupinou na 4 β -pozícii etoposidu sa javí byť výborným kandidátom na liečenie rakoviny. Inhibitor Topo II GL331 spôsobuje štiepenie dvojvláknovej DNA a zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze. Indukuje apoptózu bunky inhibíciou proteín-tyrozínkinázovej aktivity, stimuláciou proteín-tyrozínfosfatázovej aktivity a formovaním apoptickej DNA. GL331-indukované DNA zlomy nadmerne spúšťajú poly(ADP-ribóza) polymerázu (PARP) a spôsobujú rozsiahlu poly(ADP-ribozyl)áciu nukleových proteínov. GL331, napriek podobnej štruktúre a biochemickým vlastnostiam ako etoposid, je účinný na rakovinové bunky rezistentné na liečbu etoposidom³⁰. Zjavná je účinnosť voči štyrom typom nádorov, nemalobunkovému a malobunkovému pľúcnemu karcinómu, nádoru hlavy a krku, aj karcinómu hrubého čreva s minimálnymi vedľajšími účinkami. Izosteviol (kyselina *ent*-16-ketobeyeran-19-ová) je produkt hydrolýzy steviosidu, prírodného sladidla produkovaného v listoch *Stevia rebaudiana* (Bertoni), pripravený mikrobiálnymi transformáciami a chemickou konverziou. Je potenciálnym inhibítorom polymeráz cicavcov a ľudskej DNA topoizomerázy II. Izosteviol inhibíciou buniek MOLT-4 (ľudská akútna lymfocytová leukémia) *in vitro* potláča rast BALL-1 ľudských buniek akútnej lymfoblastickej leukémie, línie žalúdočných nádorových buniek a TPA (12-tetradekanoylforbol-13-acetátom)-indukovaných zápalov. Inhibícia rastu buniek je závislá od inhibície enzýmov, najmä replikačnej polymerázy α . Keďže izosteviol blokuje taktiež bunky v S fáze, predpokladá sa, že sa distribuuje do jadra³¹. Ellipticin, karbazolový alkaloid, bol identifikovaný v roku 1959 ako obsahová látka listov austrálskeho stromu *Ochrosia elliptica* (Labil) a môžeme ho získať aj z *Bleekeria vitensis*. Vyznačuje sa protinádorovou a antineoplastickou aktivitou, ktoré môžu súvisieť s vyvolaním stresu v endoplazmatickom retikule³². Za jeho hlavný mechanizmus účinku je považovaná DNA interkalácia a inhibičné pôsobenie na topoizomerázu II (cit.³³). Najnovšie štúdie poukazujú na schopnosť ellipticinu tvoriť DNA adukty sprostredkované cytochrómom P450 (cit.³⁴). Cytotoxická aktivita ellipticinu tiež súvisí s nádorovým supresorom p35. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin selektívne inhibujú fosforyláciu proteínu p35 pomocou inhibície kináz u rakoviny pľúc a ľudskej bunkovej línie SW480 rakoviny hrubého čreva. Navyše, akumulácia defosforylovaného mutantného inhibítora kaspáz p35 môže indukovať apoptózu. Ellipticin a jeho deriváty sú schopné zastaviť mitochon-

driálnu oxidatívnu fosforyláciu a narušiť energetickú rovnováhu buniek³². Avšak, slabá rozpustnosť vo vode ako aj jeho systémová toxicita bránia zavedeniu ellipticinu medzi terapeutické liečivá. Jeho semisyntetický derivát elliptinium sa v súčasnosti v Európe používa na liečenie pokročilého štádia rakoviny prsníkov.

2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulinové inhibitory

Allokolchicín je prírodný štruktúrny izomér kolchicínu nachádzajúci sa v *Colchicum cornigerum* a *Colchicum autumnale*. Najaktívnejšie allokolchicinoidy (allo-keton a 7S allo-alkohol) boli hodnotené ako cytotoxické látky voči ľudským rakovinovým bunkám. Oboje zlúčeniny boli 2,5 až 4× účinnejšie ako kolchicín voči viacerým líniam nádorových buniek³. Evodiamín je hlavná bioaktívna látka izolovaná a purifikovaná z tradičnej čínskej rastliny *Evodia fructus*. Vyznačuje sa protizápalovými, antiobezitnými, antinociceptívnymi vlastnosťami ako aj inhibičným účinkom na proliferáciu nádorových buniek a bunkovú migráciu spojenú s inváziou a metastázovaním pľúc. Silnejšie inhibuje migráciu nádorových buniek než ich proliferáciu, pri 10 µg ml⁻¹ spôsobuje 70% supresiu migrácie a iba 30% inhibíciu proliferácie³⁴. Efekt inhibície migrácie spočíva pravdepodobne v potlačení aktivity Ca²⁺ kanálov, ktorých funkcia je nevyhnutná pre bunkovú migráciu. Evodiamín má inhibičnú aktivitu voči ľudským multidrug-rezistentým NCI/ADR-RES bunkám nádorov prsníkov. Pomocou imunocytochemických a *in vivo* tubulin-polymerizačných analýz sa zistilo, že evodiamín zvyšuje polymerizáciu mikrotubúl a formáciu mikrotubulového vretienka v NCI/ADR-RES bunkách³⁵. Táto zlúčenina spôsobuje značnú apoptózu pri množstve 1 mM a po 12 h pôsobenia vyvoláva zastavenie v G2/M fáze bunkového cyklu. Evodiamín reprezentuje sľubné liečivo na liečbu ľudských multidrug rezistentých rakovinových buniek.

2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku

Protirakovinový účinok neolignánov magnololu a honokiolu, izolovaných z rastlín čelade *Magnoliaceae* bol testovaný na rôznych rakovinových bunkových líniah, napr. proti A bunkám 459 (ľudská rakovina pľúc), SK-MEL-2 (ľudský melanóm), SK-OV-3 (rakovina vaječníkov), XF-498 (CNS bunky), HCT-15 (rakovina hrubého čreva) a Hep-G2 bunkám (rakovina pečene), lymfoidnej leukémii, rakovine kože, pľúc, hrubého čreva³⁶. Honokiol indukuje apoptózu inhibíciou Akt a MAPK fosforylácie (proteín kináza B, mitogén aktivovaná proteín kináza). Pri použití magnololu sa v priebehu apoptózy zvýšila intracelulárna koncentrácia vápnika, prebehla translokácia cytochrómu c z mitochondrií do cytozolu, aktivácia kaspázy 3, kaspázy 8 a kaspázy 9 a znížila sa regulácia bcl-2 proteínu³⁷. Rovnaký mechanizmus priebehu apoptózy bol pozorovaný aj v bunkovej línii chronickej lymfocytovej leukémie v prítomnosti honokiolu. Z tohto poznatku vyplýva možnosť odskúšania klinickej aplikácie honokiolu samostatne alebo v kombinácii s inými terapeutikami,

pretože bunková chronická lymfocytová leukémia je jedným z neliečiteľných rakovinových ochorení. Honokiol v závislosti od času a koncentrácie indukuje apoptózu buniek RKO kolorektálneho nádora. U pokusných myší s inkubovaným nádorom, honokiol potláčal rast nádora a predlžoval životnosť myší. Podávanie honokiolu indukovalo apoptózu cez aktiváciu kaspázovej kaskády p53 independentným mechanizmom. Honokiol vykazuje nízku toxicitu voči zdravým bunkám a vysokú protirakovinovú aktivitu *in vitro* a *in vivo*, preto je potenciálnym chemoterapeutickým liečivom aj pri liečbe rakoviny ľudského konečníka³⁸. Magnolol a honokiol sa preukázali aj ako potenciálne vhodné terapeutiká pri akútnej myeloidnej leukémii. V tomto prípade je do mechanizmu účinku neolignánov zapojená MEK/Map kinázová (mitogén aktivovaná kináza, mitogén aktivovaný proteín) signálna dráha. Magnolol navyše inhibuje nádor nekrotizujúci faktor α indukovaný aktiváciou NF- κ B v ľudských endotelových bunkách. Ishitsuka a spol.³⁹ dokázali, že v bunkovej línii izolovanej z ľudského myelómu honokiol aktivuje apoptózu prostredníctvom kaspáz, no zároveň aj mechanizmom nezávislým na kaspázach. Okrem toho honokiol inhibuje novotvorbu ciev v mikroprostredí kostnej drene. Do regulácie angiogenézy, metastázovania a celkového prežívania bunky je zapojený aj jadrový faktor NF- κ B. Honokiol je schopný potláčať aktiváciu NF- κ B a expresiu génov regulovaných NF- κ B inhibíciou I κ B-kinázy. V nádorových tkanivách sa výrazne zvyšuje enzýmová aktivita matrixovej metaloproteinázy-9 (MMP-9). Magnolol a honokiol sú inhibítormi MMP-9, ktorá sčasti zodpovedá za invazívny charakter rakovinového ochorenia. MMP-9 degraduje kolagén typu IV, dôležitý komponent základnej štruktúry bunkovej membrány. Seo a spol.⁴⁰ pozorovali vysokú (90%) inhibičnú aktivitu voči MMP-9 v butanolových frakciách *Magnolia obovata* a *Magnolia officinalis* var. *biloba* pri koncentrácii 100 µg ml⁻¹. Xu a spol.⁴¹ dokázali, že honokiol znižuje expresiu P-glykoproteínu v bunkových líniah MCF-7/ADR rezistentných na adriamycín ľudskej rakoviny prsníka. Aplikáciou honokiolu sa obnovuje akumulácia podávaného chemoterapeutika ako aj senzitivita na adriamycín.

Konjugáciou dvoch protinádorových liečiv s rôznym mechanizmom účinku môžeme dosiahnuť zlepšenie potenciálu oboch zlúčenín. Boli opísané unikátne protinádorové aktivity konjugátov taxol (TXL)-kamptotecín (CPT), TXL-epipodofylotoxín (EP), CPT-EP, TXL-kolchicín (COL). Potvrdila sa cytotoxická aktivita voči replikácii viacerých línii ľudských nádorových buniek, ľudskému karcinómu vaječníkov, pľúc, rakovine prsníkov, ľudskému karcinómu prostaty a iným. Hoci viaceré konjugáty nevýkázali vyššiu aktivitu ako taxol samotný, TXL-CPT konjugát sa vyznačoval jedinečným mechanizmom pôsobenia na línii nádorových buniek prostaty a menším účinkom na normálne bunky, než TXL samotný¹⁴. Ingenol-3-O-angelat (PEP005), analóg polyhydroxyditerpenoidu ingenolu z *Euphorbia peplus* je potenciálne chemoterapeutické liečivo rakoviny kože. Aktiváciou viacerých proteín-kinázových C izoforiem signálnych enzýmov sa indukuje

apoptóza niektorých rakovinových buniek vrátane myeloidnej leukémie, melanómu a bazálneho bunkového karcinómu⁴². Protopanaxadiol je derivát triterpénového aglykónu viacerých saponínov z *Panax ginseng* a vyznačuje sa apoptickým účinkom na nádorové bunky pôsobením na ich signálne dráhy. Je opísaný cytotoxický účinok protopanaxadiolu voči nádorom vykazujúcim mnohopočetnú liekovú rezistenciu⁴². Hlavný diterpenoid izolovaný z *Andrographis paniculata*, andrographolid, má cytotoxickú aktivitu voči ľudskému karcinómu epidermu a bunkám lymfocytovej leukémie, inhibuje proliferáciu rakovinových buniek. Môže slúžiť ako východisková štruktúra na syntézu nových, netoxických protirakovinových alebo imunomodulačných molekúl⁴³. Phenoxodiol je syntetický analóg známeho izoflavónu sóje (*Glycin max*) genisteinu (4',7-dihydroxyizoflavón), ktorý bol využitý na terapiu rakoviny krčka maternice, vaječníkov, prostaty, vaginálnej rakoviny. Indukuje apoptózu cez inhibíciu anti-apoptických proteínov. Bunky rakoviny vaječníkov, rezistentné voči konvenčnej chemoterapii, po použití phenoxodiolu podstupia apoptózu. Tento efekt je dependentný na aktivácii systému kaspáz, na inhibičnom účinku XIAP, inhibítora apoptózy, narušení FLICE expresie inhibičného proteínu (FLIP) cez Akt signálnu transdukčnú dráhu, čo sú kľúčové faktory regulácie prežitia rakovinej bunky⁴⁴. Homoharringtonin, cefalotaxusový alkaloid z rastliny *Cephalotaxus harringtonia* rastúcej v Číne je inhibítor syntézy proteínov a bunkového cyklu. Je aktívny voči hematologickým zhubným nádorom⁴². Flavopiridol reprezentuje prvý inhibítor cyklin-dependentnej kinázy (CDK), ktorý je v poslednom štádiu klinických skúšok. Je to semisyntetický flavón derivovaný z rastlinného alkaloidu rohitukínu izolovaného z listov *Amoora rohituka* a z *Dysoxylum binectariferum* (Maliaceae). Bol identifikovaný ako potenciálne protirakovinové liečivo, keďže priamo inhibuje CDK 1, 2 a 4 ako kompetitívny ATP antagonista. Rápidne indukuje programovanú smrť buniek a inhibuje angiogénu. Mechanizmus účinku flavopiridolu zahŕňa interferenciu s fosforyláciou CDK, bránenie ich aktivácii a blokovanie bunkového cyklu v G1 alebo G2 fáze. Klinické testovanie preukázalo, že sa môže bezpečne použiť u ľudí pri liečbe ne-Hodgkinovho lymfómu, karcinómu prostaty, hrubého čreva a žalúdka, nemalobunkovej rakoviny pľúc a chronickej leukocytovej leukémii. Nakoľko sa *in vitro* prejavil synergický účinok s niektorými konvenčnými cytotoxickými liečivami, kombinácie s paclitaxelom a cisplatinou boli v roku 2000 v prvej fáze klinických pokusov⁴⁵.

3. Záver

Prirodzeným dôsledkom narastajúceho výskytu nádorových, srdcovo-cievnych ochorení, ale aj počtu multi-rezistentných mikroorganizmov je nevyhnutnou potrebou humánnej medicíny disponovať novými a účinnejšími terapeutikami. Prehľad popisuje mnoho dôležitých biologicky aktívnych liečiv pochádzajúcich z rastlinných zdro-

jov, nakoľko skúsenosti s používaním rastlín ako terapeutických nástrojov z histórie pomohli zaviesť jednoduché chemické entity aj do modernej medicíny.

Táto práca je podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR na základe zmluvy č. APVV-20-014105.

LITERATÚRA

- Chabner B. A., Roberts T. G.: Nat. Rev. Cancer 5, 65 (2005).
- Srivastava V., Negi A. S., Kumar J. K., Gupta M. M., Khanuja S. P. S.: Bioorg. Med. Chem. 13, 5892 (2005).
- Lee K. H.: J. Biomed. Sci. 6, 236 (1999).
- Lobert S., Ingram J. W., Correia J. J.: Biophys. Chem. 126, 50 (2007).
- Brody J., Advani S.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 58, 257 (2006).
- Cragg G. M., Newman D. J.: J. Ethnopharmacol. 100, 72 (2005).
- Nallamothu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A.: AAPS Pharm. Sci. Tech. 7, E1 (2006).
- Muzaffar A., Brossi A., Lin C. M., Hamel E.: J. Med. Chem. 33, 567 (1990).
- Ravishanker R. V.: Plant 38, 347 (2002).
- Capranico G., Ferri F., Fogli M. V., Russo A., Lotito L., Baranello L.: Biochimie 89, 482 (2007).
- Colombo N., Gore M.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 64, 129 (2007).
- Zamboni W. C., Luftner D. I., Egorin M. J.: Ann. Oncol. 12, 119 (2001).
- Rivera F., Vega-Villegas M. E., López-Brea M. F.: Cancer Treatment Rev. 33, 315 (2007).
- Nakagawa-Goto K., Nakamura S., Bastow K. F., Nyarko A., Peng C. Y., Lee F. Y., Leec F. C., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 2894 (2007).
- Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
- Ehrlich A., Booher S., Becerra Y., Borris D. L., Figg W. D., Turner M. L., Blauvelt A.: J. Am. Acad. Dermatol. 50, 533 (2004).
- Xie Z., Guan H., Chen H., Lu C., Chen L., Hu X., Shi Q., Jing X.: J. Controlled Release 117, 210 (2007).
- Ahn H. J., Kim Y. S., Kim J. U., Han S. M., Shin J. W., Yang H. O.: J. Cell Biochem. 91, 1043 (2004).
- Bhat N., Perera P. Y., Carboni J. M., Blanco J., Golenblock D. T., Mayadas T. N., Vogel S. N.: J. Immunol. 162, 7335 (1999).
- Broker L. E., Huisman C., Span S. W., Rodriguez J. A., Krut F. A., Giaccone G.: Cancer Res. 64, 27 (2004).
- Wang L., Alcaraz A. A., Matesanz R., Yang C. G., Barasoain I., Díaz J. F., Li Y. Z., Snyder J. P., Fanga W. S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 3191 (2007).

22. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: *Drugs* 59, 621 (2000).
23. Bajorin D. F.: *Oncology* 14, 43 (2000).
24. Calvo E., Rowinsky E. K., Tolcher A. W., Chu Q. S., Beeram M., Forero L., Mettinger K. L., Eastham E., Goetz A. D., Patnaik A.: *J. Clin. Oncol.* 22, 2099 (2004).
25. Springett G. M., Takimoto C., McNamara M., Doroshow J. H., Syed S., Eastham E., Spriggs D., Pezzulli S., Michelson G., Dupont J.: *J. Clin. Oncol.* 22, 3127 (2004).
26. Planchon S. M., Pink J. J., Tagliarino C., Bornmann W. G., Varnes M. E., Boothman D. A.: *Exp. Cell Res.* 267, 95 (2001).
27. Blanco E., Bey E. A., Dong Y., Weinberg B. D., Sutton D. M., Boothman D. A., Gao J.: *J. Controlled Release* 122, 365 (2007).
28. Morrell A., Jayaraman M., Nagarajan M., Fox B. M., Meckley M. R., Ioanoviciu A., Pommier Y., Antony S., Hollingshead M., Cushman M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4395 (2006).
29. Mantena S. K., Sharma S. D., Katiyar S. K.: *Mol. Cancer Ther.* 5, 296 (2006).
30. Chang H., Shyu K. G., Lee C. C., Tsai S. C., Wang B. W., Lee Y. H., Lin S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 95 (2003).
31. Mizushima Y., Akihisac T. T., Ukiyac M., Hamasakic Y., Murakami-Nakaia C., Kuriyama I., Takeuchi T., Sugawarad F., Yoshidaa H.: *Life Sci.* 77, 2127 (2005).
32. Stiborova M., Rupertova M., Schmeiser H., Frei E.: *Biomed. Pap.* 150, 13 (2006).
33. Moody D. L., Dyba M., Kosakowska-Cholody T., Tarasova N. I., Michejda C. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2380 (2007).
34. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004).
35. Ogasawara M., Matsubara T., Suzuki H.: *Biol. Pharm. Bull.* 24, 720 (2001).
36. Liao C. H., Pan S. L., Guh J. H., Chang Y. L., Pai H. C., Lin C. H., Teng C. M.: *Carcinogenesis* 26, 968 (2005).
37. Lin S. Y., Liu J. D., Chang H. C., Yeh S. D., Lin C. H., Lee W. S.: *J. Cell Biochem.* 84, 532 (2002).
38. Kong Z. L., Tzeng S. C., Liu Y. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 63 (2005).
39. Wang T., Chen F., Chen Z., Wu Y. F., Xu X. L., Zheng S., Hu X.: *World J. Gastroenterol.* 10, 2205 (2004).
40. Ishitsuka K., Hideshima T., Hamasaki M., Raje N., Kumar S., Hideshima H., Shiraishi N., Yasui H., Roccaro A. M., Richardson P., Podar K., Le Gouill S., Chauhan D., Tamura K., Arbisser J., Anderson K. C.: *Blood* 106, 1794 (2005).
41. Seo U. K., Lee Y. J., Kim J. K., Cha B. Y., Kim D. W., Nam K. S., Kim C. H.: *J. Ethnopharmacol.* 97, 101 (2005).
42. Xu D., Lu Q., Hu X.: *Cancer Lett.* 243, 274 (2006).
43. Chin Y. W., Balunas M. J., Chai H. B., Kinghorn A. D.: *AAPS J.* 8, 239 (2006).
44. Kumar R. G., Sridevi K., Kumar V., Nanduri S., Rajagopal S.: *J. Ethnopharmacol.* 92, 291 (2004).
45. Kamsteeg M., Rutherford T., Sapi E., Hanczaruk B., Shahabi S., Flick M., Brown D., Mor G.: *Oncogene* 22, 2611 (2003).
46. Mans D. R. A., Da Rocha A. B., Schwartzmann G.: *Oncologist* 5, 185 (2000).

P. Cibíková, M. Šturdíková, and M. Maruna
(Department of Biochemical Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic): Natural Compounds of Plant Origin and Their Application in Therapy of Oncological Diseases

As a consequence of increasing occurrence of malign and cardiovascular diseases, but also of multiresistant microorganisms, it is necessary to dispose of new and more effective therapeutics, which are easier to biosynthesize, isolate and modify. At present natural compounds attract increasing attention fuelled by the well-documented limits and adverse effects of current chemical drugs as well as by the ongoing search for better methods of fighting the diseases. The review summarizes the important bioactive plant compounds currently used as anticancer agents and their mode of action. The cytotoxic plant drugs can be categorized into five main classes: vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, combretastatins, camptothecins and diterpenoid taxanes. Some new secondary metabolites isolated from plants and derivatives of the known antitumour drugs currently undergo clinical tests.

STEROIDNÍ FYTOHORMONY: FUNKCE, MECHANISMUS ÚČINKU A VÝZNAM

MAREK KAMLAR^{a,b}, ONDŘEJ UHLÍK^{a,b},
LADISLAV KOHOUT^a, JURAJ HARMATHA^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
tom.macek@uochb.cas.cz

Došlo 21.1.09, přepracováno 8.7.09, přijato 25.8.09.

Klíčová slova: brassinosteroidy, ekdysteroidy, fytohormony, fytosteroly, RuBisCO, steroidní receptory, vazebné bílkoviny

Obsah

1. Úvod
2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku
 - 2.1. Brassinosteroidy
 - 2.2. Ekdysteroidy
3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin
 - 3.1. Knock-out a knock-down genu
 - 3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin
 - 3.2.1. Molekulárně-biologické metody
 - 3.2.2. Afinitní chromatografie
4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům
 - 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů
 - 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů
5. Závěr

1. Úvod

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou obecně chápány jako endogenní signální molekuly zodpovědné za přenos informací mezi pletivou a orgány¹. Steroidní fytohormony, jmenovitě brassinosteroidy (BRs) a ekdysteroidy (ES), pak tvoří jednu z podskupin těchto látek.

Význam BRs pro rostlinu spočívá jednak v pozitivní regulaci jejího růstu a jednak ve schopnosti ovlivnění její adaptace na stres vyvolaný biotickými či abiotickými faktory. Bylo prokázáno, že tyto látky jsou hormonálně aktivní². Na rozdíl od živočišných steroidních hormonů jsou však v tomto případě přenos signálu do buňky a následná buněčná odpověď zprostředkovány systémem receptorů lokalizovaných na/v buněčné membráně^{3,4}. Přesný mecha-

nismus působení ovšem stále není zcela jasný.

Funkce ekdysteroidů, další ze skupiny látek s povahou hormonů, je dobře prozkoumána u živočichů, zejména pak u hmyzu a korýšů, u nichž tyto látky ovlivňují fáze zakuklení a svlékání a zřejmě i syntézu některých pohlavních feromonů⁵, jejich význam pro rostliny však i přes značný obsah ES v rostlinné tkáni, bohužel, příliš objasněn není.

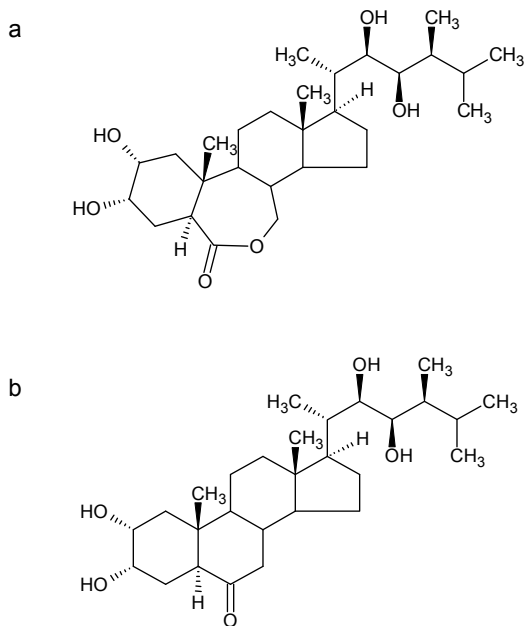
V souvislosti s bližším poznáním mechanismu působení obou výše zmiňovaných skupin hormonů u rostlin je výzkum v současné době orientován dvěma směry: první spočívá ve snaze o cílené odstranění (knock-out) či utlumení (knock-down) některého z genů ovlivňujících signální dráhu studovaných steroidů (vznikají tak např. mutanty necitlivé k působení BRs)^{6,7}, druhý naproti tomu využívá přímé izolace vazebných bílkovin či samotných receptorů, a to buď pomocí molekulárně-biologických metod, nebo s využitím afinitní chromatografie.

2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku

Mezi steroidní látky s povahou hormonů, které byly v rostlinách nalezeny, patří brassinosteroidy a ekdysteroidy. Jejich základní strukturu tvoří – podobně jako je tomu u živočišných hormonů – steranový skelet. V rostlinách se vyskytují buď volné, nebo vázané. Zatímco volnou formu představují všemožné steroly (steroidy s 3 β -hydroxylovou skupinou a 17 β -alifatickým postranním řetězcem) a oxysteroly (steroly, jež mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového skeletu, příp. i postranní řetězec), vázaná forma je zastoupena různými typy konjugátů, zvláště estery sterolů s nasycenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosidy^{8,9}.

2.1. Brassinosteroidy

BRs (obr. 1) hrají v životě rostliny nezastupitelnou roli. Ovlivňují tvorbu biomasy, růst a diferenciaci orgánů, regulují počet a velikost semen i plodů a v neposlední řadě oddalují senescenci, tedy stárnutí rostliny. Kromě toho se též podílejí na přizpůsobivosti rostliny nepříznivým životním podmínkám, jimiž jsou např. nedostatek živin či vody, přítomnost herbicidů, nadbytek solí, chlad, popř. napadení rostliny škůdci. Bylo zjištěno, že BRs působí podobně jako peptidové hormony u živočichů, tj. prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Někteří autoři vědeckých prací⁴ předpokládají nutnost vazby samotného steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakci vzniklého aduktu s membránovým receptorem, jiní^{3,10} zase usuzují na přímou vazbu steroidu na membránový receptor.



Obr. 1. a) Brassinolid, první objevený brassinosteroid, b) kastasteron, biosyntetický prekurzor brassinolidu

2.2. Ekdysteroidy

Ekdysteroidy (obr. 2) byly nalezeny jak u živočichů (např. u hmyzu a některých dalších členovců), tak u rostlin (nejhojněji jsou zastoupeny zejména ve špenátu a některých kapradinách)^{11,12}. ES jsou rovněž označovány jako svlékačí hormony, a to díky vlivu na ekdysi hmyzu⁵. U něj také ovlivňují tvorbu pohlavních feromonů a mnohé jiné funkce⁵. Zatímco význam ES pro živočichy je znám, jejich funkce v rostlinách objasněna není. Byla sice navržena hypotéza o jejich možném zapojení se do obrany rostliny proti býložravým škůdcům a tedy funkci jakýchsi přírodních pesticidů^{5,13}, ale zda je tomu tak i ve skutečnosti, bude nutné podložit ještě dalšími studiemi.

3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin

3.1. Knock-out a knock-down genu

Pro studium mechanismu působení steroidních hormonů u rostlin se nejčastěji využívají metody založené na knock-outu, resp. knock-downu některého z genů signálních drah studovaných steroidů. Zatímco knock-outem genu míníme jeho úplné odstranění, příp. inaktivaci (např. vložením jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence)¹⁴, knock-down genu naproti tomu spočívá pouze v utlumení jeho exprese pomocí mechanismu RNA interference („rušení“ RNA, RNAi)^{15,16}.

3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin

3.2.1. Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody identifikace vazebných bílkovin rostlinných sterolů (SBPs, z angl. sterol-binding proteins) jsou, podobně jako je tomu v případě izolace živočišných SBPs^{17,18}, založeny na přípravě knihoven cDNA (z angl. complementary DNA) určitého rostlinného organismu a následném vyhledávání konkrétních genů či sekvencí DNA v těchto knihovnách¹⁹.

3.2.2. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je chromatografická metoda založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami dvou různých látek. Těmi mohou být např. antigen a protilátka, enzym a kofaktor, inhibitor nebo substrát, lektin a sacharid nebo případně i hormon či léčivo a jeho příslušný bílkovinný receptor či přenašeč²⁰.

V případě studia mechanismu působení steroidních fytohormonů se využívá afinity vazebné bílkoviny ke steroidnímu ligandu navázanému na inertním polymerním nosiči. Samotné navázání pak vychází z klasické Merrifieldovy syntézy na pevné fázi²¹, která však byla v průběhu let pro potřeby steroidních látek^{22,23}, resp. přímo brassinosteroidů a ekdysteroidů²⁴, různě modifikována.

4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům

4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů

Jak bylo uvedeno výše, mechanismus působení BRs je založen na přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. K tomu může teoreticky docházet buď přímou vazbou steroidu na receptor, nebo nepřímo navázáním steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakcí vzniklého aduktu s receptorem⁴. Výsledky z poslední doby^{3,10} sice ukazují spíše na platnost první z teorií, nicméně ani druhá možnost není ještě zcela vyloučena.

BR11 kinasy

Na základě genetických studií s některými mutanty huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) byl identifikován první gen pro receptory rostlinných brassinosteroidů, *BR11* (z angl. brassinosteroid-insensitive), dle původu označovaný též jako *AtBR11* (cit.²⁵). Tento gen byl poté v různých obdobách a s různým stupněm ortologie nalezen také u rýže (*Oryza sativa*; *OsBR11*)^{4,26}, rajčete (*Lycopersicon esculentum*; *LeBR11*, resp. *tBR11*)²⁷, hrachu (*Pisum sativum*; *PsBR11*)²⁸, ječmene (*Hordeum vulgare*; *HvBR11*)²⁹, bavlníku (*Gossypium hirsutum*; *GhBR11*)³⁰ a révy (*Vitis vinifera*, *VvBR11*)³¹.

Produkty *BR11* genů – *BR11* bílkoviny – řadíme k tzv. LRR-RLKs kinasám (z angl. leucine-rich repeats-receptor-like kinases)^{32–34}. Základem jejich struktury je extracelulární část, která je transmembránovou doménou spojena s částí intracelulární. U *AtBR11* tvoří extracelu-

lární část celkem 25 (cit.^{35–37}), podle některých prací¹⁰ 24 tandemových LRRs, před a za ohraničených 2 cysteiny páry a mezi LRR21 a LRR22 přerušených 70aminokyselinovým ostrůvkem. Dále je zde přítomen tzv. signální peptid a také motiv tzv. leucinového zipu³⁵, jehož existenci Vert a spol.¹⁰ naopak vylučují. Intracelulární část je mj. tvořena Ser/Thr kinasovou doménou a CTE (z angl. carboxy-terminal extension) oblastí^{4,10,37}.

Další ze skupiny BR receptorů, OsBRI1 rýže, je velmi podobný výše popisovanému AtBRI1. Místo 25 zde však nalezneme pouze 22 LRRs párů. Aminokyselinový ostrůvek je tvořen opět 70 aminokyselinami a je umístěn mezi LRR18 a LRR19. Bez výraznějších strukturních změn zůstávají jak Ser/Thr kinasová, tak i transmembránová doména. Přítomnost leucinového zipu zde ale prokázána nebyla^{33,38}.

U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) je BRI1 ortologem tBRI1. Montoya a spol.²⁷ klonováním a následnou sekvenční analýzou *tBRI1* zjistili, že tento gen zde kóduje bílkovinu obdobnou kinase SR160, identifikované u rajčete *L. peruvianum*³⁹ jako receptor pro systemin (angl. systemin receptor 160kDa), peptidový hormon – novější studie se přiklánějí spíše k označení endogenního elicitoru⁴⁰ – uvolňovaný při mechanickém poškození rostliny či jejím napadením býložravým hmyzem⁴¹.

Systemin – typický pro většinu zástupců čeledi *Solanaceae* vyjma tabáku⁴² – vyvolává systémovou odpověď organismu⁴³. Ta spočívá zejména v syntéze jasmonátu, signální molekuly zodpovědné u rostlin za indukci tvorby obranných látek, např. inhibitorů proteas, peroxidas či polyfenoloxidas^{41,44–46} a PR proteinů⁴⁷.

Sekvenčním porovnáváním bylo zjištěno, že tBRI1 a SR160 jsou jedna a tatáž bílkovina. Výsledky poukazují na necelý 1% rozdíl, který je přisuzován mezidruhové proměnlivosti (tBRI1 byl nalezen u *L. esculentum*, zatímco SR160 u *L. peruvianum*)^{39,48}. tBRI1/SR160 je tedy receptorem duálním, tj. pro brassinosteroidy i systemin současně^{49,50}. Podobně jako je tomu v případě AtBRI1, i tBRI1/SR160 obsahuje 25 LRRs dvojic a 70aminokyselinový ostrůvek mezi LRR21 a LRR22. Výraznou podobnost nalezneme také u jednotlivých domén³⁹.

U hrachu (*Pisum sativum*) je BRI1 ortologem PsBRI1. Nomura a spol.²⁸ předpokládají totožnost *PsBRI1* genu s genem *Lka*, ekvivalentem *AtBRI1*, což naopak Bishop a Koncz⁵¹ vyvracejí. PsBRI1 obsahuje opět 25 LRRs párů, aminokyselinový ostrůvek však tvoří jen 68 aminokyselin, vnořených mezi LRR21 a LRR22 (cit.²⁸).

Struktura HvBRI1, BRI1 ortologu u ječmene (*Hordeum vulgare*), vykazuje prvky podobnosti s jinými BRI1 ortology. Opět je přítomna LRR-doména se 70aminokyselinovým ostrůvkem, transmembránové i kinasové domény a dva páry Cys zbytků. Rozdíl je pouze v počtu párů LRRs – má jich pouze 22 – a v absenci motivu leucinového zipu. Tím se podobá spíše OsBRI1 než ostatním doposud zmiňovaným BRI1 ortologům. Vysvětlení rozdílnosti v počtu LRRs kopií a (ne)přítomnosti Leuzipu lze hledat v evoluční rozmanitosti. Huseníček,

rajče, hrách, bavlník i vinná réva totiž patří mezi rostliny dvouděložné, zatímco rýže i ječmen mezi rostliny jednoděložné²⁹.

BRL proteiny

Prohledáním genových databází (GenBank/EMBL/DDBJ) bylo u rostlin nalezeno několik dalších BRI1 homologů. Jedněmi z nich jsou tzv. BRL proteiny (z angl. BRI1-like proteins). U huseníčku se jedná o AtBRL1 (cit.^{52,53}), AtBRL2 – identický s dříve nalezeným VH1 (z angl. vascular highway 1) proteinem^{52,54} – a AtBRL3 (cit.⁵²), u rýže o OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3 (cit.³⁸). Z dalších lze jmenovat např. hypotetickou bílkovinu s označením LjBRI1 (cit.⁵⁵), homolog BRI1 z luskoviny *Lotus japonicus*, resp. CrBRI1 (cit.⁵⁶), BRI1 homolog z kokošky *Capsella rubella*.

Zatímco exprese *BRI1* genu je orgánově specifická²⁶, *BRL* geny se exprimují převážně v cévních svazcích⁵². U huseníčku jsou BRL – podobně jako BRI1 – lokalizovány na plazmatické membráně. Na rozdíl od BRL2 jsou BRI1 a BRI3 schopny vázat brassinolid (obr. 1a)^{3,52,53}. A právě schopnost vazby téhož ligandu jako u BRI1 i výrazná sekvenční homologie s BRI1 (43% jako celku, 90% mezi LRRs, resp. 93% mezi aminokyselinovými ostrůvky) vedly⁵² k vyslovení hypotézy o nových BR receptorech – BRL1 a BRL3.

O BRL je známo, že podporují diferenciaci cévních a procévních buněk⁵². A protože i BRs ovlivňují diferenciaci cévních buněk⁵⁷, lze předpokládat, že se tak děje právě díky interakci s BRL receptory a jimi zprostředkovanou buněčnou odezvou.

BRL proteiny huseníčku jsou strukturně velmi podobné BRI1. N-koncová signální sekvence je opět následována extracelulární doménou tvořenou 23 (u BRL1 a BRL3), resp. 22 (u BRL2) páry LRRs a 70aminokyselinovým ostrůvkem a spojenou transmembránovou doménou s doménou intracelulární^{52,53}.

Podobně jako u huseníčku, tak i u rýže jsou BRL proteiny zastoupeny nejméně 3 druhy. Nakamura a spol.³⁸ našli *in silico* sekvenčním porovnáním ortologů BRI1 a BRL proteiny OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3. Z jejich výsledků taktéž vyplývá, že vazby brassinolidu jsou schopny opět pouze OsBRL1 a OsBRL3. Kinoshita a spol.³ se domnívají, že vazebné schopnosti BR receptorů souvisí s částí sekvence (-Asp-Gly-Ser-Met-) LRR21 ostrůvkové domény.

Stejně jako *AtBRI1*, tak i *OsBRI1* může být exprimován ve všech orgánech²⁶. Určitou podobnost lze nalézt také u *BRL* genů. Zatímco *AtBRL1* je exprimován zejména v kořenech, stoncích a cévních tkáních a *AtBRL3* převážně v cévních tkáních, *OsBRL1* a *OsBRL3* jsou exprimovány hlavně v kořenech a *OsBRL3* navíc i v embryích^{52,38}.

BAK1 kinasy

Bylo prokázáno, že BRI1 je hlavní součástí brassinosteroidového receptoru⁵⁸. Na přenosu signálu se však podílí i tzv. BAK1 kinasa (z angl. BRI1-associated kinase 1), u huseníčku označovaná též jako AtSERK3 (z angl.

A. thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 3)^{59–61}.

BAK1 je tvořena třemi částmi: mimobuněčnou, vnitrobuněčnou a transmembránovou, která obě tyto části propojuje. O jejich struktuře platí totéž, co bylo napsáno u BRI1, u mimobuněčné části jsou však zjevné rozdíly: Zatímco signální peptid a motiv leucinového zipu (u BAK1 je kratší, je tvořen pouze 4 páry Leu-zbytků) zůstávají zachovány, aminokyselinový ostrůvek zde chybí. Počet LRRs párů je také odlišný (pouze 5) a navíc je zde přítomna doména bohatá na prolin⁵⁹. BAK1 se tak strukturou podobá spíše SERK kinasám než samotnému BRI1 (cit.⁵⁹).

Mechanismus aktivace BR-receptoru

Jak BRI1, tak BAK1 jsou v nepřítomnosti brassinosteroidů v homodimerní – inaktivní – formě. Má-li však dojít k přenosu signálu a následné buněčné odpovědi, musí být obě kinyse nejprve aktivovány.

Společným rysem aktivace většiny receptorových kinas (RK) u živočichů je di(oligo)merizace indukovaná ligandem a následovaná transfosforylací tohoto di(oligo)meru⁶². Zda je tomu tak i u rostlin, nebylo dosud jednoznačně prokázáno.

Na základě výsledků z poslední doby a možné podobnosti s výše zmiňovanou aktivací živočišných RK byly pro rostlinné BR-receptory navrženy dva modely mechanismu aktivace: První vychází z toho, že navázání BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá vzájemnou interakci BRI1 s BAK1, tvorbu heterodimeru BRI1/BAK1 a následnou transfosforylací mezi BRI1 a BAK1 (cit.⁵⁹), druhý naopak z toho, že vazba BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá konformační změny mezi kinasovými doménami obou jednotek BRI1-homodimeru, a teprve pak může dojít k fosforylaci a aktivaci BAK1 (cit.^{37,60}).

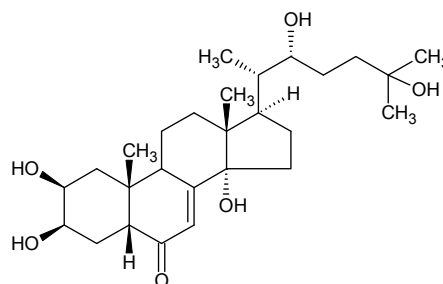
Dle Kinoshita a spol.³ je pro vazbu BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 u *A. thaliana* nutný minimální vazebný motiv sestávající z 22. LRR repetice a 70aminokyselinového ostrůvku. Taktéž bylo zjištěno⁶³, že BRI1 může přenášet signál i bez BAK1, a to pravděpodobně díky interakci s BKK1 proteiny (z angl. BAK1-like kinase), dříve označovanými jako SERK4. BAK1 i BKK1 pak podle studií z posledních let^{63,64} patří mezi proteiny s dvojitou funkcí. Kromě již zmiňovaného významu pro BR-signalizaci je jim připisována také role regulátorů obranných mechanismů rostliny. Samotná regulace je pak miněna v negativním slova smyslu a jako nezávislá na přítomnosti BR-ligandu.

4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů

Ekdysteroidy jsou látky polární a tedy poměrně dobře rozpustné ve vodě. Jejich afinita k bílkovinám – ve srovnání s jinými typy steroidů – je proto také mnohem nižší⁶⁵.

Ekdysonový receptor

U obratlovců, resp. hmyzu, je nejlépe popsán receptor pro ekdysteroid označovaný jako ekdyson (obr. 2). Jeho



Obr. 2. Ekdyson, první objevený ekdysteroid

struktura je obdobou struktury receptorů pro thyroïdní hormony, kdy jsou receptory vázány na specifické úseky jaderné DNA, které se v případě ES označují jako tzv. EcRE (z angl. ecdysteroid response element)⁶⁶.

Ekdysonový receptor (EcR) je charakterizován dvěma oblastmi homologie – centrálně umístěnou DNA-vazebnou doménou (DBD, z angl. DNA-binding domain) a blíže C-konci orientovanou doménou pro vazbu hormonu (HBD, z angl. hormone-binding domain)⁶⁷. DBD obsahuje jako strukturní motiv dva tzv. Cys₂ – Cys₂ zinkové prsty, pomocí nichž se může receptor vnořit mezi specifické páry basí EcRE na DNA helixu⁶⁸. HBD je oproti DBD oblastí, která kromě vazby hormonu zprostředkovává i heterodimerizaci receptoru (viz dále) a též na ligandu závislou transkripční aktivitu^{68,69}.

Kromě již uvedených částí obsahuje EcR také několik proměnlivých, nehomologních úseků. K nim patří N-koncová část proteinu, která je cílem fosforylace a tím i samotné aktivace transkripce, dále tzv. pantová oblast, která slouží jako závěs mezi DBD a HBD a která navíc umožňuje rotaci DBD při vazbě receptoru na EcRE, a v neposlední řadě též proměnlivá oblast C-konce, o níž se zatím předpokládá, že není pro vazbu hormonu nikterak potřebná^{69,70}.

Jaderné receptory mohou být plně aktivní pouze tehdy, pokud dimerizují s další molekulou receptoru⁶⁸. V případě EcR ale není druhým partnerem tatáž molekula, nýbrž RXR, tedy receptor pro retinoid X (derivát kys. *cis*-9-retinové; oxidační produkt retinalu). Dimerizace je přitom umožněna hydrofóbními repetitivy v HBD doméně a usnadňována jednak interakcemi mezi DNA-vazebnými doménami obou partnerů a jednak přítomností samotného ekdysteroidového ligandu, který se váže na EcR. Teprve vzniklý heterodimer RXR:EcR je ale schopen vázat ES s dostatečnou afinitou⁶⁷.

U hmyzu je obdobou RXR tzv. ultraspiracle (USP) protein^{71,72}. Patří do skupiny receptorů označovaných jako sirotčí (angl. orphan)⁷³. Toto pojmenování je ovšem notně zavádějící, protože vyvolává představu toho, že receptor kdysi ligand měl, ale postupem času jej ztratil. Přitom se ale může jednat o receptor, který teprve čeká na objevení svého ligandu. V případě USP totiž existují jakési náznaky toho, že by jeho vhodným ligandem mohl být některý zástupce tzv. juvenilních hormonů (JH), látek podílejících se

společně s ES na metamorfóze hmyzu⁷⁴. Příkladem by mohl být methyl-epoxyfarnesoát (JH III), který při biotestech^{75,76} skutečně vykazoval afinitu k USP. Ta ovšem byla mnohokrát nižší než je pro jaderné receptory typické.

Komplex RXR:EcR, resp. USP:EcR s navázaným ekdysteroidem se váže prostřednictvím DBD k EcRE (cit.^{67,71}), načež je dále aktivován fosforylací. Takto aktivovaný poté urychluje tvorbu přediniciačního komplexu transkripčních jednotek faktorů TF2A a TF2D, a tím indukuje transkripci cílových genů^{68,77}.

RuBisCO

Zatímco u živočichů je struktura EcR popsána poměrně podrobně, u rostlin je tomu naopak. Lze sice usuzovat na jistou konzervativnost a tedy možnou podobnost s výše uvedenou strukturou, není ovšem vyloučeno, že by mechanismus působení ES u rostlin nemohl být založen na zcela jiném principu. Stejně jako v případě živočišných ES-receptorů, kdy je např. DNA-vazebná doména RXR, resp. USP proteinů, vysoce konzervovaná, zatímco HBD vykazuje výrazné evoluční rozdíly⁷⁶, tak i u rostlin na různých vývojových stupních se mohou receptory, resp. přímo jejich strukturní prvky, vzájemně odlišovat.

Macek a spol.⁷⁸ ve vztahu k vazebným bílkovinám ekdysteroidů u rostlin zmiňují ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasu (RuBisCO), jeden z klíčových enzymů Calvinova cyklu. Význam tohoto enzymu tkví hlavně ve schopnosti fixovat a poté zabudovávat vzdušný CO₂ do struktury organických molekul, tedy karboxylaci. Při ní dochází k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na 3-fosfoglycerát, jeho redukci na glyceraldehyd-3-fosfát a ten pak slouží jako výchozí látka pro tvorbu sacharosy, škrobu a dalších sloučenin^{79,80}. Macek a spol.⁷⁸ dále poukazují na možnost pozitivní regulace enzymové aktivity RuBisCO pomocí některých druhů ekdysteroidních látek. Jak přesně k ovlivnění dochází a příp. na jaké místo na jeho molekule se tyto látky mohou vázat, je předmětem dalších experimentů.

Že má smysl se tímto problémem vůbec zabývat, je zřejmé již ze samotné podstaty temnostní fáze fotosyntézy, tj. spotřeby CO₂ a jeho využití k tvorbě sacharidů, mastných kyselin či aminokyselin, tedy základních složek rostlinného organismu. Jakékoliv výraznější zvýšení aktivity výše zmiňovaného enzymu či zvýšení jeho obsahu v rostlinách tak může vést jednak ke snižování přebytků CO₂ z ovzduší a jednak ke zvýšení tvorby biomasy pro energetické či potravinové účely. Problematika vazebných bílkovin fytoekdysteroidů tak díky možné spojitosti s fotosyntézou přechází z úrovně ryze teoretické na úroveň praktickou.

5. Závěr

Jak přesně funguje to či ono, k čemu to vlastně rostlina má, či jak to souvisí s tím a oním? I to jsou otázky, kterými se nyní musíme zabývat. Z výše uvedeného je zřejmé, že se na poli studia steroidních fytohormonů neza-

hálí, leč i přes intenzivní snahy je tato problematika stále zahalena mnoha nejasnostmi a domněnkami. První receptory pro brassinosteroidy, resp. první vazebné bílkoviny ekdysteroidů u rostlin tak nelze nazvat jinak než „střípky mozaiky, které bude nutné ještě nějak poskládat“. Zda se nám to podaří či nikoliv, ukáže až čas.

Tato práce vznikla v rámci řešení projektu 1M06030 a Z40550506.

LITERATURA

1. Pavlová L.: *Fyziologie rostlin* [online]. 2006, staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyziologie_rostlin/>.
2. Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kálman Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G. P., Nagy F., Schell J., Koncz C.: *Cell* 85, 171 (1996).
3. Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 433, 167 (2005).
4. Müssig C., Altmann T.: *Trends Endocrin. Met.* 12, 398 (2001).
5. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
6. Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E.: *Plant Physiol.* 121, 743 (1999).
7. Yokota T.: *Trends Plant Sci.* 2, 137 (1997).
8. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *Ecdybase - The ecdysone handbook. 3rd edition* [online]. 2002, poslední revize v březnu 2008. Dostupné z: <<http://ecdybase.org>>.
9. Zullo M. A. T.: *The Brassinosteroids Page* [online]. 1997, poslední revize 29. října 2008. Dostupné z: <<http://members.tripod.com/~mzullo>>.
10. Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F., Chory J.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177 (2005).
11. Jizba J., Herout V., Šorm F.: *Tetrahedron Lett.* 18, 1689 (1967).
12. Macek T., Vaněk T., v knize: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj Y., ed.). Springer, Berlin 1994.
13. Bergamasco R., Horn D. H. S., v knize: *Invertebrate Endocrinology, Vol. 1: Endocrinology of Insects* (Downer R. G. H., Laufer H., ed.). Liss, New York 1983.
14. Bouché N., Bouchez D.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 111 (2002).
15. Small I.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 148 (2007).
16. Kusaba M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 139 (2004).
17. Anniss A. M., Apostolopoulos J., Dworkin S., Purton L. E., Sparrow R. L.: *DNA Cell Biol.* 21, 571 (2002).
18. Dawson P. A., Ridgway N. D., Slaughter C. A., Brown M. S., Goldstein J. L.: *J. Biol. Chem.* 264, 16798 (1989).
19. Skirpan A. L., Dowd P. E., Sijacic P., Jaworski C. J., Gilroy S., Kao T. H.: *Plant Mol. Biol.* 61, 553 (2006).

20. Amersham Biosciences: *Affinity chromatography – principles and methods* [online]. Staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <[https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/\\$file/18102229AE.pdf](https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/$file/18102229AE.pdf)>.
21. Merrifield R. B.: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
22. Routledge A., Abell C., Balasubramanian S.: Synlett. 1, 61 (1997).
23. Bodanzsky M., Bodanzsky A.: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, Berlin 1984.
24. Kamlar M., Macek T., Koncz C., Kohout L.: Eur. J. Biochem. 271(S1), 113 (2004).
25. Li J., Chory J.: Cell 90, 929 (1997).
26. Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M.: Plant Cell 12, 1591 (2000).
27. Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G. J.: Plant Cell 14, 3163 (2002).
28. Nomura T., Bishop G. J., Kaneta T., Chory J., Yokota T.: Plant J. 36, 291 (2003).
29. Chono M., Honda I., Zeniya H., Yoneyama K., Saisho D., Takeda K., Takatsuto S., Hoshino T., Watanabe Y.: Plant Physiol. 133, 1209 (2003).
30. Sun Y., Fokar M., Asami T., Yoshida T., Yoshida S., Allen R. D.: Plant Mol. Biol. 54, 221 (2004).
31. Symons G. M., Davies C., Shavruk Y., Dry I. B., Reid J. B., Thomas M. R.: Plant Physiol. 140, 150 (2006).
32. Morillo S. A., Tax F. E.: Curr. Opin. Plant Biol. 9, 460 (2006).
33. Friedrichsen D., Chory J.: BioEssays 23, 1028 (2001).
34. He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Chory J.: Science 288, 2360 (2000).
35. Clouse S. D.: Mol. Cell 10, 973 (2002).
36. Friedrichsen D. M., Joazeiro C. A., Li J., Hunter T., Chory J.: Plant Physiol. 123, 1247 (2000).
37. Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T., Yoshida S., Asami T., Chory J.: Dev. Cell 8, 855 (2005).
38. Nakamura A., Fujioka A., Fujioka S., Sunohara H., Kamiya N., Hong Z., Inukai Y., Miura K., Takatsuto S., Yoshida S., Ueguchi-Tanaka M., Hasegawa Y., Kitano H., Matsuoka M.: Plant Physiol. 140, 580 (2006).
39. Scheer J. M., Ryan C. A.: PNAS 99, 9585 (2002).
40. Narvaez-Vasquez J., Ryan C. A.: Planta 218, 360 (2004).
41. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A.: Science 253 (5022), 895 (1991).
42. Scheer J. M., Pearce G., Ryan C. A.: PNAS 100, 10114 (2003).
43. Meindl T., Boller T., Felix G.: Plant Cell 10, 1561 (1998).
44. Lindsey K., Casson S., Chilley P.: Trends Plant Sci. 7, 78 (2002).
45. Ryan C. A.: Biochim. Biophys. Acta 1477, 112 (2000).
46. Farmer E. E., Ryan C. A.: PNAS 87 (19), 7713 (1990).
47. Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohashi Y.: Plant Cell Physiol. 39, 500 (1998).
48. Yin Y., Wang Z. Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J.: Cell 109, 181 (2002).
49. Boller T.: Curr. Opin. Cell Biol. 17, 116 (2005).
50. Szekeres M.: Trends Plant Sci. 8, 102 (2003).
51. Bishop G. J., Koncz C.: Plant Cell 14(S1), S97 (2002).
52. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K. H., Li J., Chory J.: Development 131, 5341 (2004).
53. Zhou A., Huachun H., Walker J. C., Li J.: Plant J. 40, 399 (2004).
54. Clay N. K., Nelson T.: Plant Cell 14, 2707 (2001).
55. Sato S., Kaneko T., Nakamura Y., Kato T., Tabato S.: DNA Res. 8, 311 (2001).
56. Rossberg M., Theres K., Acarkan A., Herrero R., Schmitt T., Schumacher K., Schmitz G., Schmidt R.: Plant Cell 13, 979 (2001).
57. Iwasaki T., Shibaoka H.: Plant Cell Physiol. 32, 1007 (1991).
58. Wang Z. Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: Nature 410, 380 (2001).
59. Nam K. H., Li J.: J. Cell 110, 203 (2002).
60. Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E., Walker J. C.: Cell 110, 213 (2002).
61. Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C.: Plant Physiol. 127, 803 (2001).
62. Schlessinger J.: Cell 103, 211 (2000).
63. He K., Gou X., Yuan T., Lin H., Asami T., Yoshida S., Russell S. D., Li J.: Curr. Biol. 17, 1109 (2007).
64. Zipfel C.: Curr. Opin. Immunol. 20, 10 (2008).
65. Westphal U. (ed.): *Steroid-Protein Interactions II*. Springer-Verlag, Berlin 1986.
66. Cherbas L., Lee K., Cherbas P.: Genes Dev. 5, 120 (1991).
67. Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.-D., McKeown M., Cherbas P., Evans R. M.: Nature 336, 476 (1993).
68. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*, str. 467 a 470. S. Rosypal, 3. vyd., Brno 1999.
69. Aranda A., Pascual A.: Physiol. Rev. 81, 1269 (2001).
70. Sluder A. E., Maina C. V.: Trends Genet. 17, 206 (2001).
71. Thomas H. E., Stunnenberg H. G., Stewart A. F.: Nature 362, 471 (1993).
72. Oro A. E., McKeown M., Evans E. M.: Nature 347, 298 (1990).
73. Giguere V.: Endocr. Rev. 20, 689 (1999).
74. Maki A., Sawatsubashi S., Ito S., Shiode Y., Suzuki E., Zhao Y., Yamagata K., Kouzmenko A., Kato S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 262 (2004).
75. Jones D., Jones G.: Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 771 (2007).
76. Hayward D. C., Dhadialla T. S., Zhou S., Kuiper M.

- J., Ball E. E., Wyatt G. R., Walker V. K.: *J. Insect Physiol.* 49, 1135 (2003).
77. Weigel N. L.: *Biochem. J.* 319, 657 (1996).
78. Macek T., Uhlík O., Kamlar M., Harmatha J., Kohout L. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.): CZ patent 299886 (A 01 H 1/00, C 12 N 15/82).
79. Raghavendra A. S., v knize: *Encyclopedia of Applied Plant Science* (Thomas B., Murphy D. J., Murray B. G., ed.). Elsevier, Oxford 2003.
80. Malkin R., Niyogi K., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L., ed.), kap. 12. American Society of Plant Physiologists, Rockville 2000.

M. Kamlar^{a,b}, O. Uhlík^{a,b}, L. Kohout^a, J. Harmatha^a, and T. Macek^{a,b} (^a *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*):
Steroid Phytohormones: Function, Mechanism of Action, Significance

In plants, steroid hormones serve as endogenous signaling molecules. Brassinosteroids act as positive growth regulators or as compounds responsible for plant stress tolerance. Phytoecdysteroids probably show an antifeedant activity. It is assumed that the brassinosteroid signal transduction is mediated by the membrane receptor system whereas the ecdysteroid action is still unclear. This review summarizes possibilities of identifying plant proteins capable of binding to steroid hormones in order to get a better insight into their function. Methods of studying the mechanism of action of steroid phytohormones include gene knock-out or knock-down technologies or direct isolation of steroid-binding proteins. The approach is illustrated by the known mechanisms as well as by identification of the Rubisco enzyme as a steroid-binding protein.

PROTIRAKOVINOVÉ TAXÁNOVÉ PRÍRODNÉ LÁTKY

MICHAL MARUNA, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ
a PETRA ONDREJÍČKOVÁ

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univer-
zita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
maria.sturdikova@stuba.sk

Došlo 12.2.08, prepracované 14.5.09, prijaté 4.6.09.

Kľúčové slová: diterpény, paclitaxel, taxány, *Taxus* sp.,
rakovina

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia taxánových diterpénov
 - 2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie
analogov paclitaxelu
 - 2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín
 - 2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe
3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných
a alternatívnych zdrojov
 - 3.1. Biosyntéza
 - 3.2. Izolácia z rastlinného materiálu
 - 3.3. Semisyntéza
 - 3.4. Chemická syntéza
 - 3.5. Biotechnologická produkcia
4. Záver

1. Úvod

Prírodné produkty sa oddávna používali ako účinné prostriedky na liečenie rôznych chorôb či už v tradičnej alebo v dnešnej novodobej medicíne. V súčasnosti sa čoraz viac do popredia dostávajú ťažko liečiteľné civilizačné choroby ako napr. rakovina. Preto sa vedci intenzívne zaoberajú vývojom nových liečiv a inšpiráciu častokrát hľadajú v prírode. Mnohé farmaceuticky významné látky boli izolované z rastlín, živočíchov, húb, morských organizmov a mikroorganizmov. Aj diterpenoidné taxány s hlavným zástupcom paclitaxelom boli objavené pri štúdiách viac ako 12 000 prírodných látok s protirakovinovou aktivitou.

Skúmania fytochemického profilu extraktov kôry *Taxus* sp. (tis) viedli k izolácii cytotoxických diterpenových taxánov, spomedzi ktorých najúčinnější je paclitaxel. V poslednom desaťročí je paclitaxel signifikantným prínosom

v chemoterapii malígnych ochorení. Je účinný na rôzne druhy nádorov, špeciálne vaječníkov a prsníkov. Skúma sa aj ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex, psoriáze, reumatoidnej artritíde. Doteraz je známych viac ako 300 taxánov (prírodných aj semisyntetických), z nich mnohé sú dnes v preklinickom výskume ako potenciálne protirakovinové liečivá. Farmaceutický význam, intenzívny výskum a nízky obsah tejto zložitej látky v rastline (do 600 ppm v suchých častiach) viedli k hľadaniu možností biotechnologickej produkcie, pretože priemyselne zatiaľ dominuje finančne náročná chemická semisyntéza spojená s izoláciou z medziproduktov rastlín *Taxus* sp. Alternatívne produkčné systémy pre taxány sú najmä rastlinné bunky *Taxus* sp. a mikroorganizmy. V tejto súvislosti boli začaté intenzívnejšie štúdie endofytických a epifytických fungálnych a bakteriálnych komunit hostiteľských farmaceuticky významných rastlín.

2. Charakterizácia taxánových diterpénov

Diterpény sú veľkou podskupinou terpenov, ktoré tvoria jednu z najväčších skupín prírodných produktov. Viac ako 30 000 zlúčenín patriacich do tejto skupiny zahŕňa aj medicínsky významné látky ako vitamíny, hormóny a cytostatické liečivá.

Taxány sú vo vode málo rozpustné diterpény, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sú účinnými protinádorovými látkami. Paclitaxel, komplexný amidový diterpenový derivát izolovaný z pacifického tisu (*Taxus brevifolia*), bol popísaný Národným rakovinovým inštitútom (NCI) v USA v roku 1962. V deväťdesiatych rokoch 20. storočia bol spoločnosťou Bristol-Myers Squibb patentovaný obchodný názov paclitaxelu Taxol®. V súčasnosti je považovaný za jeden z najdôležitejších protirakovinových prostriedkov¹. Záujem o paclitaxel začal okolo roku 1962, keď extrakt z kôry *Taxus brevifolia* bol testovaný v rastlinnom skriningu NCI (National Cancer Institute, USA). Klinický výskum paclitaxelu bol však oneskorený pre ťažkosti, ktoré súviseli s jeho toxicitou, určením presnej chemickej štruktúry a hlavne výskytom v prírodných zdrojoch vo veľmi malých množstvách. Diterpenový pseudoalkaloid so sumárnym vzorcom $C_{47}H_{51}NO_{14}$ a molekulovou hmotnosťou 852 Da bol prvýkrát získaný v čistej forme v roku 1969 a jeho komplikovaná štruktúra bola publikovaná v roku 1971 (cit.²). História paclitaxelu je prehľadne sumarizovaná v tabuľke I.

2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie
analogov paclitaxelu

Taxánové zlúčeniny disponujú viacerými funkciami priaznivými ale aj nevhodnými pre organizmus. Toxicita

Tabuľka I

História paclitaxelu (Taxolu®) ako protirakovinovej látky³

Rok	Udalosť
1963	Objavenie protirakovinovej aktivity extraktu kôry <i>Taxus brevifolia</i> počas skríningu 35 000 rastlín.
1971	Identifikácia paclitaxelu ako aktívnej súčasti protinádorovej aktivity extraktu.
1979	Zistenie unikátneho mechanizmu paclitaxelu na stabilizáciu tubulínu.
1983	Zahájenie klinickej skúšky bezpečnosti a účinnosti paclitaxelu voči rôznym typom rakoviny (NCI).
1989	Dosiahnutie 30 % úspešnosti liečby rozvinutej rakoviny vaječníkov.
1991	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb je vybraná ako komerčný partner NCI vo vývoji injekčnej formy a aplikácií paclitaxelu.
1992	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu ťažko liečiteľnej rakoviny vaječníkov. Klinické testy ukázali, že toto liečivo je účinné aj na pokročilé štádium rakoviny prsníkov.
1993	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb končí s ťažbou <i>Taxus brevifolia</i> pre výrobu paclitaxelu a začína skúmať iné obnoviteľnejšie zdroje tejto zlúčeniny.
1994	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu rakoviny prsníkov v štádiu, keď počiatočná chemoterapia po šesť mesačnej liečbe nebola účinná alebo na liečbu metastázujúcej rakoviny prsníkov, ktorá sa nedá liečiť chemoterapeutickou kombináciou.
	Prehľadnocovanie schválenia používania semisyntetickej formy paclitaxelu.
1995	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu na liečbu Kaposiho
1997	sarkómu spojeného s AIDS v druhej línii liečby. Schválenie produkcie paclitaxelu pomocou rastlinných bunkových kultúr <i>Taxus sp.</i> v Kórei a dovoz do iných krajín spoločnosťou Samyang Genex.
1998	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rozvinutého karcinómu vaječníkov v prvej línii liečby.
1999	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rakoviny pľúc u pacientov, ktorí nie sú vhodní kandidáti na operáciu alebo rádioterapiu.
2000	Zisk z predaja paclitaxelu dosiahol 1,6 miliardy USD.
2001	Patent na výrobu a predaj semisyntetického derivátu paclitaxelu docetaxelu (obchodný názov Taxotere, firma Sanofi-Aventis).
2005	Povolenie používania Abraxanu (paclitaxel naviazaný na albumín) na liečbu rakoviny prsníkov.
Súčasnosť	Produkcia paclitaxelu firmou Phyton pomocou explantátových kultúr <i>Taxus sp.</i>

rastlín *Taxus* bola už dlho známa, pripisovali ju hlavne taxínom, zmesi látok získanej z ich ihličia prvýkrát v roku 1856. Neskôr sa ukázalo, že taxíny sú zmesou siedmich alkaloidov a k toxicite tisu prispievajú nemalou mierou aj odlišné cytotoxické diterpénové taxány. Aj mnohé iné viac rozšírené rastliny sú bohaté na taxíny, ktoré môžu byť alternatívnymi štartovacími látkami pre semisyntézu paclitaxelu⁴.

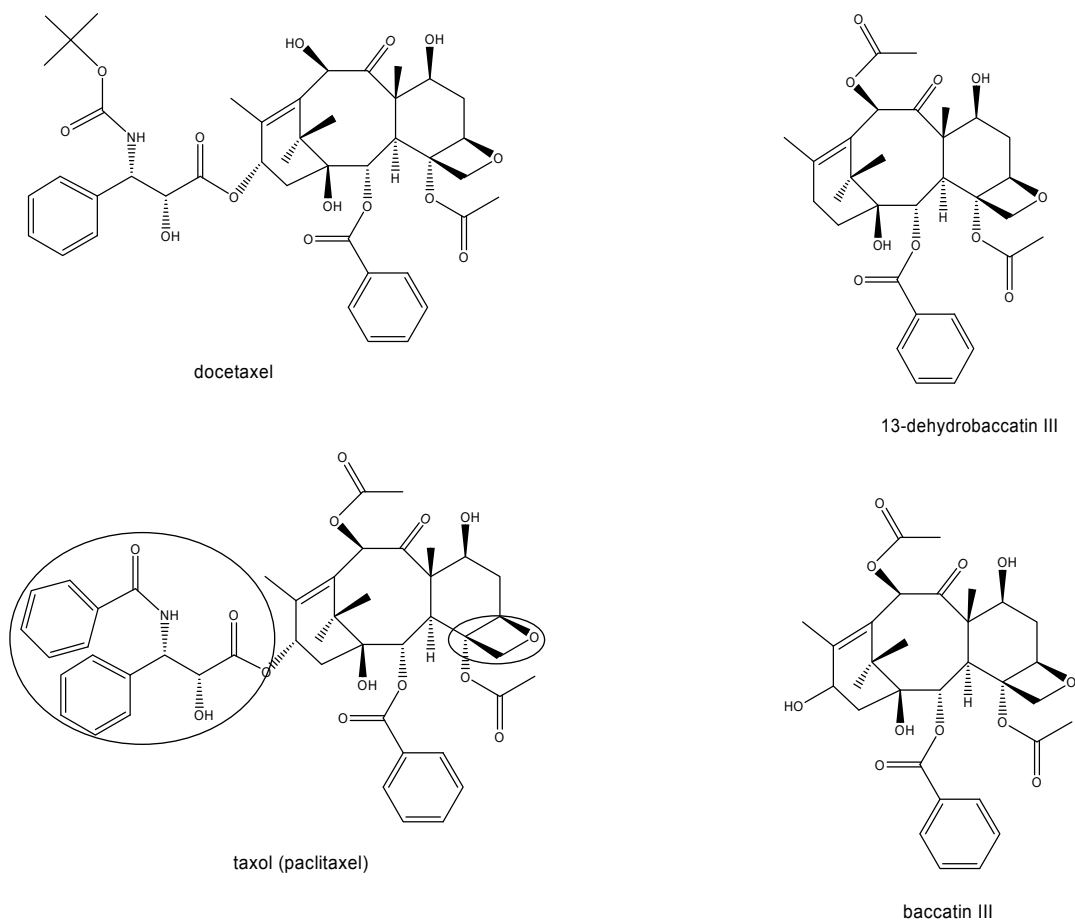
Najdôležitejšiou vlastnosťou taxánov je ich cytotoxický účinok. Touto vlastnosťou sa vyznačuje hlavný zástupca paclitaxel a niekoľko jeho prírodných i semisyntetických derivátov s postranným C-13 reťazcom v taxánovej molekule (docetaxel, 7-epitaxol alebo IDN 5109). Taxány sú v dnešnej dobe prototypom novej triedy chemoterapeutík. Ich biologická aktivita bola dokázaná už dávnejšie na viacerých modeloch rakovinových buniek: L1210, Walker 256, P 1534, P 388 a B 16 (cit.⁵).

Podaktoré taxány vykazujú antifungálnu aktivitu, sú schopné inhibovať rast niektorých parazitických húb, napr.

Plasmodium falciparum, alebo *Toxoplasma gondii*⁶. Taxány majú ďalej význam pri ochrane rastlín *Taxus sp.* pred patologickými zmenami koreňa spôsobenými fytophagami *Pythium* a *Phytophthora*. Hoci rastú pri močiároch a jazerách, veľmi zriedka trpia hnilobou koreňov⁷.

Schopnosť zastaviť rast nádorových buniek má niekoľko taxoidov. Sú vhodné a veľmi účinné najmä voči rakovine prsníkov a vaječníkov. Výskumy ukázali, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože^{8,9}. Dnes sa už úspešne aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú docetaxel (taxotere), semisyntetický člen taxánových zlúčenín. Efektívne pôsobí pri liečbe pacientiek s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie¹⁰. V štádiu výskumu je jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, hrubého čreva (HCT 116) alebo močových ciest^{11–13}.

Prípravok TAXOL je indikovaný na liečbu nasledujú-



Obr. 1. Štruktúry najznámejších taxánov (paclitaxel a jeho za cytotoxicitu zodpovedný reťazec na 13. uhlíku a oxetánový kruh na 4. a 5. uhlíku)

cich ochorení:

- Karcinóm ovárií: aplikuje sa samostatne alebo v kombinácii s cisplatinou v pokročilom štádiu ochorenia. Pri sekundárnej liečbe sa používa na terapiu metastázujúceho karcinómu vaječníkov po zlyhaní štandardnej terapie.
- Karcinóm prsníkov: nasadzuje sa po zlyhaní štandardnej terapie alebo v adjuvantnej liečbe karcinómu prsníka s metastázami do uzlín po predchádzajúcej štandardnej kombinovanej terapii.
- Nemalobunkový karcinóm pľúc: využíva sa pri liečbe pacientov, u ktorých primárne nie je možné uskutočniť radikálny spôsob liečby (chirurgický výkon alebo ožiarenie).
- Kaposiho sarkóm: ide o sekundárnu terapiu u pacientov s AIDS¹⁴.

Z farmaceutického hľadiska významnými derivátmi paclitaxelu sú 7-epitaxol alebo derivát 14-hydroxy-10-deacetylbaaccatinu III označený ako IDN 5109, ktorý vykazuje vysokú účinnosť na bunky karcinómu vaječníkov

(modely 1A9, HOC 18), pričom spôsobuje 90–100% nádorovú regresiu. Navyše je zatiaľ jediným taxánom, ktorý by bol vhodný i na perorálnu aplikáciu⁹.

Protinádorové deriváty paclitaxelu sa môžu aplikovať buď ako jediná terapeutická zložka (monoterapia) alebo spolu s niektorými inými cytostatickými látkami, ako sú doxorubicín, vinblastín, vinkristín atď. Napríklad boli zaznamenané úspechy pri sledovaní inhibície rastu buniek rakoviny prostaty na modeloch LN Cap a PC-3, kedy sa použila kombinácia paclitaxelu so selénom¹⁵.

Paclitaxel má predpokladané terapeutické využitie aj pri liečbe psoriázy, reumatoidnej artritídy, Alzheimerovej choroby ako aj pri liečbe polycystickej autozomálnej choroby obličiek. Okrem uvedených aktivít sú známe aj jeho antiproliferačné a protizápalové vlastnosti. Štyri taxánové zlúčeniny izolované z *Taxus baccata* L. taxusin, baccatin VI, baccatin III a 1-hydroxybaccatin I majú protizápalovú a antinociceptívnu aktivitu¹⁶. Chemické vzorce najznámejších taxánov sú uvedené na obr. 1.

2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín

V roku 1979 Fuchs a Johnson popísali biologicky aktívne taxány ako látky pôsobiace antimitoticky na bunky¹⁷ a v tom istom roku Horwitz objasnil, že napomáhajú ireverzibilnému zhlukovaniu tubulínu, ktorý je súčasťou mikrotubulov¹⁸.

Chemická štruktúra jednotlivých taxánov zodpovedá za ich, či už väčšiu alebo menšiu, biologickú účinnosť. Dokázalo sa, že je to predovšetkým oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 (obr. 1), ktoré sú nevyhnutné pre zabezpečenie ich cytotoxicity. Oxetánový kruh je nielen akceptorom protónov, ale zaisťuje aj pružnosť tetra-cyklického jadra taxánového skeletu, čím sú taxány schopné zapojiť do reakcie s proteínmi bočné reťazce v polohách C-2, C-4 a C-13 (cit.¹⁹).

Mikrotubuly sú vnútrobunkové polymérne útvary, ktorých dynamika má rozhodujúcu úlohu v tvorbe mitotického vretienka, pri kontrole mitózy a v pohybe chromozómov. Predpokladá sa schopnosť paclitaxelu potlačiť dynamiku mikrotubúl a tým inhibovať mitózu v bunkovom cykle, čiže aj proliferáciu. Zistené to bolo na dvoch druhoch ľudských nádorových buniek, konkrétne vaječnickových Caov-3 a obličkových A-498. Mitotické vretienko bolo abnormálne u 30 % buniek Caov-3 z celkového počtu a až 58 % v prípade A-498 buniek po aplikácii paclitaxelu²⁰.

Biologická aktivita taxánov spočíva v schopnosti navzájom pútať tubulínové vlákna a iniciovať koaguláciu mikrotubulov, čo znemožňuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteínové štruktúry, ktoré zapríčinia zastavenie bunkového cyklu v G₂/M fáze, čo inhibuje rast nádorových buniek. Paclitaxel je jedným z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom²¹.

2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe

Pri vývoji a výrobe liečiv na báze taxánov sa stretávajú s dvoma vážnymi problémami. V prvom rade je to ich veľmi slabá rozpustnosť vo vode (približne 4 µg ml⁻¹), čo spôsobuje značné ťažkosti s aplikáciou pacientom pri liečbe. Druhým problémom je vyčerpatelnosť prírodného zdroja, nízke výťažky a vysoká náročnosť prípravy v purifikovanej forme vyhovujúcej klinickým potrebám⁵. Taxány používané v medicíne sú 3 až 10× menej rozpustné ako iné látky s podobným účinkom (doxorubicín, daunorubicín). Pretože ich funkčné skupiny sú ionizované v rozmedzí hodnôt pH nevhodných pre farmaceutické použitie, zmenou pH sa rozpustnosť nezmení. Výskumy zamerané na zvyšovanie solubility zahŕňali aplikácie rôznych komplexov (kladne alebo záporne nabitých), prípravu ich solí, atď. Pozitívnejšie výsledky priniesli pokusy chemicky modifikovať polohy C-2 a C-7, čím vznikli syntetické deriváty taxánov nazývané ako „prodrugs“. Takéto zlúčeniny už mali dostatočnú rozpustnosť a tým primerané farmaceutické vlastnosti, vyhovujúce prísnyim požiadav-

kám na použitie v humánnej medicíne. Tieto deriváty nevykazovali biologickú aktivitu, avšak po aplikácii do organizmu sa hydrolyzovali za vzniku pôvodného účinného taxánu²². Skúma sa ďalej naviazanie xylozylových, glukozylpyranozylových, sukcinátových, glutarátových zvyškov, prípadne ich esterov a solí, niektorých aminokyselín v polohe C'-2. Veľká pozornosť sa venuje v dnešnej dobe konjugátu kyseliny glutámovej s paclitaxelom v polohe C-2 (paclitaxel poliglumex, nazývaný tiež XYOTAX). Je to inaktívny, dostatočne rozpustný komplex, paclitaxel sa z neho uvoľňuje po pôsobení proteázy katepsínu B, ktorá sa vo väčšej miere nachádza v rakovinových bunkách a tým je zaručený účinok paclitaxelu len na nádorové bunky²³.

Druhá generácia taxoidov bola pripravená systematickou modifikáciou na C-2, C-10 a C-3'N pozíciách a bol študovaný vzťah ich štruktúry a biologickej aktivity. Vyvíjanie taxánov s lepšími farmakologickými vlastnosťami a zvýšenie aktivity špeciálne proti rakovine rezistentnej na terapeutiká viedol k vývoju tretej generácie taxoidov. Niektoré taxoidy tretej generácie prejavujú excelentnú toxicitu voči línii pankreatických buniek expresiou „multidrug“ rezistentných génov^{24,25}.

V súčasnosti sa tiež študujú nanočastice s enkapsulovaným paclitaxelom samotným a enkapsulovaným paclitaxelom spolu s inhibítorom P-glykoproteínu (P-gp), kľúčovým faktorom rezistencie na nádorové liečivá²⁶.

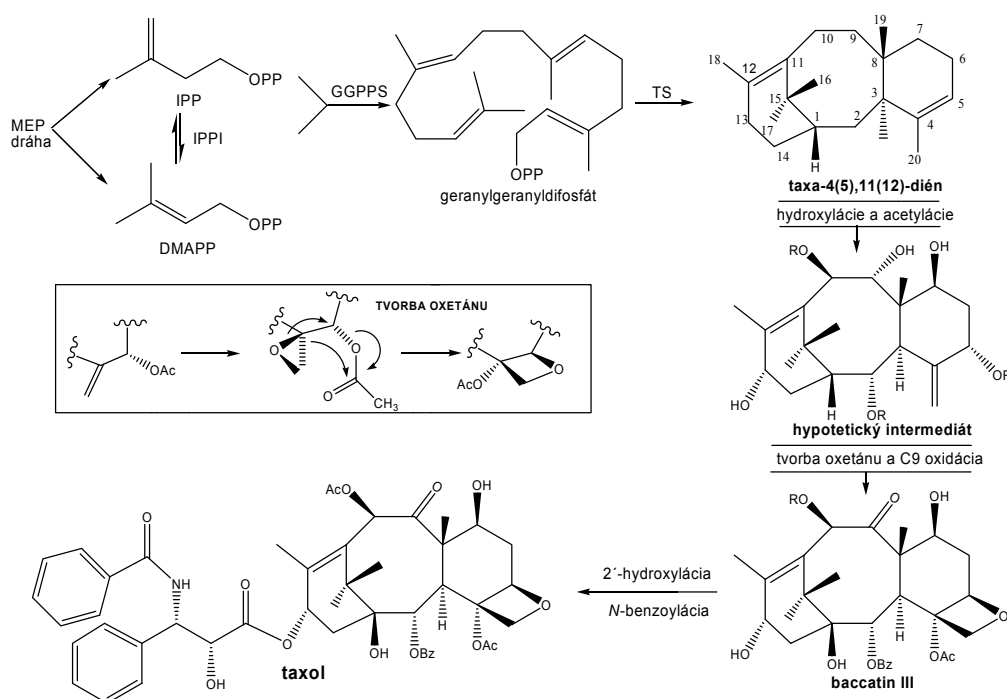
Ďalej sa výskum zamerával na iné látky (prípadne ich zmesi), ktorých prítomnosť v preparáte by zvýšila hydrofilnosť taxánov (etanol, dimetylsulfoxid, Tween 80, karboxymetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, polyetylén-glykol, lecitín, polyoxyetylovaný ricínový olej – Cremofor EL). Nakoniec sa ako najvhodnejší pre klinický vývoj ukázal polyoxyetylovaný ricínový olej (50%) a dehydrátovaný alkohol s koncentráciou účinného taxánu 6 mg ml⁻¹. Bežné balenie vyvinutého preparátu obsahuje 5 ml tejto zmesi. Pri aplikácii je liek 5 až 20× zriedený fyziologickým roztokom alebo 5% roztokom dextrózy, takže koncentrácia účinnej látky je 1,2–0,3 mg ml⁻¹. Nemenej významnú úlohu zohrávajú i fosfolipidové nosiče taxánových liečiv, lipozómy. Biologicky aktívny taxán, ktorý je inkorporovaný do lipozómov, penetruje do nepolárnej časti lipidickej dvojvrstvy²⁷.

Nedávno bol vyvinutý biodegradovateľný polymérny systém na báze poly-(kyselina sebaková – kyselina ricínolejová) na prenos paclitaxelu priamo do miesta proliferácie. Takto zavedený paclitaxel do polyméru a injektovaný do vnútra nádora bol efektívny v liečbe lokalizovaných nádorov²⁸.

3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných a alternatívnych zdrojov

3.1. Biosyntéza

Dve základné metabolické cesty sú známe pre biosyntézu izoprenoidov a to mevalonátová a ne-mevalonátová

Obr. 2. Schéma biosyntézy paclitaxelu²⁹

dráha. Prvým prekursorom mevalonátovej dráhy je acetyl-aktivovaný ako acetylkoenzým A. Dve následné kondenzácie vytvárajú acetoacetyl-CoA a 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A (HMG CoA), ktorý je potom redukovaný na mevalonát. Reakcia je katalyzovaná HMG-CoA-reduktázou. Dve ďalšie fosforylácie mevalonátu nasledované dekarboxyláciou za účasti ATP vedú k vzniku izopentenylfosfátu, pre ktorý je charakteristický päťuhlíkatý reťazec všetkých izoprenoidov. Nemevalonátová dráha je rozšírená v baktériách a vyšších rastlinách. Reakciou pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu cez sériu katalytických krokov vznikne izopentenylidifosfát (IPP). Za kľúčový prekursor izoprenoidov je teda považovaný IPP a nie mevalonát. IPP vystupuje ako prekursor izoprenoidov tak u organizmov obsahujúcich mevalonátovú, ako aj glycerinaldehyd-pyruvátovú dráhu. Z IPP ďalej vzniká geranylgeranyl-difosfát (GGPP), prekursor protirakovinových taxoidných liečiv²⁹. Na objasnenie celej biosyntézy sa použilo náhodné sekvenovanie cDNA knižnice buniek *Taxus cuspidata*, v ktorých bola biosyntéza taxánov indukovaná metyljasmonátom³⁰. Kľúčovým krokom biosyntézy je zacyklenie univerzálneho prekursora GGPP na taxa-4, (5),11(12)-dién (obr. 2). Reakciu katalyzuje enzým taxadiénsyntáza. Z hľadiska stereochemie mechanizmus tohto kroku spočíva v tom, že GGPP sa uzatvára do cyklickej formy za vzniku prechodného verticilénového intermediátu, nasleduje transfer α -protónu z polohy C-11 na C-7, čo iniciuje vznik B/C kruhu (vytvorená zlúčenina je taxanylový kation). Nasleduje deprotonizácia na C-5 (cit.³¹). Bol

zaznamenaný vysoký stupeň expresie génu pre taxadiénsyntázu (TS). Aj napriek značnému množstvu enzýmu TS (jeho koncentrácia je najvyššou zo všetkých enzýmov biosyntézy taxánov), cykлизácia GGPP je pomalý krok tvorby taxánov. V ďalšom formovaní molekuly taxánov zohrávajú dôležitú úlohu cytochróm P450 oxygenázy. Príslušné oxygenácie zahŕňajú takmer polovičný počet reakcií taxánovej biosynthetickej dráhy. Katalyzuje ich skupina enzýmov, ktorá v *Taxus cuspidata* obsahuje 2 α -, 5 α -, 7 β -, 10 β -, 13 α - a 14 α -hydroxylázy³². Acylácia hydroxylových skupín patrí do ďalšej série úprav postranných reťazcov taxánov. CoA dependentné acyl- a aryl-transferázy sú tiež dôležitou súčasťou biosyntézy paclitaxelu. Katalyzujú 5 z 19 krokov dráhy tvorby taxánov³³. Je známy veľký počet taxánov, ktoré sa líšia polohou hydroxylov na taxánovom jadre a tiež typom acylu alebo arylu. Rekombinantné transferázy umožnili počiatočnú acetyláciu na C-5 taxánového jadra, následne benzoyláciu na C-2, acetyláciu na C-10. N-benzoylácia na C-13 prebieha pomocou fenylalanínaminomutázy. Ostávajúce úpravy reťazca pozostávajú z C-1 a C-9 hydroxylácie, C-4 a C-20 epoxidácie. Tieto úpravy vedú k vzniku baccatinu III (obr. 2, cit.³⁴).

3.2. Izolácia z rastlinného materiálu

Taxány možno získať priamou izoláciou z rastlinného materiálu, čo je však najmä z ekologického hľadiska nepri-

pustné, pretože dochádza k ničeniu vzácnych tisových stromov. Získanie 2 g čistého paclitaxelu vyžaduje vyhubenie približne 12 veľkých stromov tisu a stojí 10 000 USD (cit.³⁵). Výťažky taxánov získaných týmto procesom sú veľmi nízke, pohybujú sa v rozmedzí 100–300 ppm purifikovanej látky vzhľadom na hmotnosť suchého floému. Taxány sa extrahujú tiež z ihličiek *Taxus* sp., kde ich obsah je vyšší, do 500 ppm hmotnosti suchého ihličia pre cephalomanin a baccatin III, do 480 ppm hmotnosti suchých ihličiek pre brevifoliol a 10-deacetyl-baccatin III. Problém spojený s izoláciou z pletív predstavuje i fakt, že zastúpenie taxánov počas jednotlivých ročných období u toho istého druhu sa značne mení³⁶.

Taxus sp. môžeme najčastejšie nájsť na území Severnej Ameriky a Eurózie, ide o veľa vzácnych druhov. Vo všeobecnosti sa tieto ihličnaté stromy vyskytujú vo vlhkom prostredí pralesov severnej hemisféry, ale rastú tiež v subtropickom a tropickom pásme na juhu a juhovýchode Ázie a Strednej Ameriky, aj na južnej pologuli na ostrovoch Sumatra a Celebes.

Podľa geografickej lokality rozoznávame niekoľko prirodzených sa vyskytujúcich druhov:

- *Taxus brevifolia* rastie v západnej časti Kanady a USA,
- *Taxus globosa* sa vyskytuje v Mexiku, El Salvadore, Hondurase a Guatemale,
- *Taxus floridana* je endemickým ihličnanom na severe Floridy,
- *Taxus canadensis* je rozšírený od Newfoundlandu až k Manitobe a od Iowy k Severnej Karolíne,
- *Taxus baccata* má domov v Európe a na severe Afriky,
- *Taxus cuspidata* je typickou rastlinou v Číne, Japonsku, Kórei,
- *Taxus wallichiana* rastie vo východnom Afganistane, Tibete, Číne.

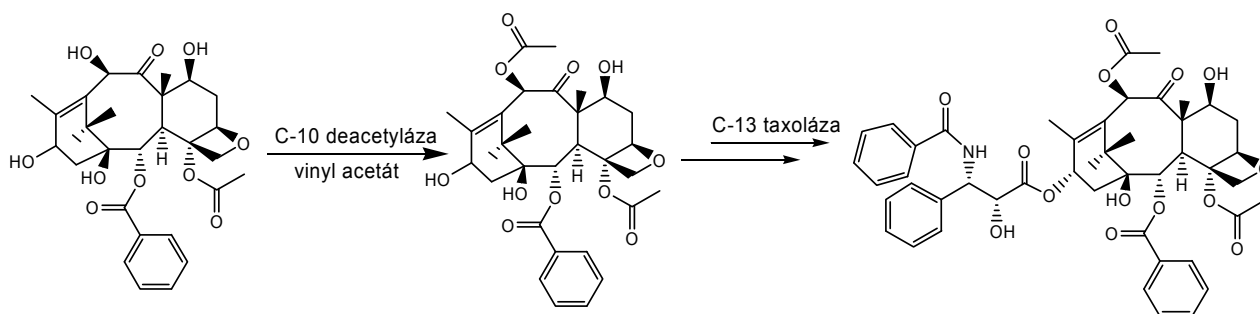
Z ďalších druhov možno spomenúť *Taxus chinensis*, *Taxus celebica*, *Taxus x media*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus maire* a *Taxus sumatrana*³⁷. Na zastúpenie jednotlivých taxánov v ihličnanoch majú vplyv okrem geografickej lokality i ekologické a poľnohospodárske faktory aj podmienky skladovania. V experimente, ktorý uskutoč-

nil van Rozendaal a spol. v roku 2000, bolo analyzované ihličie niekoľkých druhov a kultivarov tisu metódou HPLC. Sledovali prítomnosť paclitaxelu, 10-deacetyl-paclitaxelu, cefalomanínu, baccatinu III, 10-deacetyl-baccatinu III a brevifoliolu. Z piatich rôznych lokalít v Holandsku a vo Veľkej Británii bolo odobratých okolo 750 rôznych vzoriek. Výsledky skriningu ukázali veľkú variabilitu v obsahu taxánov medzi rôznymi druhmi a kultivarmi. Obsah paclitaxelu a 10-deacetyl-baccatinu III sa pohyboval v rozmedzí 0–500 ppm a 0–480 ppm hmotnosti suchého ihličia. Brevifoliol sa vo vysokej koncentrácii našiel u *Taxus brevifolia*. 10-deacetylpaclitaxel, cefalomanín a baccatin III sa vyskytovali v koncentráciách v rozsahu 0–500 ppm hmotnosti suchého ihličia. Obsah paclitaxelu je najviac 100 ppm v suchom ihličí. Storočný strom tis obsahuje okolo 300 mg tejto zlúčeniny³⁶. Ďalším primárnym zdrojom taxánov je cyprus *Taxodium distichum*, pre ktorý je typické podobné prostredie ako pre *Taxus* sp. Ide taktiež o neopadávy ihličnan s lineárnym dvojradom ihličiek, ktorý preferuje vlhké podnebie. Má výšku 30–40 m a je charakteristickou drevinou v oblasti močiarov na juhovýchode USA³⁵.

3.3. Semisyntéza

Semisyntéza je v súčasnosti jedným z hlavných postupov, ktorými sa pripravujú taxány. Tento proces zahŕňa limitované množstvo syntetických krokov (napr. pripojenie C-13 postranného reťazca) potrebných na konverziu taxánových intermediátov extrahovaných z rastlinných pletív *Taxus* sp. na 10-deacetyl-baccatin III. Táto zlúčenina je potom použitá na prípravu finálnych taxánových produktov ďalšími úpravami jej postranných reťazcov za vzniku želaných produktov. Vo farmaceutickej výrobe paclitaxelu zatiaľ prevláda chemicko-organický spôsob pripájania postranných reťazcov na základný taxánový skelet aj napriek tomu, že sú známe biologické produkčné systémy, čo je pravdepodobne dané ekonomickým hľadiskom.

Medzi príklady firiem používajúcich biologický systém patrí spoločnosť Bristol-Myers Squibb. Ide o kmeň



Obr. 3. Enzymová konverzia 10-deacetyl-baccatinu III cez baccatin III na paclitaxel³⁸

Tabuľka II

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, baničkové kultivácie⁴³

Druh	Taxán	Produkcia [mg l ⁻¹]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus canadensis</i>	paclitaxel	117	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	506	
<i>Taxus media</i>	paclitaxel	110,3	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	145,3	
<i>Taxus chinensis</i>	paclitaxel	153	optimalizácia média, elicitácia, dovojpasážová kultivácia
	celkové taxány	295	
	paclitaxel	67	prerušované prítokovanie maltózy
	paclitaxel	78,5	regulácia osmotického tlaku
	paclitaxel	49,6	elicitácia AgNO ₃
	taxuyunnanin C	885,9	
	paclitaxel	82,4	elicitácia AgNO ₃ a teplotný posun
	taxuyunnanin C	512,9	
	paclitaxel	137,5	elicitácia AgNO ₃ a teplotný posun
	taxuyunnanin C	274,4	prítokovanie sacharózy
	taxuyunnanin C	527	elicitácia metyljasmonátom a teplotný posun

Tabuľka III

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, kultivácie v bioreaktoroch⁴³

Druh	Taxán	Produkcia [mg l ⁻¹]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus cuspidata</i>	Paclitaxel	22	kinetická štúdia
	Celkové taxány	74	prítokované médium
<i>Taxus chinensis</i>	Taxuyunn-anin C	229	prídavok etylénu
	Taxuyunn-anin C	336	elicitácia metyljasmonátom, prítokovanie sacharózy, pridávanie etylénu
	Taxuyunn-anin C	612	opakovaná elicitácia metyljasmonátom, pridávanie sacharózy
<i>Taxus media</i>	Paclitaxel	21,1	použitie prekurzorov metyljasmonátu,
	Baccatin III	56	dve pasáže

Nocardia lutenis, realizujúci biotransformáciu 10-deacetyl-baccatinu III na baccatin III (obr. 3, cit.³⁸). Ďalšia konverzia baccatinu III na paclitaxel prebieha vo výrobe chemickou syntézou. V literatúre sú popísané aj enzýmy, ktoré nahrádzajú chemickú katalýzu 10-deacetyl-baccatinu III na paclitaxel. Sú to C-13 taxoláza, C-10 deacetyláza. Enzýmy sa získavajú pomocou mikroorganizmov, napr. *Nocardioideus albus*, *Moraxella* sp.³⁸.

Bola zistená aj biotransformácia taxánov produkovaných *Taxomyces andreanae*, ktorá zahŕňa hydroxyláciu, deacetyláciu, hydrolyzu, epimerizáciu, a to viacerými hubami napr. *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Absidia coerulea*, *Microsphaeropsis onychiuri*, *Mucor* sp., *Alternaria alternata* a *Aspergillus niger*³⁹. Napriek tomu, že proces semisyntézy je efektívny, purifikácia prekurzorov z rastlinného pletiva je náročná a zdĺhavá

vďaka veľkému množstvu fenolických, lipidických a ďalších kontaminantov vyskytujúcich sa v rastlinách. Nevýhodou pri extrakcii prekurzorov biosyntézy taxánov z rastlinného materiálu je aj variabilita obsahu taxánov v závislosti od epigenetických a environmentálnych faktorov, ako aj pomalý rast *Taxus* sp.⁴⁰.

3.4. Chemická syntéza

Keďže taxány sú pomerne zložité štruktúry, totálna syntéza predstavuje finančne veľmi náročnú cestu ich prípravy, a preto je nevýhodná. Napriek tomu už boli navrhnuté všetky kroky syntézy, ktorej princípom je konvergentná stratégia, čím sa otvorila nová možnosť výroby taxánov⁴¹.

3.5. Biotechnologická produkcia

Biotechnologický proces prípravy taxánov je založený na kultivačných postupoch s rastlinnými bunkovými kultúrami alebo na mikrobiálnom princípe, kde sa môžu uplatniť i metódy génového inžinierstva, prípadne nahradenie niektorého kroku tvorby produktu chemickými syntézami alebo aplikáciou enzýmov. Väčšina takýchto procesov je v ďalšom štádiu výskumu, postupne sa však predpokladá aj ich využitie v priemysle.

Využitie explantátových kultúr

Taxánové metabolity sú izolované z podkôry ihličnany procesom, ktorý rastliny ničí. *Taxus* sp. nie je bežnou drevinou a rastie veľmi pomaly. Jednou z alternatív, čo rieši tento problém, je kultivácia rastlinných buniek rôznych línií schopných produkovať väčšie množstvá taxánových sekundárnych metabolitov v závislosti od zloženia kultivačného média⁴. Rastlinné bunkové a pletivové kultú-

ry nazývané explantáty z intaktných rastlín sa získavajú selekciou a izoláciou živých rastlinných pletív. Prostredie pre explantáty je prísne kontrolované, sú dodržiavané striktné aseptické podmienky, dôležité je zloženie média a fyzikálne faktory (teplota, svetlo, vlhkosť). Pre bunkové kultúry *Taxus* sp. sú už vyvinuté techniky využívajúce diferencované aj nediferencované bunky. Kalusové kultúry boli úspešne vytvorené z kôry, mladých kmeňov a z ihličia rôznych druhov *Taxus*. Pojem kalus predstavuje neorganizovanú, množiacu sa masu nediferencovaných buniek. Prenosom kalusov do vhodného tekutého živného média sa dajú vytvoriť bunkové suspenzie. Suspenzné kultúry sú výhodné, pretože v takomto systéme sa ľahšie ovplyvňujú podmienky rastu a produkcie látok⁵. Na syntézu taxánov sa využívajú rovnako aj diferencované bunkové kultúry obsahujúce organizované pletivá, v ktorých sú zachované interakcie medzi bunkami, pletivami a orgánmi, podobné tým v intaktných rastlinách. Diferencované bunkové kultúry môžu byť výhodné z hľadiska tvorby sekundárnych metabolitov, pretože tu existuje predpoklad zachovania dočasnej schopnosti priestorovej expresie génov, esenciál-

Tabuľka IV

Mikroorganizmy produkujúce taxány

Metabolit	Produkčný mikroorganizmus	Hostiteľský organizmus
Taxány	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i> ⁴⁴
	<i>Pestalotiopsis quepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i> ⁴⁵
	<i>Pestalotia heterocornis</i>	<i>Taxus</i> sp. ⁴⁵
	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ⁴⁴
	<i>Pestalotia bicilia</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
Paclitaxel	<i>Sporormia minima</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
	<i>Trichothecium</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
	<i>Tubercularia</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> ^{17,46}
	<i>Mucor rouxianus</i>	<i>Taxus chinensis</i> ⁴⁹
	<i>Monochaetia</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
	<i>Nodulisporium sylviforme</i>	<i>Taxus brevifolia</i> ⁴⁸
	<i>Seimatoantlerium tepuiense</i>	<i>Maguireothamnus Speciosus</i> ⁴⁶
	<i>Sporormia minima</i>	<i>Taxus</i> sp. ⁴⁶
	<i>Trichothecium</i> sp.	<i>Taxus wallichiana</i> ⁴⁶
	<i>Corylus avellana</i>	<i>Taxus wallichiana</i> ⁴⁶
	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallichiana</i> ³⁵
	<i>Ozonium</i> sp.	<i>Taxus chinensis</i>
		<i>Taxus yunnanensis</i> ⁴⁷
	<i>Fusarium mairei</i>	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>Mairei</i> ⁵⁰
	<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Terminalia arjuna</i> ⁵¹
	<i>Nodulisporium sylviform</i>	<i>Taxus</i> sp. ⁵²
	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Citrus medica</i> ⁵³
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i> ⁵⁴
	<i>Phyllosticta tabernaemontanae</i>	<i>Wrightia tinctoria</i> ⁵⁵
	<i>Chaetomella raphigera</i>	<i>Terminalia arjuna</i> ⁵⁶
	<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i> ⁵⁷
	<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Podocarpus</i> ⁵⁸

nych pre syntézu žiadaných látok⁴². Príklady produkcie taxánov explantátovými kultúrami *Taxus* sp. v baničkách, resp. v bioreaktoroch sú uvedené v tab. II a tab. III.

Mikrobiálna príprava taxánov

Dôkaz, že aj iný organizmus ako bunky *Taxus* sp. dokáže produkovať taxány, bol uskutočnený u mikroorganizmu *Taxomyces andreanae*, endofytickej huby, izolovanej z floému *Taxus brevifolia*. Huba patrí do triedy *Hyphomycetes* (pododdelenie *Deuteromycotina*) a je schopná syntetizovať taxánové metabolity kultiváciou na semisynetickom kvapalnom médiu. Výťažky boli pôvodne veľmi malé, 25–50 ng l⁻¹ (cit.⁴⁴).

Súčasný poznatky naznačujú možnosť horizontálneho transferu génov zodpovedajúcich za tvorbu taxánov, ku ktorému môže dochádzať medzi jednotlivými druhmi *Taxus* sp. i medzi nimi a hosťujúcimi endofytmi. Prenos genetickej informácie súvisí pravdepodobne s tým, že niektoré mikroorganizmy rastlín *Taxus* sp. tvoria taxány, aby mohli prežiť v pletivách týchto ihličnanov³⁵. Jednoznačným dôkazom tohoto tvrdenia bolo objavenie endofytu *Pestalotiopsis microspora*. Bol potvrdený jeho výskyt v istom druhu *Taxus*, z ktorého bol získaný aj produkčný kmeň *Taxomyces andreanae*. Rod *Pestalotiopsis* je zrejme geneticky veľmi flexibilná skupina mikroorganizmov. Je to evidentné tak zo značnej variabilnosti v tvorbe produktov, ako aj z ich kultivačných charakteristík⁷. Okrem uvedených mikroorganizmov ako producentov taxánov je už známych viacero ďalších, ktorých prehľad obsahuje tab. IV.

4. Záver

Rastliny produkujú široké spektrum chemických látok, ktoré majú veľký ekonomický význam. Známym je takmer sto tisíc zlúčenín rastlinného pôvodu, pričom najväčšiu skupinu tvoria terpenoidy zahŕňajúc viac ako jednu tretinu všetkých poznaných látok. Najúspešnejšie prírodné liečivá s protinádorovým účinkom posledných rokov sú rastlinné fytochemikálie paclitaxel a kamptotecín. Objemovo produkcia týchto rastlinných látok pre farmaceutický priemysel je nízka. Ide o kilogramové až sto kilogramové množstvá. Cena týchto produktov nie je stála, závisí od rôznych činiteľov, ako sú klimatické i pestovateľské podmienky a je veľmi vysoká. To vedie k zvýšenému záujmu vyvíjať biotechnologické procesy pre priemyselnú produkciu týchto liečiv. Existujú viaceré možnosti pre biotechnologickú produkciu konkrétne explantátové kultúry rastlín, transgénne mikroorganizmy a endofytické a epifytické mikroorganizmy. Možnosť riešiť produkciu bioaktívnych látok rastlín mikroorganizmami je zvlášť perspektívna, nakoľko kultivácia mikroorganizmov je jednoduchšia a výhodnejšia v porovnaní s pestovaním vyšších rastlín, resp. s využitím explantátových kultúr alebo chemickej semisyntézy, ktorá zatiaľ dominuje v priemyselnom merítku.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci projektu Zmluvy č. APVV-20-014105 a Grantovou agentúrou VEGA 1/0747/08.

LITERATÚRA

1. Yuan H., Miao J., Du Y., You J., Hu F., Zeng S.: Int. J. Pharm. 348, 137 (2008).
2. Singla A. K., Garg A., Aggar W.: Int. J. Pharm. 235, 179 (2001).
3. Tabata H.: Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 7, 1 (2004).
4. Theodoridis G., Laskaris G., Jong C. F., Hofte A. P. J., Verpoorte R.: J. Chromatogr. 802, 297 (1998).
5. Ramesh N. P.: Ann. Rev. Microbiol. 98, 361 (1998).
6. Estes R., Vogel N., Mack D., McLeod R.: Antimicrob. Agents Chemother. 8, 2036 (1998).
7. Li J., Stobel G., Sidhu R., Hess W. M., Ford E. J.: Microbiology 142, 2223 (1996).
8. Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
9. Nicoletti M. I., Colombo T., Rossi C., Monardo C., Stura S., Zucchetti M., Riva A., Morazzoni P., Donati M. B., Bombardeli E., D'incalci M., Giavazzi R.: Cancer Res. 60, 842 (2000).
10. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: Drugs 59, 621 (2000).
11. Miller V. A., Kris M. G.: Semin. Oncol. 27, 3 (2000).
12. Yang L. X., Wang H. J., Holton R. A.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 46, 159 (2000).
13. Bajorin D. F.: Oncology 14, 43 (2000).
14. <http://www.bristol-myers-squibb.cz>, stiahnuté 8.2.2008.
15. Vadgama J. V., Wu Y., Shen D., Hsia S., Block J.: Anticancer. Res. 20, 1391 (2000).
16. Küpeli E., Erdemoglu N., Yesilada E., Sener B.: J. Ethnopharmacol. 89, 265 (2003).
17. Fuchs D. A., Johnson, R. K.: Cancer Treat. Rep. 62, 1219 (1978).
18. Kingston D. G. I.: J. Nat. Prod. 63, 726 (2000).
19. Wang M., Cornett B., Nettles J., Liotta D. C., Snyder J. P.: J. Org. Chem. 65, 1059 (2000).
20. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of The Cells*. New York & London, Garland Publishing, Inc. 1983.
21. Sharma S., Ganesh T., Kingston D. G. I., Bane S.: Anal. Biochem. 360, 56 (2007).
22. Shimoda K., Hamada H., Hamada H.: Tetrahedron Lett. 49, 601 (2008).
23. Shaffer S. A., Baker-Lee C., Kennedy J., Shun Lai M., de Vries P., Buhler K., Singer J. W.: Cancer Chemother. Pharmacol. 59, 37 (2007).
24. Ojima I., Das M.: J. Nat. Prod. 72, 554 (2009).
25. Ojima I., Chen J., Sun L., Borella C. P., Wang T., Miller M. L., Lin S., Geng X., Kuznetsova L., Qu C., Gallager D., Zhao X., Zanardi I., Xia S., Horwitz S. B., Mallen-St Clair J., Guerriero J. L., Bar-Sagi D., Veith J. M., Pera P., Bernacki R. J.: J. Med. Chem. 51, 3203 (2008).

26. Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J.: *J. Controlled Release* 136, 21 (2009).
27. Guo W., Johnson J. L., Khan S., Ahmad A., Ahmad I.: *Anal. Biochem.* 336, 213 (2005).
28. Shikanov A., Vaisman B., Shikanov S., Domb A. J.: *J. Biomed. Mater. Res. A*, v tisku. DOI: 10.1002/jbm.a.32429 (2009).
29. Jennewein S., Wildung M. R., Chau M., Walker K., Croteau R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9149 (2004).
30. Croteau R., Ketchum R. E. B., Long R. M., Wildung K. R., Wildung M. R.: *Phytochem. Rev.* 5, 75 (2006).
31. Williams D. C., Wildung M. R., Jin A. Q., Dalal D., Oliver J. S., Coates R. M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 137 (2000).
32. Chau M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 427, 48 (2004).
33. Fang J., Ewald D.: *Protein Expression Purif.* 35, 17 (2004).
34. Nims E., Dubois C. P., Roberts S. C., Walker E. L.: *Metab. Eng.* 8, 385 (2006).
35. Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. S., Hess W. M.: *Microbiology* 142, 435 (1996).
36. van Rozendaal E. L., Lelyveld G. P., van Beck T. A.: *Phytochemistry* 53, 383 (2000).
37. Bala S., Uniyal G. C., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V., Kulshrestha M., Sharma R. P., Jain S. P., Kukreja A. K., Kumar S.: *J. Chromatogr.* 858, 239 (1999).
38. Zaks A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 130 (2001).
39. Shen Y., Lo K. L., Lin C. L., Chakraborty R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 4493 (2003).
40. Ketchum R. E. B., Croteau R.: *Biotechnol. Bioeng.* 62, 97 (1998).
41. Ganesh T., Norris A., Sharma S., Bane S., Alcaraz A. A., Snyder J. P., Kingston D. G. I.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3447 (2006).
42. Fett-Neto A. G., Zhang W. Y., DiCosmo F.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 966 (1994).
43. Zhong J. J.: *J. Biosci. Bioeng.* 94, 591 (2002).
44. Stierle A., Strobel G., Stierle D.: *Science* 260, 214 (1993).
45. Noh M. J., Yang J. G., Kim K. S., Yoon Y. M., Kang K. A., Shim S. B., Park H. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 64, 620 (1999).
46. Strobel G., Daisy B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 491.
47. Guo B. H., Kai G. Y., Jin H. B., Tang K. X.: *Afr. J. Biotechnol.* 5, 15 (2006).
48. Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y., Xu-Dong Z.: *Chin. J. Biotechnol.* 22, 1 (2006).
49. Miao Z., Wang Y., Yu X., Guo B., Tang K.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 45, 92 (2009).
50. Li Y. C., Tao W. Y., Cheng L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 233 (2009).
51. Gangadevi V., Muthumary J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 52, 9 (2009).
52. Zhao K., Ping W., Zhang L., Liu J., Lin Y., Jin T., Zhou D.: *Sci. China C. Life Sci.* 51, 222 (2008).
53. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Biosci. Bioeng.* 106, 103 (2008).
54. Chakravarthi B. V., Das P., Surendranath K., Karande A. A., Jayabaskaran C.: *J. Biosci.* 33, 259 (2008).
55. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Microbiol.* 47, 40 (2009).
56. Gangadevi V., Muthumary J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 52, 2 (2009).
57. Gangadevi V., Murugan M., Muthumary J.: *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 24, 1433 (2008).
58. Sun D., Ran X., Wang J.: *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 48, 589 (2008).

M. Maruna, M. Šturdíková, and P. Ondrejčíková
(Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava): **Natural Anticancer Taxane Compounds**

Paclitaxel is a valuable plant drug produced by *Taxus* species, showing anticancer activity in various cancer types. Its action consists in preventing depolymerization of tubulin in cell division. Unfortunately, its isolation from the bark of slow-growing yew trees is limited. Although paclitaxel has been totally synthesized, its production currently depends, completely or in part, on supply of *Taxus* sp. Plant cell cultures, endophytic and epiphytic microorganisms as well as chemical and biotechnological synthesis are currently investigated for the production of taxanes (paclitaxel and docetaxel).

MORFOLOGIE, CHEMICKÁ STRUKTURA, VLASTNOSTI A MOŽNOST VYUŽITÍ PŠENIČNÉHO B-ŠKROBU

EVŽEN ŠÁRKA a ZDENĚK BUBNÍK

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
evzen.sarka@vscht.cz

Došlo 28.4.09, přijato 9.7.09.

Klíčová slova: B-škrob, amylosa, amylopektin, škrobová zrna, mazovatění, hydrolýza

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení velikosti škrobových zrn
3. Měrný povrch
4. Obsah amylosy, chemická struktura a ultrastruktura amylopektinu
5. Dopad struktury amylopektinu na vnitřní uspořádání škrobových zrn
6. Lipidové komplexy
7. Krystalinita
8. Parametry mazovatění
9. B-škrob v průmyslové výrobě
 - 9.1. Jemnozrnný škrob jako produkt
 - 9.2. Průmyslová hydrolýza jemnozrnného škrobu
 - 9.3. Možnost chemické modifikace jemnozrnného škrobu

10. Aplikační možnosti jemnozrnného škrobu (vedlejšího produktu)

10.1. Potravinářské a krmivářské využití jemnozrnného škrobu

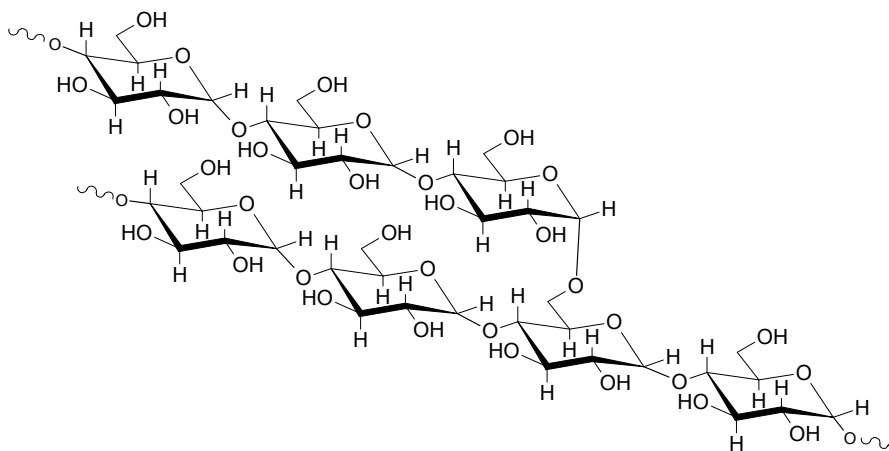
10.2. Další aplikace jemnozrnného škrobu

1. Úvod

Škrob patří mezi fyziologicky a hospodářsky nejdůležitější polysacharidy. Ukládá se v zásobních orgánech rostlin (např. hlízách brambor nebo v semenech kukuřice, pšenice a rýže) ve formě škrobových zrn, která se nerozpouštějí ve studené vodě. Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany – lineární amylosa s α -(1→4) glykosidovými vazbami a větvený amylopektin, obsahující α -(1→4) a α -(1→6) vazby, kromě toho škrobová zrna obsahují i menší množství dalších složek jako jsou lipidy a proteiny.

Cereální škroby, konkrétně pšenice, ječmen, žito a tritikale, mají ve srovnání s hlízovými škroby dva odlišné typy škrobových zrn – větší zrna, označovaná též jako A-škrob, a menší zrna B-škrobu. Tato zrna se liší chemickým složením, ultrastrukturou amylopektinu, způsobem jeho uložení ve škrobovém zrnu a dalšími z toho vyplývajícími vlastnostmi.

Při zpracování pšeničné mouky na škrob se dvě velikostní skupiny škrobových zrn při rafinaci oddělují, takže výsledným produktem je komerční škrob s hlavní frakcí zrn 10–40 μ m a vedlejší produkt s menšími škrobovými zrny. Jeho využitelnost je dosud omezená a hledají se proto další možnosti jeho použití. Podkladem pro možné aplikace jsou znalosti o chemickém složení, struktuře a dalších vlastnostech tohoto produktu.



Obr. 1. Amylopektin

V úvodu bych si dovil malou poznámku, týkající se symboliky. Historicky existuje označování škrobu jako A a B (event. C) podle velikosti škrobových zrn a s ní související kvalitou (s rozdílným obsahem lipidů a proteinů). Řetězce amylopektinu, charakterizující jeho rozvětvení, jsou v literatuře označovány rovněž jako A, B a C, což s předchozím označením nemá žádnou souvislost. Navíc i krystalinita má podobné označení – polymorfní formy jsou značeny jako A, B, C, event. V. Text článku je koncipován tak, aby při zachování zavedené tradiční symboliky nedošlo k záměně.

2. Rozdělení velikosti škrobových zrn

Jak již bylo zmíněno, velikost zrn pšeničného škrobu souvisí s jeho chemickým složením, které následně může ovlivňovat jeho funkční vlastnosti.

Ke sledování velikosti částic lze využít řadu metod např. optickou nebo elektronovou mikroskopii¹, příp. i doplněnou vyhodnocením metodou analýzy obrazu², sedimentační metody³, metodu laserové difrakce⁴, měření měrného povrchu⁵ ad.

Podle Leeba a Schumanna⁶ jsou zrna pšeničného A-škrobu čočkovitého tvaru s příčnou vzdáleností 20–30 μm . Menší B-zrna jsou kulovitá a mají průměr 2–8 μm . Fotografie skenového elektronového mikroskopu ukázaly, že pšeničný škrob má větší podíl menších zrn než je tomu u tritikale nebo ječmene⁷. Rozměr zrn pšeničného B-škrobu závisí na tvrdosti pšeničného zrna, která je důležitým parametrem při prodeji a nákupu pšenice. Některé měkké pšenice mají škrobová zrna B-škrobu i o velikosti nad 10 μm (cit.⁸). Někdy je B-škrob ještě dále dělen na dvě skupiny: menší zrna o průměru pod 2,8 μm (C-škrob) a středně velká zrna o průměru 2,8–9,9 μm (cit.⁹).

3. Měrný povrch

Pro řadu aplikací je důležitější veličinou než velikost částic měrný povrch, který určuje přenos energie i hmoty. Stanovuje se např. metodou BET, která používá pro své měření adsorpční izotermu dusíku⁵. Měrný povrch je úzce spjat s velikostí částic a jejich hustotou. Pro A- a B-škrobová zrna se vzhledem k jejich velikosti pochopitelně liší. Je definován:

$$s_{\text{sp}} = \Sigma S_i / m \quad (1)$$

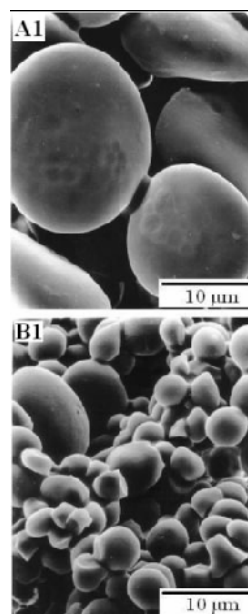
kde ΣS_i je součet povrchu jednotlivých částic a m je jejich celková hmotnost. Rovnici (1) lze dále pro homogenní částice upravit:

$$s_{\text{sp}} = \Sigma S_i / (\rho_s \cdot \Sigma V_i) \quad (2)$$

kde ΣV_i je součet objemů jednotlivých částic.

Pokud by šlo o monodisperzní systém a předpokládali bychom kulovité částice, pak:

$$s_{\text{sp}} = \frac{\pi d_s^2}{\rho_s \cdot \frac{\pi}{6} \cdot d_s^3} = \frac{6}{\rho_s \cdot d_s} \quad (3)$$



Obr. 2. Fotografie skenového elektronového mikroskopu nativního pšeničného škrobu podle Van Hunga a Mority¹²

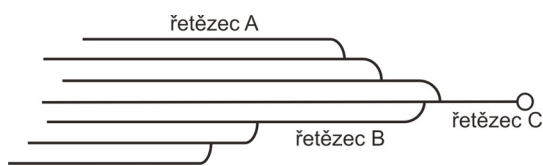
kde d_s označuje průměr částice, ρ_s – hustota částice. Pokud bychom dále uvažovali velikost škrobového zrna 20 μm , hustotu škrobu 1600 kg m^{-3} , vyšel by podle rovnice (3) měrný mezifázový povrch 188 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$. Pro průměr zrna 5 μm podobnou kalkulací vychází 750 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$.

Tento přibližný propočet je ve velmi dobré shodě (zvláště pro kulovitá zrna B-škrobu) s naměřenými údaji Morrisona¹¹ pro specifický povrch zrn A-škrobu 240 až 280 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ a pro B-škrob 700–760 $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$. To potvrzuje, že škrobová zrna mají hladký, téměř neporézní povrch, podle fotografií elektronového mikroskopu jen s občasnými dutinami (viz obr. 2).

4. Obsah amylosy, chemická struktura a ultrastruktura amylopektinu

Obsah amylosy (jde o podíl amylosy v celkovém obsahu škrobu), může být stanoven několika způsoby. Tzv. zdánlivý obsah amylosy se stanovuje měřením jodové afinity škrobů zbavených lipidů pomocí dimethylsulfoxidu s využitím potenciometrického autotitrátoru¹³. Tzv. absolutní obsah amylosy se určí metodou Takedy a spol.¹⁴ odečtením afinity jodu amylopektinu od hodnoty afinity celkového škrobu zbaveného lipidů. Jinou možností stanovení amylosy je použití enzymových setů^{15–17}.

Údaje o obsahu amylosy pro zrna B-škrobu se u různých autorů liší. Podle Eliassona¹⁸ mají tato zrna nižší obsah amylosy než je tomu u zrn A-škrobu; podobně Ao a Jane⁷ zjistili absolutní obsah amylosy u zrn A-škrobu ve výši 30,9 %, zatímco B-zrna dosahovala hodnoty 25,5 %. Salman a spol.¹⁹ ale naopak žádné významné rozdíly



Obr. 3. Schématická struktura amylopektinu

v obsahu amylosy pro různé typy škrobových zrn ani kolorimetricky ani enzymově neprokázali.

V běžně užívané nomenklatuře větvení amylopektinu podle Peata a spol.²⁰ jsou A-řetězce amylopektinu definovány jako nerozvětvené, na rozdíl od B-řetězců, na které jsou vazbou α -(1→6) navázány další A nebo B-řetězce. Makromolekula také obsahuje C-řetězec, který nese jedinou koncovou redukující skupinu. U amylopektinu krátké řetězce vytvářejí shluky (klastry), jednotky těchto klastrů jsou vzájemně propojeny delšími řetězci²¹. Zjednodušeně ukazuje toto uspořádání obr. 3, rovné linie zde představují glykosidové vazby α -(1→4) a rozvětvení vazby α -(1→6).

Při hledání struktury amylopektinu se nejprve oddělí jednotlivé řetězce isoamylasou. Délka řetězců amylopektinu je následně analyzována metodou Wonga a Jane²² vysokorychlostní aniontovou kapalinovou chromatografií vybavenou on-line amyloglukosidasovým reaktorem s pulsní amperometrickou detekcí (HPAEC-ENZ-PAD).

Podle Ao a Jane⁷ mají zrna pšeničného B-škrobu kratší řetězce (řetězce A a B₁ o polymeračním stupni (DP) 6 až 12 glukosových jednotek – 25,2 %, o DP 13–24, 46,8 %), a ne tak dlouhé řetězce B₂ (DP > 37) jak je tomu u A-škrobu (DP 6–12, 21,8 % a DP 13–24, 43,3 %). Pšeničný B-škrob se skládá z rozvětvenějších řetězců o DP 6–25 a obsahuje jen malý podíl řetězců o DP ≥ 26. Tedy A-škrob obsahuje více řetězců B₂, ale méně krátkých řetězců A a B₁, než B-škrob.

Podobně i Salman a spol.¹⁹ zjistili, že poměr řetězců s DP 6–12 je nižší u A-škrobu než u B-škrobu, zatímco střední a dlouhé řetězce jsou hojnější u zrn A-škrobu. Také Sahlström a spol.²⁴ konstatují, že malé částice obsahují větší podíl nejkratších amylopektinových řetězců (DP < 8).

Oproti tomu podle Vermeylena a spol.²⁷ krátké a středně dlouhé řetězce s DP 8–24 jsou častější ve frakcích malých částic, zatímco velmi krátké (DP < 8) a dlouhé (DP 25–60) řetězce byly více zastoupeny u velkých částic. To je v souladu s předchozím zjištěním Tanga a spol.²⁵.

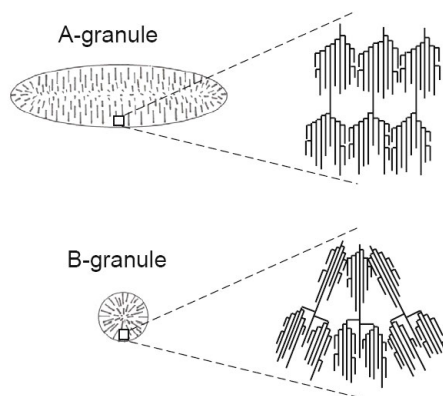
V oblasti neredukujících konců a ve střední části řetězců amylopektinu se tvoří antiparalelní dvojité šroubovice s uspořádanou (krystalovou) třírozměrnou strukturou²⁶. Podle Vermeylena a spol.²⁷ jsou tyto dvojité šroubovice spojené s kostrou amylopektinu kratší u malých škrobových zrn.

5. Dopad struktury amylopektinu na vnitřní uspořádání škrobových zrn

Předpokládá se, že zrna A a B-škrobu mají ve vnitřní struktuře jinak uspořádanou amylosu a amylopektin. Výzkum optických map ukázal, že u čočkovitých zrn A-škrobu tritikale, pšenice a ječmene jsou molekuly amylopektinu orientovány kolmo na osovou rovinu škrobového zrna a jsou uspořádány rovnoběžně²⁸. Molekuly amylopektinu, které obsahují více řetězců B₂, ale méně kratších řetězců A a B₁, jsou válcovitého tvaru, což umožňuje jejich snadnější uspořádání do rovnoběžného uspořádání v čočkovitém škrobovém zrně (obr. 4). Toto uspořádání má i za následek vytvoření rýhy na okraji osově roviny.

Na druhé straně amylopektin u B-škrobu, u kterého můžeme předpokládat větší podíl krátkých řetězců (řetězce A a B₁) a menším podíl řetězců B₂, má kónický tvar, který může být snadno zařazen do kulovitého škrobového zrna.

Paralelní uspořádání válcovitých molekul amylopektinu u A-škrobu by mohlo vysvětlovat vyšší podíl krystalinity než je tomu u kónicky tvarovaného amylopektinu u zrn B-škrobu⁷.

Obr. 4. Struktura škrobového zrna A- a B-škrobu a molekulární struktura podle Ao a Jane⁷, zveřejněno se souhlasem Jane

Podle Jane²⁹ kulovité částice B-škrobu, vázané pomocí proteinů a různých polysacharidů, obsahují mimo to uvnitř škrobového zrna propojené dutiny se značnou porózitou.

6. Lipidové komplexy

Zrna B-škrobu obsahují více lipidů než je tomu u A-škrobu. Lipidy vytvářejí šroubovicové komplexy s amylosou, čímž brání nabobtnání. Jde většinou o monoacyl-lysofosfolipidy³⁰.

Podle Eliassona¹⁸ je nejvýznamnější rozdíl mezi zrny A a B-škrobu v mnohem vyšší entalpii, která je způsobena

amyloso-lipidovými komplexy B-zrn. Obecně platí, že všechny nevoskové (non-waxy) cereální škroby obsahují lipidy přibližně úměrně obsahu amylosy³². Ale zrna A-škrobu *Triticaceae* obsahují více amylosy než B-zrna, a přesto menší částice obsahují více lipidů³³.

7. Krystalinita

Škrobová zrna jsou částečně krystalická a skládají se z uspořádaných oblastí, které obsahují dvojité šroubovice vytvořené z řetězců amylopektinu a z neuspořádaných amorfních oblastí. Dvojité šroubovice, které vznikají vytvořením vodíkových můstků mezi některými hydroxylovými skupinami koncových řetězců amylopektinu, se podílejí na tvorbě krystalinity škrobových zrn³⁴.

Informace o krystalinitě se získává sledováním difrakčních obrazců rentgenového záření.

Amylosa ve škrobových zrnech je amorfní, a tak zrna B-škrobu vykazují vyšší krystalinitu (35,5 %) než zrna A-škrobu (32,4 %). Běžné škroby vykazují nižší krystalinitu než škroby získané z voskových (waxy) odrůd¹.

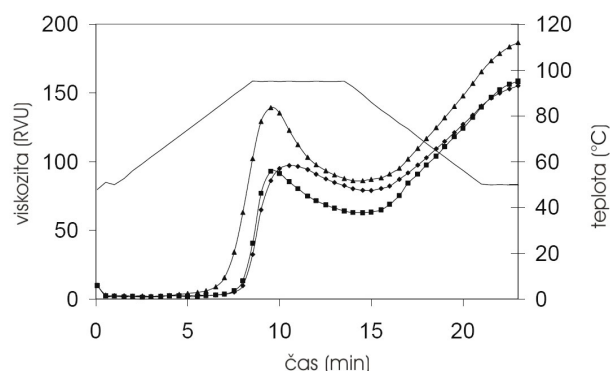
Krystalická forma A se vyskytuje u cereálních škrobů. Umístění charakteristických difrakčních píků formy A nezávisí na velikosti částic, což svědčí o rovnoměrné hustotě jednotlivých krystalitů v různých škrobových frakcích. U pšeničných škrobů se zjišťuje sekundární krystalinita formy B, která schází u malých škrobových zrn. Některé enzymy štěpící škrob jsou specificky sdruženy s velkými škrobovými zrny a scházejí ve frakcích malých škrobových zrn. Podle Vermeylena a spol.²⁷ jsou tyto enzymy snad biochemickým klíčem ke krystalinitě B velkých čočkovitých zrn.

8. Parametry mazovatění

Moderní metodou pozorování tepelných vlastností nativních a retrogradovaných škrobů je diferenční skenovací kalorimetrie. Klasickou metodou je sledování průběhu viskozity suspenze. V obou případech je suspenze škrobu zahřívána s konstantním gradientem teploty na čas.

Pokud jde o parametry mazovatění nativních škrobů Van Hung a Morita³⁵ a podobně Vermeylen a spol.²⁷ zjistili, že počáteční teploty u zrn A- a B-škrobu jsou podobné, zatímco vrcholová teplota (ve středu teplot mazovatění) a koncová teplota jsou u zrn A-škrobu významně nižší než u B-škrobu. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozím výzkumem^{36–38}. Někteří autoři však došli k odlišnému závěru; Seib³⁹ uvádí, že škrobová zrna A-škrobu mají vyšší počáteční teplotu mazovatění a nižší vrcholovou a koncovou teplotu mazovatění v porovnání s B-škrobem; Ghi-asi a spol.⁴⁰ sdělují, že obě skupiny škrobových zrn mají podobné režimy mazovatění.

V průběhu mazovatění zrna A-škrobu nabobtnávají přednostně v osově rovině, takže se zakřívují a ohýbají do charakteristického tvaru. Toto chování je společné všem



Obr. 5. Viskozitní profil pšeničného škrobu podle Ao a Jane⁷; ■ pšeničný škrob celkově, ▲ A-škrob, + B-škrob, — teplota

škrobovým zrnům typu A, ale nedochází k němu u zrn B-škrobu pšenice, ječmene, rýže a tritikale nebo u luštěninových, kořenových a hlízových škrobů¹¹.

Viskozitní křivky pšeničného škrobu ukazuje obr. 5. Viskozitní křivka zrn A-škrobu má vyšší vrchol – vyšší konečnou viskozitu i vyšší viskozitu při udržované konstantní teplotě, než je tomu u B-škrobu. Viskozita při ochlazování disperze A-škrobu, která odpovídá tvorbě sítí, je v porovnání s viskozitou B-škrobu rovněž vyšší. To může být vysvětleno tím, že A-škrob obsahuje více amylosy a více dlouhých řetězců amylopektinu než B-škrob⁷.

9. B-škrob v průmyslové výrobě

9.1. Jemnozrnný škrob jako produkt

Jak již bylo uvedeno, při průmyslové výrobě škrobu jsou škrobová zrna rozdělena na dvě kategorie – komerční škrob první jakosti (obsahující převážně A-škrob) a vedlejší produkt, obsahující především B-škrob. V některých učebnicích nebo ve firemní literatuře týkající se výroby škrobu se lze setkat i se zjednodušeným označením těchto produktů jako A-, B-škrob, případně ještě A-Plus nebo A-Minus škrob^{56–58}.

Důvod separace zrn A- a B-škrobu je dvojitý:

- jednak nelze jemnozrnný škrob jednoduše předsušit filtrací na vakuovém filtru (malá zrna způsobují velký odpor filtračního koláče),
- kromě toho, jak již bylo zmíněno, B-škrob má horší jakost – vyšší obsah proteinů (asi 1,1 %, cit.⁴¹), a rovněž vyšší obsah lipidů a pentosanů⁴².

Množství jemnozrnného škrobu jako vedlejšího produktu bývá v pšeničných škrobárnách ČR asi 10 % vyrobeného jakostního pšeničného škrobu.

Ve skutečnosti je podíl malých zrn v poměru ke komerčnímu produktu vyšší – např. Meusser a spol.⁴³ uvádějí hodnotu 27 % A-produktu. To je ve shodě s měřením Raeckera a spol.⁹, kteří zjistili objemové rozdělení zrn

v rozmezí 9,7–15,2 % pro zrna o průměru pod 2,8 μm , 13,4–27,9 % pro střední zrna o průměru 2,8–9,9 μm a 57,9–76,9 % pro velká zrna o průměru nad 9,9 μm .

Vysvětlení pro tento významný rozdíl není pouze jediné, ale hraje zde roli současné působení několika faktorů:

- dřívější separační technologie nedokázaly dosáhnout vysoké výtěžnosti (i malých částic),
- již dnes využívaná možnost převedení části zrn B-škrobu do komerčního produktu, resp. meziproduktu (viz dále),
- část malých škrobových částic odchází kromě do vedlejšího produktu i do jiných proudů výrobního schématu, jejichž konečným produktem jsou pentosany, odpadní voda apod.

Podle Zwitserloota⁴⁴ lze při úpravě technologie při separaci suspenzí a následné enzymové hydrolýze dosáhnout výtěžnosti škrobu z mouky 70 % a pouze 5 % jemnozrnného škrobu, tedy snížit podíl jemnozrnného škrobu na 7 % vyrobeného potravinářského škrobu.

9.2. Průmyslová hydrolýza jemnozrnného škrobu

V současnosti jsou ve světě jedním z hlavních výrobců ze škrobu škrobové hydrolyzáty (maltodextriny, glukosové, maltosové a glukoso-fruktosové sirupy). Při hydrolýze dochází působením minerální kyseliny nebo častěji pomocí enzymového zpracování ke zkrácení řetězců amylosy a amylopektinu, výsledkem štěpení je celá řada oligosacharidů (především maltosy) a glukosy. Při výrobě glukoso-fruktosových sirupů se cíleně za katalýzy glukosoisomerasou část glukosy isomerizuje na fruktosu.

Přestože již je provozně odzkoušeno využití určitého podílu menších částic k tomuto procesu, názory v odborných článcích se liší.

Yonemoto a spol.⁴⁵ uvádějí, že i přes vyšší krystalinitu jsou malé částice ochotnější k enzymové hydrolýze než ty velké, což vysvětluje jejich větším povrchem. Tyto výsledky byly potvrzeny Maneliem a spol.⁴⁶ Dextriny, které se uvolňují během hydrolýzy ze zrn B-škrobu, obsahují více lineárních řetězců a mají v průměru kratší délku, než odpovídající řetězce ze zrn A-škrobu.

Naopak Sakintuna a spol.⁴⁷ zjistili, že větší škrobová zrna (> 30 μm) jsou ochotnější k hydrolýze než menší (< 10 μm).

Robins a spol.⁴⁸ navrhli modifikaci enzymového procesu. pH suspenze jemnozrnného škrobu, která vznikne po separaci na filtračních odstředivkách, se upraví na 6,5–6,9 a přidá se α -amylasa. Poté se škrob zahřeje na 95 °C v paroproudém zahříváči a čerpá se do dvou nádrží (koagulačních tanků) s dobou zdržení 5 hodin. Vysoká teplota způsobí nabobtnání a puknutí zrn škrobu, což umožní α -amylase rozštěpit škrob do kratších řetězců. Kromě toho vyvolá koagulaci rozpustných bílkovin, které se později oddělí.

Následná filtrace, jak klasická, tak na ionexech, se zdá být hlavním problematickým bodem využití B-škrobu při enzymové hydrolýze. Kromě již uvedených proteinů

dochází k uvolňování tuků z amylaso-lipidových komplexů. Důsledkem mohou být zakalené sirupy, snížení filtrační rychlosti, zhoršení výtěžnosti³² a je potřeba počítat s vyšší spotřebou pomocného materiálu.

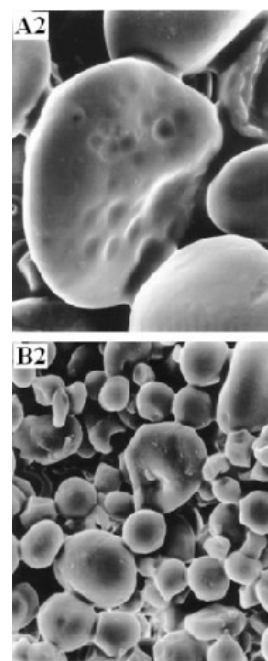
9.3. Možnost chemické modifikace jemnozrnného škrobu

Chemická modifikace škrobu se většinou provádí pod teplotou mazovatění, tedy při zachování struktury původních škrobových zrn. Toto řešení je výhodné pro separaci a další zpracování suspenze po proběhnuté reakci. Tudiž struktura zrna velmi ovlivňuje složení škrobového derivátu. Chemická činidla pronikají s různou účinností povrchem nebo kanálky dovnitř škrobových zrn. Zpravidla jsou amorfni části zrn substituovány snadněji než krystalické oblasti, přesto lze na škrobová zrna působit rozličnými technikami v závislosti na jejich architektuře, typu krystalové struktury, obsahu amylosy a přítomnosti minoritních složek.

Amylosa má sklon být substituována do vyššího stupně než amylopektin, který je přednostně substituován v rozvětvených oblastech²¹.

Jemnozrnný škrob má výhodné vlastnosti pro modifikace, kde výsledným produktem jsou škroby přizpůsobené individuálním potřebám, např. pro speciální papíry.

Větší škrobová zrna mají vyšší reaktivitu s acetanhydridem než malá. Pasty fosforylovaných zesítěných škrobů z malých částic jsou stabilnější než z velkých, zatímco pasty z acetylovaného škrobu a acetylovaného



Obr. 6. Fotografie skenového elektronového mikroskopu fosforylovaného a zesítěného A a B pšeničného škrobu podle Van Hunga a Mority¹²

zesíteného škrobu z malých a velkých částic mají podobnou odolnost vůči zmrazení a rozmrazení. Skenová elektronová mikroskopie ukazuje, že část zrn je zasažena povrchovou erozí způsobenou procesem chemické modifikace (obr. 6). Povrchy velkých zrn vykazují větší poškození po modifikaci než malá zrna. Důsledkem je, že zrna různé velikosti mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti modifikovaného škrobu¹².

Bae a spol.⁵⁰ se zabývali fyzikálními vlastnostmi extrudovaných vláken hydroxypropylovaných normálních a vysoce amylosových škrobů. Substituce zvětšila prodloužení a pružnost extrudátů. Hydroxypropylované škroby a hydroxypropylované a současně zesítené škroby z A zrn byly více substituované než z B zrn⁵¹.

10. Aplikační možnosti jemnozrnného škrobu (vedlejšího produktu)

10.1. Potravinářské a krmivářské využití jemnozrnného škrobu

Klasicky se tento nesusušený vedlejší produkt používá jako surovina pro výrobu lihu, přísad do krmiv pro dobytek nebo se aplikuje jako náhražka mléka v krmivech pro telata.

Byly hledány možnosti, zda lze jemnozrnný škrob vzhledem ke své granulometrii a chemickému složení použít i k dalšímu potravinářskému zpracování. Bylo zjištěno, že malá a větší škrobová zrna pšenice a ječmene vykazují rozdílné chování při vaření piva⁵², pečení^{24,51,53} a extruzi⁵¹. Velmi malé částice způsobují zeslabení těsta, více zastoupená zrna ovlivňují tvar první části farinografické křivky, způsobují tak delší dobu vývinu těsta, větší stabilitu, delší dobu maximálního nárůstu a vyšší číslo kvality. Čím vyšší je obsah velkých škrobových zrn (> 16 μm), tím menší je změknutí těsta a farinografická plocha. Čím větší je průměrná hodnota velikosti zrn, tím delší je doba maximálního nárůstu a menší zeslabení těsta; čím větší je nejčastěji zastoupený rozměr zrna, tím menší je stupeň zeslabení těsta a farinografická plocha⁵⁴.

Zhao a Whistler⁵⁵ referují o nosičích ochucovadel vyrobených z kulovitých agregátů škrobových zrn, tímto způsobem by tedy bylo možné v omezeném množství jemnozrnný pšeničný škrob využívat.

10.2. Další aplikace jemnozrnného škrobu

V současné době se jemnozrnný škrob používá jako pojivo ve slévárenství a k výrobě vlnitých lepenek⁴⁴.

Poměrně nová aplikace jemnozrnného škrobu je k výrobě biodegradabilních plastů. Obnovitelné materiály přitahují pozornost ze dvou hlavních důvodů: jednak ekologického a dále vzhledem k tomu, že zdroje ropy jsou časově omezené³¹. Výhodou škrobu je, že je obnovitelný, biodegradovatelný, snadno dostupný a relativně levný.

Výhodu jemnozrnného škrobu lze předpokládat

v tom, že menší zrna se v plastu lépe dispergují a jsou přístupnější pro mikroorganismy¹⁰. Tato hypotéza vychází z výzkumu Ahameda⁴⁹, který používal škrob z rostlin *Chenopodium quinoa* a *Amaranthus paniculatus* jako plnivo LDPE. Granule škrobu tohoto původu (menší než 1 μm) tvoří např. ve srovnání s kukuřičným škrobem v daném filmu lepší disperze, což vede k vyššímu sklonu k pozdější degradaci.

Bylo rovněž zjištěno, že škrobová zrna menší velikosti zlepšují tažné vlastnosti polyethylenových filmů plněných škrobem. Speciální jemné frakce pšeničného škrobu by měly vytvářet podstatně tenčí filmy, než použije-li se kukuřičný škrob²³.

Přehledný článek byl zpracován v rámci řešení grantového projektu GA ČR 525/09/0607 „Biodegradabilní kompozitní materiály na bázi B-škrobu s upotřebením v zemědělství.“

LITERATURA

1. Becker A., Hill S. E., Mitchell J. R.: *Starch/Stärke* 53, 121 (2001).
2. Šárka E., Bubník Z.: *Starch/Stärke* 61, 457 (2009).
3. Farmakis L., Sakellarakis J., Koliadima A., Gavril D., Karaïskakis G.: *Starch/Stärke* 52, 275 (2000).
4. Park S. H., Wilson J. D., Seabourn B. W.: *J. Cereal Sci.* 49, 98 (2009).
5. Otsuka M., Hasegawa H., Matsuda Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 45, 894 (1997).
6. Leeb C. V., Schumann H. P., v knize *Product Design and Engineering. Best Practices. Volume 2, Rawmaterials, Additives and Applications* (Bröckel U., Meier W., Wagner G., ed.), kap. Starch and starch-based products. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
7. Ao Z., Jane J.-L.: *Carbohydr. Polym.* 67, 46 (2007).
8. Bechtel D. B., Zayas I., Dempster R., Wilson J. D.: *Cereal Chem.* 70, 238 (1993).
9. Raeker M. O., Gaines C. S., Finney P. L., Donelson T.: *Cereal Chem.* 75, 721 (1998).
10. Kupec J., Charvátová K., Křesálková M.: *Chem. Listy* 97, 155 (2003).
11. Morrison W. R., v knize *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Uniqueness of wheat starch. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
12. Van Hung P., Morita N.: *Starch/Stärke* 57, 413 (2005).
13. Yoo S.-H., Jane J.-L.: *Carbohydr. Polym.* 49, 297 (2002).
14. Takeda C., Takeda Y., Hizukuri S.: *Cereal Chem.* 60, 212 (1983).
15. Stawski D.: *Food Chem.* 110, 777 (2008).
16. Jones A., Urban J., Copikova J.: *Biol. Plant.* 42, 303 (1999).
17. Šimková D., Papoušková L.: Enzymatic determination

- of amylose/amylopectin content in samples of winter wheat and in starch of potato varieties for industry utilisation. *Sborník 4. konference Polysacharidy/ Polysaccharides (CD-ROM), ČSCH, Praha, 13.-14.11.2008*.
18. Eliasson A.-C., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Characterisation of wheat starch and gluten as related to end-use properties. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 19. Salman H., Blazek J., Lopez-Rubio A., Gilbert E., Hanley T., Copeland L.: *Carbohydr. Polym.* 75, 420 (2009).
 20. Peat S., Whelan W. J., Thomas G. J.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1952, 4546.
 21. Bertoft E., v knize: *Starch in Food: Structure, Function and Applications*. (Eliasson A.-C., ed.) kap. Analysing starch structure. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004.
 22. Wong K. S., Jane J.-L.: *J. Liq. Chromatography* 20, 297 (1997).
 23. Griffin G. J. L., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Wheat starch in the formulation of degradable plastics. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 24. Sahlström S., Bævre A. B., Bråthen E.: *J. Cereal Sci.* 37, 285 (2003).
 25. Tang H., Ando H., Watanabe K., Takeda Y., Mitsunaga T.: *Carbohydr. Res.* 330, 241 (2001).
 26. Velišek J.: *Chemie potravin 1*. OSSIS, Tábor 1999.
 27. Vermeulen R., Goderis B., Reynaers H., Delcour J. A.: *Carbohydr. Polym.* 62, 170 (2005).
 28. French D.: *Denpun Kagaku* 19, 8 (1972).
 29. Jane J.-L., v knize: *Starch. Structure and Functionality*. (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. Starch functionality in food processing. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 30. Morrison W. R.: *J. Cereal Sci.* 8, 1 (1988).
 31. Yu L., Dean K., Li L.: *Progress in Polym. Sci.* 31, 576 (2006).
 32. Lauro M., Suortti T., Poutanen K., v knize: *Starch. Structure and Functionality*. (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. The role of amylose-lipid complex in the enzymatic hydrolysis of starch granules. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 33. Tester R.F., v knize: *Starch. Structure and Functionality*. (Frazier P. J., Richmond P., Donald A. M., ed.), kap. Starch: The polysaccharide fractions. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
 34. Murphy P., v knize: *Handbook of Hydrocolloids*. (Phillips G. O., Williams P. A., ed.), http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=168&VerticalID=0 kap. Starch. Woodhead Publishing 2000.
 35. Van Hung P., Morita N.: *Carbohydr. Polym.* 59, 239 (2005).
 36. Eliasson A.-C., Karlsson R.: *Starch/Stärke* 35, 130 (1983).
 37. Soula A. B., Morrison W. R.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 709 (1985).
 38. Peng M., Gao M., Abdel-Aal E.-S. M., Hucl P., Chibbar R. N.: *Cereal Chem.* 76, 375 (1999).
 39. Seib P.A.: *Oyo Toshitsu Kagaku* 41, 49 (1994).
 40. Ghiasi K., Hoseney R.C., Varriano-Marston E.: *Cereal Chem.* 25, 111 (1982).
 41. Knight J. W., Olson R. M., v knize: *Starch: Chemistry and Technology*. (Whistler L. R., ed.), kap. XV. Academic Press, New York 1965-1967.
 42. Galliard T., Bowler P., Towersey P. J.: v knize *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Minor components of wheat starch and their technological significance. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 43. Meusser F., Althoff F., Huster H., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Developments in the extraction of starch and gluten from wheat flour and wheat kernels. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 44. Zwitserloot W. R. M., v knize: *Wheat is Unique* (Pomeranz Y., ed.), kap. Production of wheat starch and gluten: Historical review and development into new approach. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1994.
 45. Yonemoto P., Calori-Domingues M. A., Franco C. M. L.: *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 27, 761 (2007).
 46. Manelius R., Qin Z., Avall A. K., Andtfolk H., Bertoft E.: *Starch/Stärke* 49, 142 (1997).
 47. Sakintuna B., Budak O., Dik T., Yondem-Makascioglu F., Kincal N. S.: *Chem. Eng. Commun.* 190, 883 (2003).
 48. Robins C., Bridge A., Stuart T.: Patent WO/1995/018776.
 49. Ahamed N. T., Singhal R. S., Kulkarni P. R., Kale D. D., Mohinder P.: *Carbohydr. Polym.* 31, 157 (1996).
 50. Bae S. O., Lim S. T.: *Cereal Chem.* 75, 449 (1998).
 51. Chiotelli E., Le Meste M.: *Cereal Chem.* 79, 286 (2002).
 52. MacGregor A. W., Morgan J. E.: *Cereal Foods World* 31, 688 (1986).
 53. Soula A. B., Morrison W. R.: *J. Sci. Food Agric.* 36, 719 (1985).
 54. Sebecic B., Sebecic B.: *Starch/Stärke* 51, 445 (1999).
 55. Zhao J. G., Whistler R. L.: *Food Technol.* 48, 104 (1994).
 56. Boháčenko I., Vydrová H. ve skriptu *Technologie sacharidů* (Kadlec P., ed.), kap. Chemie a technologie škrobu. VŠCHT, Praha 2000.
 57. Kodet J., Babor K.: *Modifikované škroby, dextriny a lepidla*. SNTL, Praha 1991.
 58. Firemní literatura GEA Westfalia Separator, <http://www.westfalia-separator.com/downloads/pdf/9997-0816-000.pdf>, staženo 26.4.2009.

E. Šárka and Z. Bubník (*Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology Prague*): **Morphology, Chemical Structure, Properties and Applications of Wheat B-Starch**

Compared to other cereal or tuber starches, wheat starch shows mainly two different types of granules, the A-starch and B-starch, which are separated in starch processing. These types differ not only in size or shape but also in chemical structure of amylopectin, arrangement in granules, and lipid and protein contents. Chemical composition and structure of starch influence on physicochemical

properties (specific surface, crystallinity, gelatinization characteristics) and functionality.

Processing of B-starch (filtration, drying) is problematic for its small particles. Nevertheless, the challenge for other uses of B-starch has been taken up in designing new technological processes. Hence B-starch becomes a valuable raw material in other processes. Examples of its applications in enzymatic processes producing syrups, in modifications affording tailor-made starches, for flavour carriers, baking, extrusion and, last but not least, in biodegradable polymers are given.

GEOCHEMIE FULLERENŮ

OTAKAR FRANK^{a,b}, JAN JEHLIČKA^a, PETR
VÍTEK^a, LIBOR JUHA^c, VĚRA HAMPLOVÁ^c
a ZDENA POKORNÁ^c

^a Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2, ^b Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, v. v. i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, ^c Fyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
otakar.frank@jh-inst.cas.cz

Obsah

1. Úvod
2. Uvolňování fullerenu z geologických materiálů
3. Metody identifikace fullerenu a stanovení jejich koncentrace
 - 3.1. Analýza extraktu
 - 3.2. Přímé stanovení v pevném vzorku
4. Přehled a kritický rozbor dosud popsanych nálezů
 - 4.1. Fullereny ve fulguritech
 - 4.2. Fullereny v impaktových strukturách
 - 4.3. Fullereny z hraničních vrstev křída-terciér a perm-trias
 - 4.4. Mimosvětový výskyt fullerenu
 - 4.5. Fullereny v šungitu
 - 4.6. Fullereny v pevných bitumenech z lokality Mítov
5. Možné způsoby vzniku fullerenu
6. Stabilita fullerenu: různá prostředí a podmínky
7. Perspektivy dalšího výzkumu
8. Závěr

1. Úvod

Fullereny, třetí modifikace elementárního uhlíku, přitahují mnoho pozornosti od jejich objevu v roce 1985 (cit.¹). Z geologického hlediska fullereny představují velmi vzácnou fázi, která byla nalezena jen v několika málo typech hornin s výrazně specifickým původem. Tyto ojedinělé nálezy a zejména vztah fullerenu ke geologické historii takové horniny jsou předmětem geochemických výzkumů. Mezi jednotlivými výskyty fullerenu již bylo objeveno několik shodných rysů, ale stále ještě není zodpovězeno velké množství otázek. Ty se týkají původu a vzniku fullerenu v hornině, způsobu uchování těchto látek ve struktuře horniny a v neposlední řadě extrakčních a analytických metod pro identifikaci fullerenu v hornině. Přestože se těmito tématy v nedávné minulosti zabývalo mnoho prací, nejen geochemická komunita potřebuje spjitější

znalosti, které by dovolily přiřadit jednotlivé výskyty fullerenu k původu a historii horniny. Kromě toho přesné pochopení těchto procesů může vést k zlepšení laboratorních metod syntézy a funkcionalizace fullerenu.

Cílem tohoto přehledu je podat čtenáři poznatky o nálezech fullerenu jak na Zemi, tak v kosmu. Všechny tyto výskyty budou diskutovány zejména s ohledem na stabilitu fullerenu a také s přihlédnutím k možným způsobům jejich vzniku v jednotlivých prostředích. Zvláštní kapitola je věnována extrakci a identifikaci fullerenu, protože, jak se v posledních letech ukázalo, tato naprosto zásadní otázka stále není plně vyřešena a může tedy výrazně ovlivňovat pokusy o hledání fullerenu v našem okolí.

Nálezy fullerenu byly zpracovány v několika přehledných pracích^{2–4} a citace k jednotlivým nálezům proto nebudou většinou uváděny. Jsou-li v textu použity jednotky ppm a ppb, bylo tak učiněno s ohledem na přesnou citaci původní práce.

2. Uvolňování fullerenu z geologických materiálů

Podmínkou pro většinu analýz přítomnosti fullerenu v horninách je jejich úspěšná extrakce z horninové matrice do roztoku. C₆₀ je téměř nerozpustný v polárních rozpouštědlech, naopak substituované aromatické uhlovodíky jsou spolu se sirouhlíkem nejlepší volbou⁵ (např. rozpustnost C₆₀ v toluenu je 2,7 mg ml⁻¹, v 1,2-dichlorbenzenu 27 mg ml⁻¹). Rozpouštědla s vyšším bodem varu (> 200 °C) nebo tání, jako např. 1,2,4,5-tetramethylbenzen (TMB) s bodem tání 80 °C, jsou používána jen zřídka. Nicméně zvláště při extrakci vyšších fullerenu dokáží rozpouštědla jako TMB zvýšit výtěžek⁶ o více než 10 %.

Hlavními technikami pro izolaci fullerenu z hornin jsou extrakce horkým rozpouštědlem v Soxhletově přístroji, ultrazvuková extrakce, nebo extrakce při laboratorní teplotě za intenzivního míchání s následnou filtrací. Doba extrakce se liší pro jednotlivé metody: 8–48 h při práci se Soxhletovým přístrojem, 0,5–8 h při použití ultrazvuku a 24 h a více za míchání. Existuje však jen málo studií, které srovnávají efektivitu těchto metod při extrakci fullerenu např. z fullerennových sazí, a neexistuje žádná práce, která by se metodicky zabývala extrakcí fullerenu z hornin. Ovšem i poznatky získané při extrakci z fullerennových sazí jsou pro geologické systémy jen málo použitelné. Jak bude ukázáno dále, důvodem je zejména velký rozdíl koncentrací fullerenu. Ve fullerennových sazích jde o procenta, zatímco v horninách koncentrace jen výjimečně přesahují 1 mg kg⁻¹.

Naše skupina se proto detailně zabývala výzkumem a porovnáním těchto metod pro uměle připravené směsi syntetického C₆₀ vmíchaného do rozemletých uhlíkatých

hornin⁷. Jako výchozí materiály byly použity různé uhlíkem bohaté horniny a křemen jako inertní referenční materiál. Po přidání C_{60} v koncentraci od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ do 100 mg kg^{-1} a homogenizaci vzniklé směsi byly fullereny zpětně extrahovány toluenem metodou Soxtec (materiál je nejprve v extrakční patroně na určitou dobu ponořen přímo do horkého rozpouštědla, a poté extrakce pokračuje jako v Soxhletově přístroji), použitím ultrazvuku, podkritickou extrakcí (extrakce v tlakové cele rozpouštědlem v podkritickém stavu, v našem případě toluenem o teplotě 180°C při tlaku přibližně 9 MPa po dobu 8 min) a mícháním za pokojové teploty. Získané extrakty byly analyzovány metodou HPLC. Bylo zjištěno, že účinnost extrakce klesá u všech matric i metod s klesající koncentrací C_{60} ve směsi. Pro původní koncentrace fullerenu nižší než 1 mg kg^{-1} nebylo dosaženo výtěžku nad 6% . Tento výsledek je velmi podstatný, protože žádná z běžných metod, které jsme testovali, nebyla schopna extrahovat C_{60} z matrice bez výrazných ztrát, přestože jsou právě tyto metody často používány jak geochemiky, tak laboratorními specialisty na výzkum fullerenu. Na druhé straně u počátečních koncentrací C_{60} převyšujících 1 mg kg^{-1} byly výtěžky extrakcí mnohem vyšší, $9\text{--}67\%$ při použití ultrazvuku, 72% a více pro metodu Soxtec, u křemene až 100% . Za nízké výtěžky fullerenu mohou být zodpovědné dva hlavní procesy. Při extrakci může probíhat rozklad různými reakcemi jak uvnitř pevného materiálu, tak v roztoku anebo se fullereny adsorbují na aktivní povrchy zejména uhlíkatých materiálů použitých při experimentech. Oba tyto mechanismy se patrně v různé míře doplňují v závislosti na typu horniny. První případ, tedy rozkladné reakce, úzce souvisí s problémem stability fullerenu a bude blíže diskutován v šesté kapitole. Z korelace výtěžnosti extrakce s počáteční koncentrací C_{60} je patrné, že množství reaktivních látek a počet povrchově aktivních míst, které se mohou podílet na destrukci nebo zachytu fullerenu, jsou omezené. Při vyšší koncentraci C_{60} jsou tedy tyto aktivní látky a místa nasyceny malou částí přítomných fullerenu, zatímco zbytek fullerenu zůstává nevázaný a může být extrahován. V přírodě ovšem zatím nebyl nalezen materiál s koncentrací fullerenu o mnoho vyšší než 10 mg kg^{-1} ; průměr je cca 1 mg kg^{-1} , viz kapitola 4. Vezmeme-li v úvahu takové stopové koncentrace, je jasné, že výsledky hledání fullerenu v horninách budou velmi výrazně ovlivněny právě procesy při jejich laboratorní extrakci. Zkreslení předkládaných výsledků se projeví nižší změřenou koncentrací, v některých případech až negativním výsledkem analýzy.

Pro zmenšení ztrát je tedy nutné při použití určité metody provést její optimalizaci pro každý typ matrice. Příkladem může být nastavení teploty a doby trvání extrakce z černého uhlí pro ultrazvukové vany s různou charakteristikou působícího ultrazvukového pole⁸.

3. Metody identifikace fullerenu a stanovení jejich koncentrace

Metody vlastní identifikace a stanovení fullerenu v horninách můžeme rozdělit do dvou základních skupin: analýza extraktu a přímá analýza horniny v pevném stavu.

3.1. Analýza extraktu

Nejčastěji používané metody pro analýzu jsou HPLC a hmotnostní spektroskopie (MS) s různými ionizačními technikami, zejména EI (electron impact) a LD (laser desorption). Bohužel jen málo laboratorů používá tyto dvě základní metody v přímém spojení (HPLC-MS) nebo alespoň nezávisle na sobě, jak bylo doporučeno⁹ a použito pro vzorky při pátrání po C_{60} v pevných bitumenech z lokality Mítov v západních Čechách¹⁰. V poslední době je pro tyto účely často používána HPLC s kolonami Buckyclutcher (silikagel s 3,3,3-tris(2,4-dinitrofenoxi)-propylovými skupinami) nebo Cosmosil Buckyprep ([3-(pyren-1-yl)propyl] silikagel), které byly vyvinuty specificky pro dělení fullerenu. Nicméně pokud je analyzován extrakt horniny, která obsahuje větší podíl rozpustných organických látek, zejména vyšších polyaromatických uhlovodíků, může být detekce částečně či úplně znemožněna. V takovém případě je pouhá fotometrická detekce C_{60} nedostatečná a je nutné použít i detekci MS, pokud možno jen frakce s retenčním časem C_{60} . Jiným přístupem je využití MS s oběma možnými ionizačními technikami (EI i LD). Závažným problémem u laserové desorpce bývá nastavení energie laseru pro ionizaci, kde při vyšších energiích mohou vznikat fullereny z uhlíkatého prekursoru.

3.2. Přímé stanovení v pevném vzorku

Publikací, které by popisovaly identifikaci fullerenu v přírodních materiálech na základě analýzy pevného vzorku bez předchozí extrakce, není mnoho^{2,3}. Při použití LD-MS může nastat stejný problém jako při analýze extraktu, tj. vytváření fullerenu *in situ* z téměř libovolného uhlíkatého prekursoru. Analýza v pevném stavu je navíc ztížena odlišnou prahovou energií laseru pro desorpci fullerenu z různých typů geologických matric v závislosti na jejich struktuře. Při testování využitelnosti této metody na směsích syntetického fullerenu s rozemletými horninami byl zjištěn detekční limit 1 mg kg^{-1} pro C_{60} v grafitu, šungitu a křemeni, a 10 mg kg^{-1} v černém uhlí³. Citlivost této metody opět klesá s rostoucím obsahem organických látek v matrici. Obdobným způsobem byly vzorky testovány Ramanovou mikroskopií¹¹, kde byl zjištěn detekční limit 100 mg kg^{-1} pro C_{60} v křemeni a pouze 10 g kg^{-1} v uhlíkatých materiálech. Stejně hodnoty byly zaznamenány při statistickém vyhodnocení výsledků získaných transmisí elektronovou mikroskopií s vysokým rozlišením (HR-TEM)³. Je s podivem, že tyto dvě metody byly úspěšně použity při identifikaci přírodních fullerenu.

4. Přehled a kritický rozbor dosud popsáných nálezů

Doposud byly fullereny v přírodě nalezeny^{2–4} ve vzorcích hornin (obr. 1), které byly vystaveny jedinečným geologickým událostem jako jsou úder blesku, dále v kráterech po dopadu meteoritů a v hraničních vrstvách křída-terciér a perm-trias, které jsou také často dávány do souvislosti s dopady meteoritů. Fullereny nebo jim podobné struktury byly též identifikovány v uhlíkatých meteoritech Allende, Murchison a Tagish Lake a v mikrokráteru na družici LDEF. Odlišnou skupinou hornin obsahujících fullereny jsou šungity z Karelie v Rusku a pevné bitumeny z lokality Mítov v západních Čechách.

K dalším, poměrně sporným objevům, patří např. nález fullerenů ve fosilním dinosařím vejci nebo v uhlí z čínské provincie Junnan.

4.1. Fullereny ve fulguritu

Fulgurit je sklovitý útvar, nejčastěji duté válcovitého tvaru, který vzniká po úderu blesku do horniny či půdy. Sklovitá struktura je způsobena tavením zasaženého materiálu, teploty vzduchu v okolí blesku dosahují běžně 10 000 °C, v extrémních případech až 30 000 °C. Výchozí horninový materiál, ve kterém fulgurity vznikají, bývá různý, nejčastěji je to křemenný písek či písčité půda. Jediný nález fullerenů ve fulguritu pochází z oblasti Sheep Mountain v Coloradu (USA). Původ uhlíku potřebného pro syntézu fullerenů je nejasný, dle autorů nálezu pochází z borových jehlic a šišek, které se v okolí nálezu vyskytovaly.

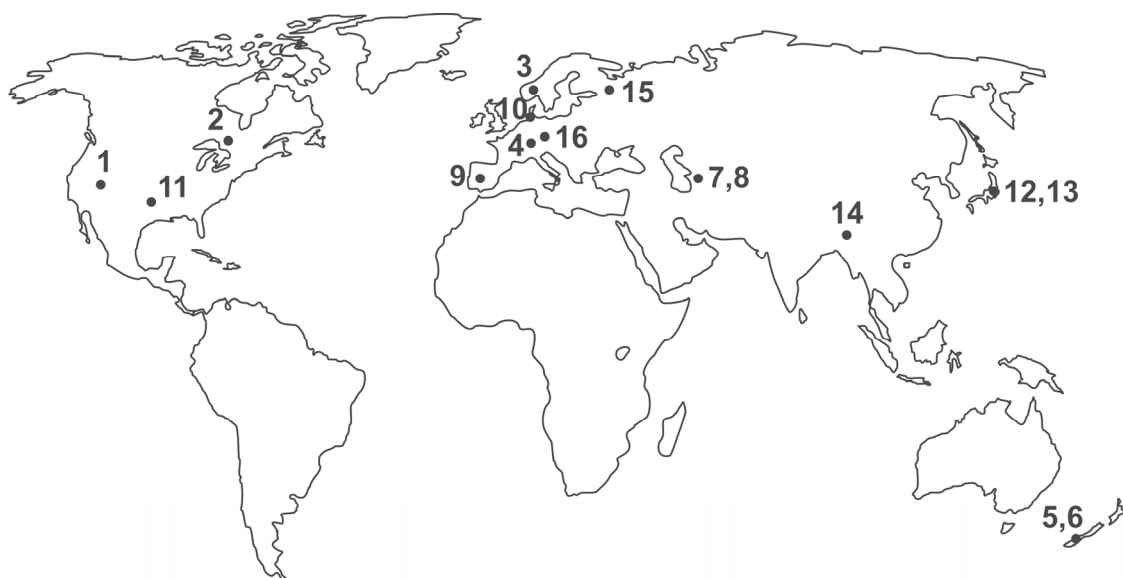
4.2. Fullereny v impaktivních strukturách

Jednou z dnes již klasických lokalit výskytu fullerenů v přírodě je impaktivní kráter Sudbury v kanadské provincii Ontario (stáří $1,85 \cdot 10^9$ let). Fullereny v koncentraci 1 až 10 ppm zde byly nalezeny v impaktivní brekcii (tj. v hornině tlakově i teplotně postižené dopadem meteoritu) formace Onaping s obsahem uhlíku kolem 1 %. Není zcela jasné, zda fullereny nalezené v Sudbury vznikly působením vysokých teplot a tlaků při dopadu bolidu, nebo byly přítomny v materiálu bolidu již předtím a jsou tedy mimozemského původu. Isotopický poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tzv. „černého tuhu“ formace Onaping naznačuje biogenní původ uhlíku. Je tedy možné, že fullereny zde vznikly mnohem později při přeměně organického materiálu – zbytků řas – v kráterovém jezeře. Jinou možností je již zmíněný mimozemský původ fullerenů, odvozený od změřených poměrů isotopů helia uzavřeného v nalezených fullerenech. Tato práce však zůstává předmětem diskusí a zatím nebyla ověřena jinou skupinou badatelů.

Dalšími krátery, jejichž horniny byly zkoumány na přítomnost fullerenů, jsou Gardnos (Norsko) a Ries (Německo). Jako v mnoha jiných případech i zde máme jak pozitivní, tak i negativní výsledky³.

4.3. Fullereny z hraničních vrstev křída-terciér a perm-trias

Zajímavou kapitolou výskytu přírodních fullerenů jsou dvě stratigrafické hranice, křída-terciér a perm-trias. Obě jsou spojovány s masivním vymíráním živočišných druhů a patrně jsou ve větší či menší míře přímým důsledkem dopadů meteoritů na zemský povrch. Na hranici kři-



Obr. 1. Přehled lokalit, kde byly fullereny identifikovány v horninové matici; Fulgurit: 1. Impaktivní struktury; 2 – Sudbury, 3 – Gardnos, 4 – Ries. Rozhraní křída-terciér: 5 – 11. Rozhraní perm-trias: 12 – 14. Šungit: 15. Mítov: 16

da-terciér, známé jako konec věku dinosaurů před 65 miliony lety, vznikl kráter Chicxulub po dopadu uhlíkatého meteoritu do oblasti poloostrova Yucatan. Jedním z důležitých následků tohoto nárazu byly rozsáhlé světové požáry, které jsou na mnoha místech Země dokumentovány přítomností sazí v oné hraniční vrstvě. Tato vrstva sedimentů dále obsahuje i iridium, jež je indikátorem dopadu bolidu. Fullereny byly v této vrstvě nalezeny ve dvou lokalitách na Novém Zélandu, ve dvou lokalitách v Turkmenistánu, dále ve Španělsku, v Dánsku a v Texasu v USA. Koncentrace C_{60} v těchto lokalitách se pohybují mezi 0,3 a 11 ppb. V několika těchto lokalitách byl identifikován i C_{70} (poměr C_{70}/C_{60} 0,2–0,3). Přítomnost fullerenů je vysvětlována třemi hypotézami, jednou je přímý původ z meteoritu, druhou je vznik fullerenů při dopadu meteoritu na zemský povrch a třetí uvažuje tvorbu fullerenů při následných požárech. Ani jedna z těchto hypotéz nebyla zatím uspokojivě vysvětlena či vyvrácena, jednou z možných cest je výzkum isotopického složení helia, jež může být uzavřeno ve fullerenu. Poměr $^3\text{He}/^4\text{He}$ pak odráží místo vzniku fullerenů.

Druhou stratigrafickou hranicí, kde byly nalezeny fullereny, je rozhraní perm-trias. V tomto období před 251 miliony let masivně vymíraly mořské i suchozemské druhy organismů, avšak nebyly nalezeny sedimenty obohacené iridiem ani sazemi. Není tedy prokázáno, že jde o důsledek dopadu asteroidu jako na rozhraní křída-terciér, a nelze ani dokázat existenci rozsáhlých požárů při této události. C_{60} v koncentraci 0,02 ppb byl identifikován v sedimentech z lokality Inuyama (Japonsko) a jinou skupinou badatelů v koncentraci 20 ppb v lokalitách Sasayama (Japonsko) a Meishan (Čína). Zde byly identifikovány také C_{70} a vyšší fullereny až po C_{300} . Dokonce byly u těchto vzorků identifikovány atomy He v anomálním isotopickém poměru, ukazujícím na jejich mimozemský původ. Stratigrafická pozice a isotopové poměry He v těchto vzorcích byly ovšem později zpochybněny.

4.4. Mimozemský výskyt fullerenů

Již experiment, při kterém byl poprvé identifikován C_{60} , byl motivován snahou laboratorně simulovat fáze, jež byly spektroskopicky pozorovány ve výronech uhlíkatých hvězd¹. Uhlík je jedním z nejčtenějších prvků ve vesmíru a je zastoupen ve více než 75 % molekul zatím identifikovaných v mezihvězdném prostoru (ISM – interstellar medium). Studium kosmického vývoje uhlíku od ISM až k obyvatelným planetám je podstatné pro pochopení vzniku živé hmoty. Pátrání po fullerenech v mimozemském prostoru je tak spojováno s identifikací dalších uhlíkatých fází, jež jsou možnými nositeli některých spektrálních pásů pozorovaných v ISM. ISM je tvořeno atomárním a molekulárním plynem, a dále prachovými částicemi o velikostech 1–1000 nm. Částice a molekuly v oblastech naší galaxie s nižší hustotou, nazývané difuzní ISM, vznikají převážně v plynných výronech umírajících hvězd o hmotnostech podobných našemu Slunci.

Identifikace možných uhlíkatých molekul ve vesmíru probíhá jednak vzdáleně (spektroskopicky) v ISM, jednak přímo v meteoritech či meziplanetárních prachových částicích zachycených např. satelity, nebo dopadlých na zemský povrch. Spektroskopická pozorování uhlíkatých molekul zahrnují široký UV absorpční pás kolem 220 nm, difuzní mezihvězdné absorpční pásy (DIB – diffuse interstellar bands), rozšířenou červenou emisi v oblasti 650 až 700 nm a infračervené emisní pásy. Za hlavní možné nositele většiny těchto pásů jsou považovány polyaromatické uhlovodíky (PAU), dále hydrogenovaný amorfni uhlík, diamanty, fullereny, případně lineární uhlíkaté řetězce (karbyny)^{12,13}. Bohužel identifikace jednotlivých molekul je prozatím pouze spekulativní. Největším problémem zůstává simulace podmínek panujících v ISM při laboratorních měřeních. Hustoty v mezihvězdném prostoru, byť v nejhustších oblacích, jsou tak nízké, že zůstávají mimo možnosti vakuových systémů v laboratořích. Laboratorní spektra, získaná ve více či méně přibližných podmínkách, jsou pak s reálnými spektry korelována podle teoretických výpočtů. I přestože poslední desetiletí přineslo v této oblasti výrazný pokrok, pro většinu uvedených spektrálních čar existuje více hypotetických nositelů.

Předpokládanými původci ultrafialového absorpčního pásu kolem 220 nm jsou patrně hydrogenovaný amorfni uhlík a PAU, případně tzv. uhlíkaté cibule¹³. Iglesias-Groth¹⁴ přiřazuje tento pás přechodu $\pi-\pi^*$ plasmonu fullerenů a cibulí s vrchní slupkou tvořenou molekulami C_{60} až C_{3840} .

Jako hlavní doklad existence fullerenů ve vesmíru jsou však považovány difuzní pásy při 957,7 a 963,2 nm (cit.^{15,16}), které by mohly patřit kationtu C_{60}^+ . Pás při 957,7 nm byl v nedávné době pozorován i ve spektech dalších tří vyhaslých objektů¹⁷ a ve všech případech byla šířka tohoto pásu 3 cm^{-1} . Tato hodnota odpovídá sférické molekule s rotační konstantou $\Delta B = 0,0036\text{ cm}^{-1}$ se stejným momentem setrvačnosti¹⁷ jako C_{60} . C_{60}^+ podle této hypotézy může představovat 0,3 až 0,9 % z celkového kosmického uhlíku. Webster¹⁸ předkládá teorii, ve které mohou být původcem difuzních pásů fullereny $C_{60}\text{H}_m$ a jejich ionty. Pak by ovšem muselo být přibližně 25 % z celkového kosmického uhlíku ve formě fullerenů. Petrie a Bohme¹⁹ představují hydrogenaci nižších fullerenů jako možnost stabilizace těchto jinak reaktivních molekul. Jejich výpočty ukazují, že fullereny s přikondenzovanými pětičlennými cykly se přednostně hydrogenují na atomech uhlíku společných těmto kruhům. Přítomnost vodíku při tvorbě uhlíkatých klastrů v okolí uhlíkatých hvězd tak může vést právě ke vzniku a stabilizaci fullerenů nižších než C_{60} , které také mohou vysvětlovat některá spektrální pozorování.

V infračervené oblasti je možné hledat vibrační emisní pásy C_{60}^+ při 7,1 a 7,5 μm . Zde je situace komplikovaná, protože v této oblasti se nachází silný aromatický infračervený emisní pás při 7,7 μm , který může zakrýt málo intenzivní pásy fullerenů. Sellgren²⁰ stanovil např. pro reflexní nebulu NGC 7023 horní limit C_{60}^+ 0,3 % z celkového přítomného uhlíku.

Polyaromatické uhlovodíky jsou obecně považovány za nejrozšířenější uhlíkaté molekuly v plynné fázi v ISM^{12,13,20}. Je prokázáno, že v okolí určitých typů hvězd probíhají vysokoteplotní chemické reakce vedoucí ke vzniku benzenu, vyšších PAU až sazí za podmínek podobných jako při spalovacích procesech na Zemi. Fullereny vznikají mj. právě při takových procesech. Koexistence fullerenu a PAU ve vesmíru je tedy poměrně pravděpodobná.

Předpoklad výskytu fullerenu ve vesmírném prostoru vedl ke zkoumání uhlíkatých chondritů, jejichž složení se nejvíce blíží složení hmoty, ze které vznikly planety naší sluneční soustavy. Na toto téma byly publikovány některé protichůdné výsledky. Zatímco v některých případech se podařilo detegovat fullereny v meteoritech Allende, Murchison a Tagish Lake, analýzy provedené jinými týmy nepotvrdily přítomnost fullerenu.

4.5. Fullereny v šungitu

Fullereny v šungitu, proterozoické uhlíkem bohaté hornině z ruské Karelie, byly prvními fullereny nalezenými v přírodním prostředí. Fullereny byly identifikovány v lesklých žilných a vrstevnatých šungitech, které jsou z šungitických hornin nejbohatší na organický uhlík (až 99 hm.%) a jejichž stáří bylo stanoveno na $2 \cdot 10^9$ let. Tyto šungity jsou považovány za původně bitumenní směs uhlovodíků podobnou dnešní ropě, která byla přeměněna na chemicky stabilní pevný bitumen se strukturou velmi blízkou skelnému uhlíku. Pro teorie vzniku fullerenu v těchto horninách se zdá být důležitý fakt, že při jejich přeměně hrála roli vysoká teplota způsobená magmatem při rozsáhlé vulkanické činnosti.

4.6. Fullereny v pevných bitumenech z lokality Mítov

Jediný doposud zaznamenaný nález fullerenu v Čechách pochází z pevných bitumenů z lokality Mítov u Plzně¹⁰. Pevné bitumeny jsou po chemické, strukturální i genetické stránce velmi podobné lesklým šungitům a vyskytují se zde v centimetrových akumulacích uzavřených mezi polštáři bazalticko-andezitických láv neoproterozoického stáří (přibližně 545–570 milionů let). Stejně jako v případě šungitů sehrála při vzniku mítovských bitumenů velkou roli vysokoteplotní přeměna při kontaktu s magmatem. Fullereny byly detegovány ve dvou vzorcích pevného bitumenu v koncentracích 0,2 a 0,3 ppm. Pro analýzu byly použity metody HPLC a EI-MS, což tento nález řadí k těm, o které nejsou odborníky v této oblasti vedeny spory. Teoriemi vzniku fullerenu v této i dalších lokalitách se zabývá následující kapitola.

5. Možné způsoby vzniku fullerenu

Hypotézy o vzniku fullerenu v horninách se výrazně liší podle typu jejich nálezu. V zásadě nejjednodušší situace nastává u fulguritů; zde se téměř bez výhrad předpoklá-

dá proces podobný laboratorní syntéze fullerenu v obloukovém výboji. Klíčovými parametry jsou zde teplota, určitá minimální doba trvání výboje, atmosféra a přítomnost uhlíkatého prekursoru. Rozsah teplot při přeměně bleskem je velký, jako maximální jsou uváděny teploty až okolo 30 000 °C, nicméně fáze přítomné ve fulguritech vznikají již při teplotách 2000 °C a vyšších. Teplota plynu (He) v obloukovém výboji potřebná ke vzniku fullerenu v plynné fázi se pohybuje v rozmezí 3000–5000 °C. Je tedy možné předpokládat, že při vzniku fulguritu, kdy se v okolí vodivého kanálu blesku taví horniny a také tvoří inkluze uvnitř chladnoucí taveniny, existují vhodné podmínky právě ke vzniku fullerenu z plynné fáze. Podmínka minimálního trvání výboje byla diskutována v návaznosti na experiment, při kterém různé uhlíkem bohaté materiály byly vystaveny krátkodobému výboji, jehož parametry s výjimkou doby trvání byly blízké přírodnímu blesku. Ovšem v takto změněných materiálech fullereny nalezeny nebyly²¹. Další podmínkou je samozřejmě zdroj uhlíku; pátrání po fullerech ve fulguritech vzniklých na pouštích roztavením křemenného písku bylo negativní.

Stejně jako při vzniku fullerenu ve výboji můžeme přirovnávat i další přírodní procesy k těm, které známe z laboratorní syntézy. Jednou z možností vzniku fullerenu z hranice křída-terciér jsou požáry, ke kterým v této době nepochybně docházelo, což dokládá přítomnost sazí v oně vrstvách. V současnosti je průmyslová výroba fullerenu založena na spalování uhlovodíkových par a plynů, zejména benzenu nebo acetyleny, a jejich směsí při teplotě 1500 °C a více. Není tedy příliš obtížné si takový proces představit i pro fullereny nalezené v přírodě.

Takový scénář, tedy hoření zelené biomasy, však není možné aplikovat na fullereny nalezené v proterozoických horninách. V těchto případech (šungit, Mítov, možná Sudbury) byly navrženy dvě základní hypotézy. V obou případech jsou za prekuzory fullerenu uvažovány polyaromatické uhlovodíky, které byly již tehdy jedním z produktů rozkladu a následné přeměny odumřelých organismů, v té době převážně jednoduchých řas. Jednou z možností je proces podobný průtokové pyrolýze naftalenu²², kdy přes meziprodukty, jako je benzo[k]fluoranthén a jeho trimer, vzniká kondenzací naftalenových jednotek spojenou s dehydrogenací fulleren C₆₀. Minimální teplota, při které

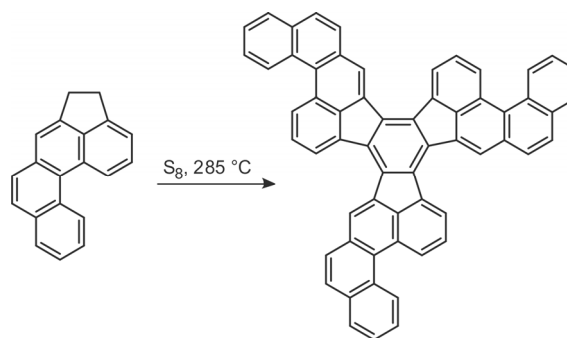
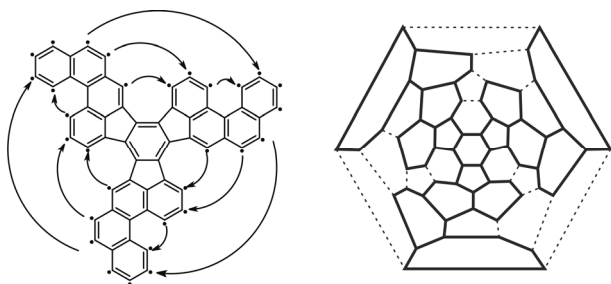


Schéma 1.



Obr. 2. Schématické znázornění průběhu cyklodehydrogenace uhlovodíku $C_{60}H_{30}$ (vlevo). Projekce této molekuly do Schlegelova diagramu C_{60} je vpravo. Vazby existující v $C_{60}H_{30}$ jsou vyznačeny plnými čarami

takto vznikly fullereny, byla $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při teplotě $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takových teplot bylo pravděpodobně dosahováno i při přeměně bitumenů při kontaktu s magmatem.

Další možností jsou radikálové reakce iniciované elementární sírou, při kterých uhlovodíkový prekursor trimerizuje²³. Schéma 1 znázorňuje reakci, při které z 4,5-dihydrobenzo[*l*]-acefenanthrylenu vzniká trimerizací při teplotě $285\text{ }^{\circ}\text{C}$ uhlovodík $C_{60}H_{30}$. Jak je patrné z obr. 2, při cyklodehydrogenaci této molekuly může již přímo vzniknout fullerén C_{60} .

6. Stabilita fullerenů v různých prostředích a podmínkách

Již krátce po objevu přípravy fullerenů v makroskopickém množství se začaly hromadit informace o jejich chemické reaktivitě a stabilitě v různých chemických prostředích za rozdílných fyzikálních podmínek. Vzhledem k jejich molekulární struktuře je chemické chování fullerenů mnohem bohatší a barvitější, než je tomu u ostatních alotropických forem uhlíku – grafitu a diamantu. Řešíme-li otázku vzniku, uchování a následného uvolnění i identifikace resp. stanovení fullerenů, musíme se kromě mechanismu jejich tvorby věnovat i jejich reaktivitě a stabilitě v uvažovaných prostředích a podmínkách.

Ohřev práškového C_{60} na vzduchu vedl k měřitelnému úbytku jeho hmotnosti při teplotě $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; kolem $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ již autoři²⁴ pozorovali úplný rozklad. Emisní infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací ukázala²⁵ na první chemické změny C_{60} v Ar/O_2 atmosféře při teplotách kolem $200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ve vakuu jsou ovšem C_{60} a C_{70} výrazně stabilnější²⁶. Při $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ sice jejich rozklad nastává již po několika minutách, ale teplotu $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ je ovšem třeba udržovat celou hodinu, aby se dosáhlo srovnatelné produkce amorfního uhlíku. Při ještě nižších teplotách je rozklad nevýrazný.

Jak již bylo řečeno, fullereny jsou nestabilní^{24,25,27–29} v prostředí obsahujícím kyslík či některé kyslíkaté sloučeniny. Za těchto podmínek vznikají rozličné kyslíkaté deriváty fullerenů, jejichž tvorba poté vede k výraznějším

změnám celkové struktury materiálu. Jak pro nižší, tak i pro vyšší fullereny byla pozorována taková spontánní konverze původního materiálu na nerozpustný zbytek již při laboratorní teplotě²⁹.

Fullereny jsou velmi reaktivní vůči radikálům. Ve struktuře C_{60} se nachází třicet dvojných vazeb, na něž se radikály mohou adovat. Právem bývá nazývána „radikálovou houbou“. Toto chování je pro fullereny typické a bylo zjištěno jak v plynné fázi³⁰, tak v roztocích³¹ již před více než patnácti lety. Aduktů jsou obecně méně stabilní než výchozí fullereny, a proto je třeba na derivatizaci fullerenů pohlížet jako na předstupeň jejich rozkladu.

Chování fullerenu jako radikálové houby je klíčové k pochopení radiačně chemického chování fullerenů^{32,33}. Radikály produkované zářením v rozpouštědlech či maticích geologických (např. šungit) nebo kosmochemických (např. uhlíkatý chondrit) reagují s fullereny v nich rozptýlenými či dispergovanými. Kromě toho se v soustavě přenášejí náboje a excitační energie elektronu. Excitační procesy dají vzniknout fullerenům v prvním tripletovém excitovaném stavu, které jsou (viz Kashovo-Vavilovovo pravidlo) vysoce reaktivní, a tak i nestabilní^{34,35}.

Bohužel je většina dosud realizovaných laboratorních studií stability a reaktivity fullerenů jen málo využitelná pro objasnění chování uhlíkových kovalentních klastrů v reálných kosmogeochemických soustavách. Z pochopitelných důvodů byly většinou sledovány velmi čisté vzorky určitého fullereny; jejich chování se však často dramaticky mění, je-li fullerén rozptýlen v matici, znečištěn nebo i jen ve směsi s jinými druhy fullerenů (viz např. cit.²⁸). Laboratorní výzkum se též většinou prováděl s velkými množstvími a při vysokých koncentracích fullerenů. Je-li např. při experimentu použito 50 mg fullereny, který se pak rozloží z 15% , nelze hledět na nerozložený zbytek a soudit, že látka je v podstatě stabilní³³. Bohužel to znamená, že stopová množství ozářená za daných podmínek v kosmogeochemickém materiálu by byla velmi pravděpodobně úplně rozložena. Studie stability fullerenů je tedy pro objasnění jejich kosmogeochemického výskytu třeba provádět při stopových koncentracích a v prostředí příslušných matic.

7. Perspektivy dalšího výzkumu

Ukázali jsme, že je především třeba optimalizovat extrakční proces tak, aby při něm byly ztráty fullerenů rozkladem co nejmenší. Extrakce horkým toluenem za přístupu vzduchu, užívaná ve většině prací realizovaných v 90. letech, je mimořádně nevhodnou metodou k šetrnému uvolnění fullerenů z geologických vzorků. Nový standardní extrakční postup je založen na záměně toluenu nearomatickým rozpouštědlem (např. cyklohexanem) nebo počítá s přidáním vhodného antioxidantu. Nový postup by pak měl být aplikován na řadu soustav studovaných dříve s negativním nebo nejednoznačným výsledkem.

K otázce stability fullerenů v kosmogeochemických soustavách je třeba laboratorně simulovat působení různých faktorů (zvýšená teplota, tlak, ionizující záření, UV záření) na fullereny rozptýlené v realistických koncentracích v geologických a kosmochemických matricích. Vliv matric lze studovat na umělých modelech, složkách vydělených z reálných materiálů, a také samozřejmě v reálných přírodních vzorcích. Pro přírodní materiály lze volit dva postupy: materiál je obohacen známým množstvím fullere- nu (výhoda tohoto postupu spočívá především v možnosti použít různé koncentrace fullerenů) nebo je vliv faktorů způsobujících rozklad sledován při jejich působení na pří- rodní fullereny obsažené v horninách, např. v šungitu, pevném bitumenu z Mítova, atd.

8. Závěr

Klíčovou otázkou kosmogeochemie fullerenů můžeme formulovat následovně. Je jejich řídký výskyt důsledkem toho, že podmínky nutné pro jejich vznik nastávají v přírodě jen vzácně a pokud vůbec nastanou, nejsou splněny optimálně? Je tu ovšem i druhá možnost – fullereny vznikaly častěji a s většími výtěžky, než dnes soudíme z jejich řídkého výskytu, ale v geologických a kosmických podmínkách se jich většina rozložila. Výše shrmanyž- děný materiál dle našeho názoru zřetelně ukazuje, že odpověď na tyto otázky se teprve začíná hledat.

Práce vznikla v rámci řešení projektů Grantové agen- tury ČR č. 205/06/P348 a 205/07/0772 a při práci ve vý- zkumných centrech LC510 a LC528 a na výzkumných zá- měrech MŠMT MSM0021620855 a AVČR Z10100523.

LITERATURA

- Kroto H. W., Heath J. R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E.: *Nature* 318, 162 (1985).
- Buseck P. R.: *Earth Planet. Sci. Lett.* 203, 781 (2002).
- Frank O.: *Origin of Fullerenes in Rocks*. Karlova Uni- verzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2005.
- Heymann D., Jenneskens L. W., Jehlička J., Koper C., Vlietstra E.: *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nano- struct.* 11, 333 (2003).
- Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra R., Lorents D. C.: *J. Phys. Chem.* 97, 3379 (1993).
- Parker D. H., Wurz P., Chatterjee K., Lykke K. R., Hunt J. E., Pellin M. J., Hemminger J. C., Gruen D. M., Stock L. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 7499 (1991).
- Jehlička J., Frank O., Hamplová V., Pokorná Z., Juha L., Boháček Z., Weishauptová Z.: *Carbon* 43, 1909 (2005).
- Vítek P., Jehlička J., Frank O., Hamplová V., Pokorná Z., Juha L., Boháček Z.: *Fullerenes, Nanotubes, Car- bon Nanostruct.* 17, 109 (2009).
- Taylor R., Abdul-Sada A. K.: *Fullerene Sci. Technol.* 8, 47 (2000).
- Jehlička J., Svatoš A., Frank O., Uhlík F.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 1495 (2003).
- Jehlička J., Frank O., Pokorný J., Rouzaud J. N.: *Spectrochim. Acta, Part A* 61, 2364 (2005).
- Henning T., Salama F.: *Science* 282, 2204 (1998).
- Ehrenfreund P., Charnley S. B.: *Annu. Rev. Astron. Astrophys.* 38, 427 (2000).
- Iglesias-Groth S.: *Astrophys. J.* 608, L37 (2004).
- Foing B. H., Ehrenfreund P.: *Nature* 369, 296 (1994).
- Kroto H. W., Jura M.: *Astron. Astrophys.* 263, 275 (1992).
- Ehrenfreund P., Sephton M. A.: *Faraday Discuss.* 133, 277 (2006).
- Webster A.: *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 263, 385 (1993).
- Petrie S., Bohme D. K.: *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 268, 938 (1994).
- Sellgren K.: *Spectrochim. Acta, Part A* 57, 627 (2001).
- Frank O., Jehlička J., Hamplová V.: *Fullerenes, Nano- tubes, Carbon Nanostruct.* 11, 257 (2003).
- Taylor R., Langley G. J., Kroto H. W., Walton D. R. M.: *Nature* 366, 728 (1993).
- Sarobe M., Fokkens R. H., Cleij T. J., Jenneskens L. W., Nibbering N. M. M., Stas W., Versluis C.: *Chem. Phys. Lett.* 313, 31 (1999).
- Milliken J., Keller T. M., Baronavski A. P., McElvany S. W., Callahan J. H., Nelson H. H.: *Chem. Mater.* 3, 386 (1991).
- Vassallo A. M., Pang L. S. K., Coleclark P. A., Wil- son M. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 7820 (1991).
- Leifer S. D., Goodwin D. G., Anderson M. S., Ander- son J. R.: *Phys. Rev. B: Condens. Matter* 51, 9973 (1995).
- Chibante L. P. F., Heymann D.: *Geochim. Cosmo- chim. Acta* 57, 1879 (1993).
- Scanlon J. C., Brown J. M., Ebert L. B.: *J. Phys. Chem.* 98, 3921 (1994).
- Taylor R.: *Fullerene Sci. Technol.* 7, 305 (1999).
- Krusic P. J., Wasserman E., Keizer P. N., Morton J. R., Preston K. F.: *Science* 254, 1183 (1991).
- McEwen C. N., McKay R. G., Larsen B. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 4412 (1992).
- Maity D. K., Palit D. K., Mohan H., Mittal J. P.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89, 95 (1993).
- Basiuk V. A., Albarran G., Basiuk E. V., Saniger J. M.: *Adv. Space Res.* 36, 173 (2005).
- Juha L., Hamplová V., Kodymová J., Špalek O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2437 (1994).
- Juha L., Fárniková M., Hamplová V., Kodymová J., Mullerová A., Krása J., Lásková L., Špalek O., Kubát P., Stibor I., Koudoumas E., Couris S.: *Fullerene Sci. Technol.* 8, 289 (2000).

O. Frank^{a,b}, J. Jehlička^a, P. Víték^a, L. Juha^c, V. Hamplová^c, and Z. Pokorná^c (^a *Institute of Geochemistry, Mineralogy and Mineral Resources, Faculty of Science, Charles University, Prague*, ^b *J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^c *Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Geochemistry of Fullerenes**

This review summarizes the reports on the occurrence of fullerenes in both the terrestrial and extraterrestrial environments. A strong emphasis is placed on stability of fullerenes. In contrast to most of the previously published works, which usually deal with their stability only in terms of possible fullerene survival in geological history, the review also addresses their (photo)chemical stability in extraction procedures. Possible ways of fullerene formation in particular localities are discussed with respect to local conditions and compared with the known laboratory processes.

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Bárta, Jan	52	Skokanová, Marianna	159, 171
Barták, Petr	94	Srkalová, Simona	179
Bartl, Tomáš	244	Stárka, Luboslav	78
Bednář, Petr	94	Šárka, Evžen	305
Brányik, Tomáš	271	Šimánek, Vilím	1
Bubník, Zdeněk	305	Škop, Vojtěch	234
Cibíková, Petra	279	Šturdíková, Mária	279, 295
Čáp, Lubomír	94	Šulc, Miloslav	58
Čepl, Jaroslav	58	Švajdlenka, Emil	244
Červený, Libor	46	Švarcová, Irena	149
Čopíková, Jana	64, 83, 106, 118, 191	Tesařová, Eva	179
Čurn, Vladislav	52	Tůma, Jiří	263
Dercová, Katarína	159, 171	Tůmová, Lenka	263
Doležal, Martin	70	Uher, Michal	64, 83, 106, 118
Dostálek, Pavel	271	Uhlík, Ondřej	288
Drašar, Pavel	64, 83, 106, 118, 191	Ulrichová, Jitka	1
Dvořák, Petr	58	Valentová, Kateřina	149
Dvořák, Zdeněk	1	Valterová, Irena	23
Dvořáková, Markéta	271	Vavříková, Eva	224
Dyr, Jan E.	142, 166	Vecka, Marek	212
Fidler, Martin	240	Vinšová, Jarmila	224
Fišar, Zdeněk	13, 37	Vítek, Petr	313
Fodran, Peter	138	Vokurková, Martina	204
Frank, Otakar	313	Zaoral, Milan	127
Gremeň, Lukáš	138	Zdařilová, Adéla	1
Hamouz, Karel	58	Zídek, Václav	234
Hampl, František	191	Zídková, Jarmila	234
Hamplová, Věra	313	Žemlička, Milan	244
Harmatha, Juraj	288		
Heinrich, Jan	149		
Hejdová, Radka	94		
Heřmanová, Veronika	52		
Hřibová, Petra	244		
Jehlička, Jan	313		
Juha, Libor	313		
Kalíková, Květa	179		
Kamlar, Marek	288		
Karabín, Marcel	271		
Kohout, Ladislav	288		
Kolářová, Lenka	240		
Kontrová, Kateřina	234		
Korhoňová, Marcela	94		
Kotlín, Roman	142, 166		
Koutek, Bohumír	254		
Krulíkovská, Tereza	186		
Kruliš, Radim	271		
Lachman, Jaromír	58		
Lapčík, Oldřich	64, 83, 106, 118, 191		
Leitmannová, Eliška	46		
Lubanda, Hana	212		
Lukčo, Miroslav	186		
Luxová, Anna	23		
Macek, Tomáš	254, 288		
Macková, Martina	254		
Malíková, Jana	1		
Maruna, Michal	279, 295		
Moravcová, Jitka	64, 83, 106, 118, 191		
Moravčíková, Petra	138		
Neubauerová, Tereza	254		
Ondřejíčková, Petra	295		
Opletal, Lubomír	106, 118, 191		
Patáková, Petra	186		
Pivec, Vladimír	58		
Pokorná, Zdena	313		
Rauchová, Hana	204		

