

**Edice
Chemické
Lístky**



Michal JURÁŠEK a Pavel DRAŠAR,

hlavní autoři a editoři,

sborníku

ORAGANICKÉ

PŘÍRODNÍ LÁTKY

v zrcadle časopisu

CHEMICKÉ LISTY

2011-2015

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, 2011-2015

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

Seznam autorů jednotlivých příspěvků je uveden na str. 260.

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 260, ediční číslo 12568-2026-03.

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

ISBN elektronické verze (formát PDF) 978-80-88307-34-1

ISBN 80-88307-34-1



ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY: VZTAH MEZI JEJICH STRUKTUROU A ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITOU	1
Ivana Doležilková, Martina Macková, Tomáš Macek	
PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH DERIVÁTY CHUTI PÁLIVÉ	11
Oldřich Lapčík, Lubomír Opletal, Jitka Moravcová, Jana Čopíková, Pavel Drašar	
SLANÁ CHUŤ PŘÍRODNÍCH LÁTEK A JEJICH DERIVÁTŮ	17
Lubomír Opletal, Zdeněk Wimmer, Jana Čopíková, Oldřich Lapčík, Jitka Moravcová, Lucie Cahlíková, Pavel Drašar	
PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH DERIVÁTY CHUTI CHLADIVÉ	22
Jana Čopíková, Jitka Moravcová, Oldřich Lapčík, Lubomír Opletal, Pavel Drašar	
ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – MECHANIZMUS KATALÝZY VO VZŤAHU K TVORBE	
BIOLOGICKY ÚČINNÝCH EIKOZANOIDOV	27
Peter Hoffman, Lýdia Bezáková, Ivana Holková, Mária Pekárová, Marek Obložinský	
KOVOVÁ CHUŤ PŘÍRODNÍCH LÁTEK A JEJICH DERIVÁTŮ	34
Zdeněk Wimmer, Lubomír Opletal, Jana Čopíková, Jitka Moravcová, Khaled Saleh Omar Abdulmanea, Oldřich Lapčík, Pavel Drašar	
ÚLOHA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ ROSTLIN V BAKTERIÁLNÍ DEGRADACI ORGANICKÝCH XENOBIOTIK	39
Lucie Musilová, Ondřej Uhlík, Martina Macková A Tomáš Macek	
VÝZNAM CHMELOVÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ	44
Marcel Karabín, Tereza Hudcová, Lukáš Jelínek, Pavel Dostálek	
FENOLICKÉ METABOLITY LISTOV <i>Karwinskia humboldtiana</i> (Schult.) Zucc.	53
Pavel Mučaji, Milan Nagy, František Šeršeň, Emil Švajdlenka, Josef Drozd, Michal Štujber, Tibor Liptaj	
MOŽNOSTI VYUŽITÍ HUPERZINU A V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY NEMOCI	57
Lucie Drtinová, Miroslav Pohanka	
XANTHOMOL: MOŽNOSTI IZOLACE A OBOHACOVÁNÍ PIVA	61
Lukáš Jelínek, Marcel Karabín, Tomáš Kinčl, Tereza Hudcová, Blanka Kotlíková, Pavel Dostálek	
LUTEIN – VÝZNAMNÝ KAROTENOID VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA	66
Miroslav Šivel, Bořivoj Klejdus, Stanislav Kráčmar, Vlastimil Kubáň	
SIRTUINY – HISTONOVÉ DEACETYLASY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSKRIPCI GENU	74
Marcela Dvořáková, Marie Příbylová, Tomáš Vaněk	
ALKALOIDY ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA	
V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	82
Markéta Dalecká, Radim Havelek, Karel Královec, Lenka Brůčková, Lucie Cahlíková	
EXTRAKČNÉ POSTUPY PRE IZOLÁCIU DITERPÉNOV Z UHLIA	90
Anton Zubřík, Michal Lovás, Silvia Dolinská, Slavomír Hredzák, Ľudmila Turčániová, Josef Cvačka, Vladimír Vrkoslav	
NÁHRADNÍ SLADIDLA	96
Jana Čopíková, Jitka Moravcová, Zdeněk Wimmer, Lubomír Opletal, Oldřich Lapčík, Pavel Drašar	
REZISTENTNÍ A POMALU STRAVITELNÝ ŠKROB	104
Evžen Šárka, Petra Smrčková, Lenka Seilerová	
ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z HMYZU	111
Václav Čerovský	
ANOREXIGENNÍ NEUROPEPTID CART V REGULACI PŘÍJMU POTRAVY	121
Veronika Nagelová, Blanka Železná, Lenka Maletínská	
PRVNÍ PŮLSTOLETÍ STEROIDNÍ CHEMIE	125
Alexander Kasal, Hana Chodounská	
VONNÉ A CHUŤOVÉ SLOŽKY SLADŮ	129
Karel Cejpek	
KONJUGÁTY PORFYRINŮ	139
Pavla Tomanová, Michal Jurášek	
PŘÍRODNÍ LÁTKY SVÍRAVÉ A TRPKÉ CHUTI	149
Jana Čopíková, Zdeněk Wimmer, Oldřich Lapčík, Lucie Cahlíková, Lubomír Opletal, Jitka Moravcová, Pavel Drašar	
ZMENY CELULÓZY PRI VODNEJ HYDROLÝZE DREVA VRBY BIELEJ (<i>Salix alba</i> L.)	154
Viera Kučerová, Eva Výbohová	
ELICITINY: KLÍČOVÉ MOLEKULY INTERAKCÍ ROSTLIN A PATOGENŮ	160
Pavla Moricová, Lenka Luhová, Jan Lochman, Tomáš Kašparovský, Marek Petřivalský	
FUNKČNÉ ZLOŽKY CEREÁLÍÍ ÚČINNÉ V PREVENCI CIVILIZAČNÝCH OCHORENÍ	167
Andrea Marko, Milada Rakická, Ernest Šturdík	
ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE	175
Aneta Laryšová, Lenka Endlová, Viktor Vrbovský, Zuzana Navrátilová	
METODA PRO ANALÝZU ISOPROSTANŮ VE TKÁNI LOSOSA	181
Martina Bolechová, Josef Čáslavský, Daniela Mácová, Milada Vávrová, Mark Taggart	
BIOSYNTÉZA A IZOLÁCIA RASTLINNÝCH SAPONÍNŮV	189
Lenka Tmáková, Stanislav Sekretár, Jarmila Hlásniková, Lenka Vrbíková, Štefan Schmidt	
STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH CHMELOVÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ METODOU HPLC-PDA	196
VE CHMELOVÉM MATERIÁLU	
Tereza Hudcová, Hana Skoupá, Lukáš Jelínek, Marcel Karabín, Pavel Dostálek	
PŘÍRODNÍ LÁTKY KYSELÉ CHUTI	201
Oldřich Lapčík, Zdeněk Wimmer, Lubomír Opletal, Jitka Moravcová, Jana Čopíková, Pavel Drašar	

LIPIDY, FUNKČNÉ A ŠTRUKTURÁLNE KOMPONENTY EUKARYOTICKÝCH BUNIEK	205
Eva Drozdíková, Margita Obernauerová	
IZOLÁCIA A CHEMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA PŠENIČNÝCH ARABINOXYLÁNOV	211
Lenka Blažeková, Silvia Bielečková, Viera Horváthová	
VLIV SPOLEČENSTVA ŘAS A BAKTERIÍ NA TVORBU KOROZIVNĚ AKTIVNÍCH SLOUČENIN, KTERÉ DEGRADUJÍ SILIKÁTOVÉ STAVEBNÍ MATERIÁLY	218
Richard Wasserbauer, Zuzana Rácová, Ivana Loušová	
ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY MATERSKEJ KAŠIČKY	222
Mária Šedivá, Jaroslav Klaudiny	
STRIGOLAKTONY – STRUKTURA A FUNKCE V ROSTLINÁCH	229
Marcela Dvořáková, Tomáš Vaněk	
BOLDINOVÉ ALKALOIDY A PERSPEKTIVY JEJICH VYUŽITÍ	237
Anna Hošťálková, Tomáš Siatka, Jakub Chlebek, Lubomír Opletal, Pavel Drašar, Lucie Cahlíková	
SLEDOVANIE PRODUKCIE RESVERATROL 3- β -D-GLUKOZIDU V BUNKOVÝCH KULTÚRACH VINIČA PO VYSTRESOVANÍ FUNGALNÝM ELICITOROM	247
Martin Sák, Ivana Dokupilová, Ján Šajbidor	
ANABOLICKÉ ANDROGENNÍ STEROIDY – NEBEZPEČÍ V DOPLŇCÍCH STRAVY	251
Lucie Fojtíková, Sandra Göselová, Barbora Holubová	
PŘÍPRAVA POLYSACHARIDOVÝCH FILMŮ NA BÁZI CHITOSANU A CELULOSY	256
Markéta Pišlová, Kateřina Kolářová, Vladimíra Vosmanská, Ondřej Kvítek, Václav Švorčík	
AUTORSKÝ REJSTRÍK	260



ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY: VZTAH MEZI JEJICH STRUKTUROU A ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITOU

IVANA DOLEŽÍLKOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^{a,b} a TOMÁŠ MACEK^{a,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, Společná laboratoř ÚOCHB AV ČR a VŠCHT Praha, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

ivana.dolezilкова@vscht.cz; martina.mackova@vscht.cz; tom.macek@uochb.cas.cz;

Došlo 22.2.10, přepracováno 30.9.10, přijato 22.10.10.

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, antimikrobiální peptidy, mechanismus účinku, struktura, mikrobiální rezistence

Obsah

1. Úvod
2. Obecná struktura antimikrobiálních peptidů
 - 2.1. Mechanismus specifity antimikrobiálních peptidů a jejich selektivní toxicita
 - 2.1.1. Srovnání stavby mikrobiálních membrán
3. Mechanismy účinku
 - 3.1. Membránu narušující peptidy
 - 3.2. Jiné mechanismy účinku
4. Vztah mezi strukturou antimikrobiálních peptidů a jejich aktivitou
 - 4.1. Peptidy se strukturou β -listu
 - 4.2. Peptidy s α -helikální strukturou
 - 4.3. Peptidy s rozvolněnou strukturou
 - 4.4. Peptidy se strukturou smyčky
5. Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům
 - 5.1. Konstitutivní rezistence
 - 5.2. Adaptivní rezistence
6. Perspektivy praktického využití antimikrobiálních peptidů
7. Závěr

1. Úvod

Před objevem syntetických antimikrobiálních látek byly děje v rámci vrozené imunity těmi nejdůležitějšími mechanismy, které zajišťovaly přežití při napadení patogenními mikroorganismy. Vrozené imunitní mechanismy stojí na prvním počátku imunitní reakce organismu a teprve druhotně uvádějí do chodu mechanismy imunity adaptivní.

Například u člověka tvoří první obrannou linii vrozené imunity neutrofilové. Disponují obrannými mechanismy jednak závislými na kyslíku (produkce metabolitů kyslíku, chloru), ale i mechanismy na kyslíku nezávislými, kam řadíme i produkci antimikrobiálních peptidů¹.

Antimikrobiální peptidy jsou v přírodě všudypřítomné s více než 1000 známými zástupci a jsou složkou první obranné linie organismů proti infekčním mikroorganismům². Tyto mikroorganismy jsou schopny ovlivnit imunitní odpověď včetně posílení vrozené imunity a potlačení zánětlivých procesů³. Organismy vylučují kationické a anionické peptidy s antimikrobiálním účinkem a jejich stručný přehled zde podávají tabulky I a II. Anionické antimikrobiální peptidy mají malou velikost, anionický charakter, za který jsou odpovědné homopolymerní asparátové oblasti a jako kofaktor pro baktericidní aktivitu potřebují zinek. Poprvé byly nalezeny u ovce⁴. Mechanismus účinku u těchto peptidů zatím nebyl spolehlivě prokázán, avšak předpokládá se, že bakteriální buňka je přijímá společně se zinkem. Baktericidní účinek anionických peptidů je inhibován v přítomnosti fosfátu nebo EDTA, naproti tomu s rostoucí koncentrací NaCl se zvyšuje³. Anionické antimikrobiální peptidy byly nalezeny v plicích, játrech, tenkém střevu savců a rovněž v krevním séru.

Kationické antimikrobiální peptidy jsou obecně definovány jako peptidy s méně než 50 aminokyselinami, převážujícím pozitivním nábojem, se zastoupením lysinových a argininových zbytků a značným obsahem (50 % a více) hydrofobních reziduí. Antimikrobiální peptidy mají celou řadu zajímavých vlastností. Především díky svému pozitivnímu náboji reagují s bakteriálními membránami, na kterých převládá za fyziologických podmínek náboj negativní. Těmito membránami pak pronikají prostřednictvím pórů nebo „koberec“ pokrývají membránu a vedou k jejímu narušení. Po proniknutí do cytoplazmy dochází k buněčné smrti např. porušením DNA, RNA, syntézy proteinů nebo respirace⁶. Antimikrobiální peptidy poměrně spolehlivě rozlišují savčí buňky od buněk mikrobiálních, a to na základě složení bakteriální membrány, která na rozdíl od hostitelských buněk postrádá cholesterol a je bohatá na negativně nabitě fosfolipidy. Tyto peptidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, mikroskopickým houbám a protozům. Jejich účinnost byla pozorována již při minimální inhibiční koncentraci (MIC) 0,25–4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Některé kationické peptidy inhibovaly replikaci obalených virů jako virus chřipky A, virus vesikulární stomatitidy (VSV) a viru lidské imunodeficiency (HIV-1). Kationické peptidy mohou rovněž vykazovat protirakovinotvornou aktivitu nebo podporovat hojení. Nedávné studie rovněž indikovaly roli kationických peptidů jako efektorů vnitřní imunitní odpovědi⁷. Některé peptidy jsou v současnosti předmětem výzkumu s potenciálem využití jako lokální prostředky

Tabulka I
Kationické antimikrobiální peptidy ⁶⁷

Peptidy s charakteristickou strukturou	Zdrojový organismus	Antimikrobiální aktivita
<i>Lineární peptidy se strukturou α-helixu</i>		
Cecropiny	hmyz, prase	bakterie, plísně, viry
Clavanin, styelin	pláštěnci	bakterie
Magainin, dermaseptin	obojživelníci	bakterie, protozoa
Buforiny	obojživelníci	bakterie, plísně
Pleurocidin	ryby	bakterie, plísně
Moronecidin	ryby	bakterie
<i>Lineární peptidy bohaté na prolin</i>		
Drosocin, metchnikowin	octomilka	bakterie
Pyrrhocoricin	hmyz	bakterie, plísně
Metalnikowin	hmyz	bakterie, plísně
<i>Lineární peptidy bohaté na glycin</i>		
Diptericiny, attaciny	dvojkřídli	bakterie
Shepherin I a II	rostliny	G-bakterie, plísně
Ac-AMP1, Ac-AMP2	rostliny	G+bakterie, plísně
<i>Lineární peptidy bohaté na histidin</i>		
Histatin	člověk	bakterie, plísně
<i>Lineární peptidy bohaté na tyrosin</i>		
Indolicin	skot	bakterie
Lactoferrin	eukaryota	bakterie
<i>Peptidy s jedním disulfidovým můstkem</i>		
Thanatin	hmyz, rostliny	bakterie, plísně
Brevininy	žába	bakterie
Lanthioniny	G+bakterie	bakterie
<i>Peptidy se dvěma disulfidovými můstky</i>		
Tachyplesin II	krab	bakterie, plísně, viry
Androctonin	štír	bakterie, plísně
Protegrin I	prase	bakterie, plísně, viry
<i>Peptidy se třemi disulfidovými můstky</i>		
α -Defensiny	savci	bakterie, plísně
β -Defensiny	savci	bakterie, plísně
Defensiny	hmyz	bakterie, plísně, protozoa
Panaeidiny	kreveta	bakterie, plísně
<i>Peptidy s větším počtem disulfidových můstků</i>		
Tachycitin	krab	bakterie, plísně
Drosomycin	octomilka	plísně
Gambicin	moskyt	bakterie, plísně, protozoa
Heliomycin	motýl	bakterie, plísně
<i>Rostlinné defensiny</i>		
Defensin protein WT1	rostliny	plísně
alfAFP defensin	rostliny	plísně
Bohaté na cystein	rostliny	bakterie, plísně
So-D1-7	rostliny	bakterie, plísně
DmAMP1	rostliny	plísně

Tabulka II
Nekationické antimikrobiální peptidy ⁶⁷

Peptidy s charakteristickou strukturou	Zdrojový organismus	Antimikrobiální aktivita
<i>Anionické dipeptidy</i>		
<i>Deriváty neuropeptidů</i>		
Enkelytin	lidské sérum	bakterie
Peptid B	lidské sérum	bakterie
<i>Anionické peptidy bohaté na kyselinu asparagovou</i>		
H-GDDDDDD-OH	ovce	bakterie
Dermicidin	člověk	bakterie
Maximin 15	obojživelníci	G+bakterie
<i>Aromatické dipeptidy</i>		
N-β-Alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin	octomilka	bakterie, plísně
p-Hydroxycinnamaldehyd	hmyz	bakterie, plísně
<i>Peptidy odvozené z kyslík-vázajících proteinů</i>		
Peptidy odvozené z hemocyaninu	kreveta	bakterie
Peptidy odvozené z hemoglobinu	hmyz	bakterie
Laktoferrin	člověk	bakterie, viry

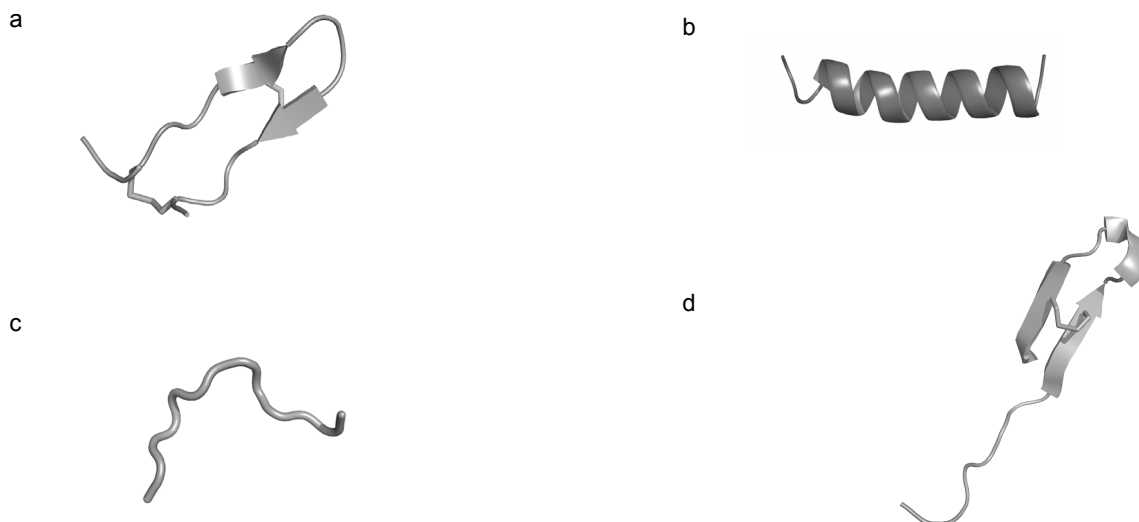
v prevenci bakteriální kolonizace katetrů a prostředky proti akné.

2. Obecná struktura antimikrobiálních peptidů

V současné době je známo mnoho kationických antimikrobiálních peptidů, které byly izolovány z rozmanitého spektra organismů nebo syntetizovány, a lze je najít

v databázi antimikrobiálních sekvencí (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag2.htm>). Peptidy jsou klasifikovány na základě jejich struktury do 4 základních skupin (obr. 1): β-list, α-helix, smyčka a rozvolněné peptidy, z nichž nejvíce zastoupeny jsou první dvě struktury⁸.

Vedle peptidů izolovaných z přírodních zdrojů bylo syntetizováno několik tisíc syntetických variant, které rovněž spadají do výše uvedených strukturních skupin⁹. Typickou vlastností společnou všem antimikrobiálním



Obr. 1. **Strukturní třídy antimikrobiálních peptidů;** (A) β-list, tachyplesin I, (B) α-helix, magainin 2, (C) rozvolněná struktura, indolicidin, (D) smyčka, thanatin. Převzato z databáze Protein Data Bank (PDB)

peptidům je jejich schopnost tvořit amfipatickou nebo amfifilní konformaci, která je charakteristická periodicky se opakujícími úseky, ve kterých se střídají hydrofobní a hydrofilní domény. Schopnost zaujímat amfipatickou konformaci je často indukována interakcí s cytoplazmatickou membránou¹⁰.

Z dosud známých kationických antimikrobiálních peptidů byla struktura většiny objasněna pomocí cirkulárního dichroismu (CD). Ačkoli tato metoda poskytuje relevantní informace o tom, ke které strukturní třídě daný peptid náleží, není natolik detailní, aby objasnila prostorovou konformaci. Proto, aby bylo možné vysvětlit vztah mezi strukturou a aktivitou peptidů, je důležité popsat jejich strukturu co nejpřesněji. Prozatím byla objasněna struktura asi 50 kationických antimikrobiálních peptidů, primárně pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Z těchto 50 struktur 36 jsou peptidy izolované z přírodních zdrojů a 14 jsou syntetická analoga. Přirozeně se vyskytující peptidy byly izolovány z různých organismů: 8 obratlovců, 6 členovců, 6 rostlin, 3 bakterie, 3 hmyz a 1 měkkýš. Příklady peptidů, jejichž struktura je známa, jsou uvedeny v tabulce III. Zde uvedené peptidy byly rozděleny s ohledem na strukturní třídy a jejich ID kódy jsou dostupné v Protein Data Bank (PDB)⁸.

2.1. Specifita antimikrobiálních peptidů a jejich selektivní toxicita

Peptidy s antimikrobiální aktivitou byly izolovány v zásadě ze všech tkání, ve kterých byly nalezeny. Klíčovým okamžikem odhadu jejich potenciální toxicity je rozlišení mezi mikrobiální a hostitelskou buňkou. Přístup peptidů k potenciálně napadnutelné hostitelské tkáni může být omezen buď lokalizací peptidu v buňce nebo vysoce regulovanou expresí.

2.1.1. Srovnání stavby mikrobiálních membrán

Všechny biologické membrány tvoří fluidní mozaika proteinů a fosfolipidů. U některých organismů se na výsledné struktuře povrchu biomembrán podílejí také steroly a glyceridy. Základní složkou všech biomembrán je fosfolipidová dvojvrstva. Tyto membrány jsou amfipatické, což znamená, že mají zároveň hydrofobní i hydrofilní domény. Přesto však lze nalézt mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami významné rozdíly ve složení buněčné membrány. Buněčné membrány složené především z fosfatidylglycerolu, cardiolipinu a fosfatidylserinu nacházíme především u prokaryot, jejichž membrána bývá silně elektronegativní. Dvojvrstvy bohaté na zwitterionické fosfolipidy, fosfatidylethanolamin a fosfatidylcholin, mají oproti tomu neutrální náboj a nacházíme je především v savčí cytoplazmatické membráně. Savčí buňky a buňky hub obsahují v cytoplazmatické membráně navíc ještě steroly, které u prokaryot rovněž nenajdeme. Membrány lidských buněk jako např. erythrocyty se skládají převážně z fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a sfingomyelinu. Pro srovnání ostatní savčí buňky často obsahují méně fosfatidylethanolaminu, ale více sfingomyelinu. Membrány bakteriálních buněk mají oproti tomu mnohem nižší náboj a jsou tvořeny převážně fosfatidylglycerolem a cardiolipinem, které v savčích membránách téměř nenalezneme⁷. Fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin za normálních podmínek nemají žádný náboj. Mimoto analog fosfatidylcholinu, sfingomyelin, obsahující palmitoylový zbytek má také neutrální náboj. V mnoha membránových systémech je zastoupení fosfatidylcholinu a sfingomyelinu nepřímo spjaté. Také steroly, které jsou nalézány ve větší míře u eukaryotických organismů, jsou většinou neutrální. Naproti tomu hydroxylované fosfolipidy fosfatidylglycerol, cardiolipin a fosfatidylserin udržují negativní náboj. Z tohoto pohledu je zřejmé, že náboj biomembrán závisí na stechiometrii a uspořádání fosfolipidů.

Tabulka III

Kationické antimikrobiální peptidy se známou trojrozměrnou strukturou a jejich ID PDB (Identifikační kódy určující trojrozměrnou strukturu z databáze Protein Data Bank)⁸

Příklad peptidu	Struktura	Zdroj	PDB ID
CA-MA	α -helix	syntetický	1D9J
Carnobacteriocin B2	α -helix	<i>Carnobacterium piscicola</i>	1CW5
Magainin 2	α -helix	<i>Xenopus laevis</i>	2MAG
γ -1-P thionin	β -list	<i>Triticum turgidum</i>	1GPS
Ah-Amp 1	β -list	<i>Aesculus hippocastanum</i>	1BK8
β -defensin 12	β -list	<i>Bos taurus</i>	1BNB
Human defensin (HNP-3)	β -list	<i>Homo sapiens</i>	1DFN
Leucocin A	β -list	<i>Leuconostoc gelidum</i>	2LEU
Protegrin-1 (Pg1)	β -list	<i>Sus scrofa</i>	1PG1
Ac-AMP2	rozvolněná	<i>Amaranthus caudatus</i>	1MMC
Indolicidin	rozvolněná	<i>Bos taurus</i>	1G89
Thanatin	smyčka	<i>Podisus maculiventris</i>	8TFV

3. Mechanismy účinku kationických peptidů

Mechanismus účinku kationických antimikrobiálních peptidů je v současnosti aktivně studován a množství dostupných informací stále roste. Většina experimentů se zaměřila primárně na interakce kationických peptidů s modelovými membránovými systémy. Další studie jsou vedeny s ohledem na celou mikrobiální buňku přednostně využívající barviva citlivá ke změně membránového potenciálu a fluorescenčně značené peptidy. Tyto studie prokázaly, že všechny antimikrobiální peptidy interagují s membránami a lze je rozdělit do dvou skupin: peptidy rozkládající membránu a ostatní. Alternativou k tomuto pohledu je hypotéza, že kationické antimikrobiální peptidy mají mnohonásobný účinek na buňku počínaje permeabilizací membrány, účinkem na buněčnou stěnu až k možné inhibici syntézy makromolekul. Proto mechanismus účinku zodpovědný za usmrcení bakterií a minimální efektivní koncentrace se liší u různých peptidů i bakterií¹¹.

Mechanismus účinku je zatím nejlépe prostudován u gramnegativních bakterií. Počáteční interakce peptidu s bakteriální membránou spočívá v elektrostatických interakcích mezi kationickým peptidem a anionickou vrstvou lipidů ve vnější vrstvě membrány vedoucí k rozrušení membrány. Ukazuje se, že kationické peptidy mají větší afinitu k lipopolysacharidům (LPS) ve vnější vrstvě membrány gramnegativních bakterií než k přítomným dvoumocným kationům Mg^{2+} a Ca^{2+} (cit.¹²). Kationické peptidy vytlačí tyto kationy od negativně nabitých LPS, což vede k lokální destabilizaci ve vnější membráně. To podporuje tvorbu destabilizovaných oblastí, přes které se peptid dostane vnější membránou v procesu označovaném jako „vnesezení do buňky podporované samotným peptidem“¹³. Nyní je možný přístup k cytoplazmatické membráně. Peptidy poté interagují s vnější vrstvou cytoplazmatické membrány. Rozdíl mezi membránou narušujícími peptidy a ostatními spočívá v tom, jakým způsobem tato reorientace vede k narušení integrity membrány nebo translokaci peptidů do cytoplazmy.

3.1. Peptidy narušující membránu

Peptidy narušující membránu jsou obecně řazeny do α -helikální strukturní skupiny, ačkoli ne všechny α -helikální peptidy rozrušují membránu. Například buforin, peptid CP10A a analogy pleurocinu zřejmě primárně nenarušují membránu. Narušení cytoplazmatické membrány je vysvětlováno třemi mechanistickými modely: mechanismus „sudové skruže“, mechanismus „micelárních agregátů“ a „kobercový“ model⁷.

Model „sudové skruže“ vysvětluje tvorbu transmembránových pórů reorientací amfipatických peptidů kolmo k membráně a kdy se zarovnávají způsobem, ve kterém postranní hydrofobní řetězce směřují vně do lipidické vrstvy. Polární postranní řetězce směřují dovnitř. Tyto póry umožňují unikání komponent cytoplazmatické membrány a také narušují membránový potenciál. Hlavním argumentem hovořícím proti této hypotéze jsou nedostatky upřed-

nostňovaného tvaru pórů demonstrované širokou variabilitou vzrůstu vodivosti indukovanou peptidy v modelových membránách¹⁴.

V modelu micelárních agregátů se peptidy orientují a asociují do micelárního nebo shlukovitého uspořádání, která zasahují do membrány. Předpokládá se, že kolaps tohoto micelárního agregátu může vysvětlit translokaci do cytoplazmy¹².

U alternativního kobercového mechanismu se peptidy nevmežují do membrány, ale seřazují se paralelně k dvojvrstvě, setrvávají v kontaktu s lipidovými skupinami a účinně pokrývají okolní oblast. Orientace peptidů vede k lokálním poruchám ve stabilitě membrány, což má za následek tvorbu trhlin, vytékání složek cytoplazmy, porušení membránového potenciálu a ve výsledku dezintegraci membrány¹⁵.

Bez ohledu na to, který model je správný, narušení cytoplazmatické membrány má za následek rychlou depolarizaci buněčné stěny vedoucí k buněčné smrti, která u neaktivnějších peptidů nastává během 5 minut¹⁶. Je třeba zmínit, že depolarizace membrány sama o sobě není jediným letálním faktorem a doposud nebyly objasněny všechny fáze vedoucí od narušení membránové integrity k samotné buněčné smrti. Dále je třeba brát v úvahu, že každý z výše uvedených modelů může být správný v závislosti na zkoumaném peptidu. Nedávno bylo např. prokázáno, že nízké koncentrace cecropinu A, klasifikovaného jako lytický peptid, indukují u bakterií změny v transkripci¹⁷. Jiné studie prokázaly, že magainin 2 se může translokovat přímo do cytoplazmy bakterií. Ačkoliv úplný dosah těchto jevů ještě nebyl zcela objasněn, vše nasvědčuje pro účast těchto peptidů v mechanismech, které nesouvisí s narušením membrány¹⁸.

3.2. Jiné mechanismy účinku

U peptidů, které nenarušují buněčnou membránu, se předpokládá působení na cíle v cytoplazmě. Membránová translokace je nyní nejčastěji připisována procesům podobným mechanismu micelární agregace poprvé prokázaném u žabího antimikrobiálního peptidu buforinu II, spíše než vznikem rozsáhlých membránových poruch, prasklina v membráně je dočasná a ke změně propustnosti membrány nedošlo¹⁹. Další studie prováděné s eukaryotickými buňkami prokázaly, že peptidy s vysokým obsahem argininu mají schopnost projít přes buněčnou i jadernou membránu a mohou sloužit jako přenašeče navázaných látek²⁰. Pokud peptid přejde přes buněčnou membránu, předpokládá se u kationických peptidů interakce s DNA, RNA nebo celulárními proteiny a následná inhibice funkce těchto molekul. Tato interakce byla prozatím demonstrována pouze u pokusů *in vitro* a v ostatních studiích byla prokázána inhibice syntézy makromolekul po působení subletálních koncentrací peptidu^{21–23}. Pro doplnění, u určitých peptidů bylo rovněž prokázáno působení na specifické enzymy. Pyrrolicorin, hmyzí peptid bohatý na aminokyseliny prolin, se váže na heat-shock protein DnaK, což zabraňuje správnému sbalení proteinů²⁴, naproti tomu

mersacidin izolovaný z kmene *Bacillus* se váže na lipid II, což vede k zabránění syntézy peptidoglykanu²⁵. Tyto peptidy ztrácejí svou aktivitu mnohem pomaleji než membránově aktivní peptidy, u kterých je jejich antimikrobiální účinek patrný v průběhu minut^{26,27}. U pyrrolicorcinu byla schopnost zasahovat do sbalení proteinu pozorována zhruba po hodině a patrná lýze buňky po působení mersacidinu byla zaznamenána až po 3 hodinách^{24,25}.

4. Vztah mezi strukturou antimikrobiálních peptidů a jejich aktivitou

K diskusi byl pro každou skupinu vybrán reprezentativní zástupce.

4.1. Peptidy se strukturou β -listu

Pro tuto skupinu peptidů je charakteristická struktura β -listu stabilizovaná disulfidovými můstky. U větších peptidů z této strukturní rodiny mohou být rovněž zastoupeny menšinové helikální segmenty. Asi nejlépe charakterizované peptidy se strukturou β -listu jsou malé peptidy tachyplesiny se 17–18 aminokyselinami izolované z krevních buněk japonského kraba *Tachyplesus tridentatus*²⁸. Tachyplesiny představují vhodný základní model těchto antimikrobiálních peptidů pro studie objasňující vztah mezi strukturou a aktivitou vzhledem k jejich malé velikosti a možnosti objasnění jejich struktury pomocí vysoce rozlišovací ¹H NMR. Tachyplesin I vykazuje střední antimikrobiální aktivitu (<12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MIC u *Escherichia coli* K12) a zároveň vysokou afinitu k lipopolysacharidům^{28,29}. I přes to, že struktura tachyplesinů a jejich aktivita *in vitro* je poměrně dobře známá, přesný mechanismus jejich antimikrobiálního účinku je nejasný. Tachyplesiny sice vykazují vysokou afinitu k LPS, avšak předpokládá se, že intracelulární cíle rovněž existují. Ukázalo se, že se tachyplesin I dokáže navázat do menšího žlábků DNA²². Jiné studie zaměřené na strukturně příbuzný peptid polyphemusin I ukazují, že efektivně indukuje přechod přes cytoplazmatickou membránu, ale nezpůsobuje vyplavování calceinu v membránových studiích³⁰. Z toho vyplývá, že tyto antimikrobiální peptidy sice silně narušují stabilitu lipidové membrány, které vede k uspořádání peptidů podél dvojvrstvy, ale nevytvářejí se dlouhodobě póry nebo transmembránové kanály, takže zřejmě mohou fungovat micelárním nebo podobným mechanismem⁸.

Několik strukturních studií se zaměřilo na souvislost mezi přítomností disulfidových můstků a antimikrobiální aktivitou. Linearizace peptidů bylo docíleno přidáním látek chránících –SH skupiny^{31–33} a substitucí jednotlivých aminokyselin^{33,34}. Například lineární tachyplesin s navázanými ochrannými acetamidomethylovými skupinami vykazoval sníženou antibakteriální i antivirální aktivitu a zároveň bylo redukováno uvolňování calceinu z modelových membrán^{31,33}. Calcein známý rovněž jako fluorexon je fluorescenční barvivo, jehož acetomethoxyderivát může být transportován přes buněčnou membránu do

buněk a umožňuje testovat životaschopnost buňky^{35,36}. Ve studiích využívající liposomy a planární lipidové dvojvrstvy bylo prokázáno, že lineární analoga naprosto postrádají schopnost původního peptidu přejít přes membránu³². Analogy tachyplesinu linearizované substitucí aminokyselin se chovaly podobně jako předchozí. Z těchto pokusů je patrné, že ačkoliv stabilizující disulfidové můstky tachyplesinu nejsou absolutně nezbytné pro jeho antimikrobiální aktivitu, pro přechod přes membránu modelových systémů jsou nepostradatelné. Vzhledem k pozorovaným rozdílům v permeabilizaci membrány a jejímu rozrušení lze předpokládat, že mechanismus antimikrobiálního účinku původního a linearizovaného peptidu se liší³².

Nedávno byly pomocí ¹H NMR objasněny základní rozdíly ve struktuře tachyplesinu v roztoku a vázaného na micelární strukturu³⁷. Interakce tachyplesinu s micelami spouští konformační změny, které vedou k ohybání molekuly peptidu kolem centrální aminokyseliny argininu současně s podkrytím postranních hydrofobních řetězců. Lineární analog tachyplesinu, u něhož byly cysteiny nahrazeny tyrosinem, v roztoku zaujímaly náhodnou konformaci, avšak po navázání na micely byla výsledná konformace výrazně odlišná od nemodifikovaného tachyplesinu. Z toho je zřejmé, že disulfidové můstky se značnou měrou podílí na stabilitě molekuly, jejíž interakce s membránou je podmíněna ohybem molekuly. Tato strukturní flexibilita zřejmě umožňuje molekule peptidu přechod přes buněčnou membránu, ač se původně předpokládalo, že β -vlásečková struktura je rigidní⁸.

4.2. Peptidy s α -helikální strukturou

Pro tuto skupinu peptidů je charakteristická α -helikální konformace. Často je v centru molekuly patrný ohyb. V jedné studii bylo prokázáno, že toto zakřivení bylo utlumením hemolytické aktivity zásadní pro selektivitu peptidu³⁸. Za nejlépe charakterizované zástupce této skupiny považujeme magaininy izolované z kůže africké žaby *Xenopus laevis*. Magainin 1 a 2 sestávají z 23 aminokyselin a vykazují antimikrobiální účinek střední intenzity (MIC proti *E. coli* 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$)³⁹. Struktura magaininu 2 byla určena pomocí ¹H NMR v přítomnosti SDS micel. Peptid zaujímá α -helikální konformaci a mírným ohybem mezi 12. a 13. aminokyselinou⁴⁰.

Antimikrobiální účinek magaininu se připisoval selektivní permeabilizaci bakteriální membrány, která vede k výkyvům v membránovém potenciálu⁴¹. Představa tohoto mechanismu je dále podpořena pozorováním, že nejsou patrné rozdíly v účinku mezi D- a L-enantiomery peptidu, což vylučuje možnost chirálního receptoru nebo enzymu jako cíle^{42,43}. Provedené experimenty směřují k vysvětlení mechanismu účinku magaininu pomocí micelárního modelu, kde magainin interaguje se záporně nabitými fosfolipidy, spontánně vytváří dočasné póry v membráně, které po kolapsu membrány umožní peptidu přejít do vnitřní vrstvy^{44,45}. Tento předpoklad demonstrují pokusy s modelovými systémy a depolarizace membrány v přítomnosti magaininu byla zaznamenána u *E. coli*^{46,47}.

Spolu s objevem α -helikálních magaininů byl studován vztah mezi strukturou peptidů a jejich aktivitou. Z *N*-terminálního zkrácení magaininu 2 je zřejmé, že první tři zbytky nehrají klíčovou roli v antimikrobiální aktivitě, avšak delece čtvrté aminokyseliny výrazně snižuje antimikrobiální působení a další odstranění páté a šesté aminokyseliny vede k úplné ztrátě antimikrobiální aktivity. Předpokládá se, že zkrácení peptidu na méně než 20 aminokyselin vede v konečném výsledku k tomu, že peptid není schopen překlenout lipidovou dvojvrstvu, a to vysvětluje z mechanického hlediska současnou ztrátu antimikrobiální aktivity⁴⁸.

Interakce kationických peptidů s negativně nabitým povrchem buněk je nutným prvním krokem u obou typů mechanismů. Zůstává klíčovým úkolem objasnit síly, které vedou k příznivé interakci peptidu s buněčnou membránou stejně jako se přesvědčit, jestli jsou k sobě přitahovány pouze elektrostatickými silami. Přínos náboje k aktivitě magaininu 2 byl zkoumán s použitím analog s lišicím se kladným nábojem⁴⁹. Bylo zjištěno, že zvýšení náboje k +5 doprovází zvýšení antimikrobiální aktivity. Dalším zvýšením náboje k +7 se nezměnila maximální aktivita zjištěná při náboji +5, avšak zvýšila se hemolytická aktivita. Zajímavé je, že v experimentech používající modelové membrány tvořené anionickým lipidem fosfatidylglycerolem se zjistilo, že zvýšení náboje peptidu vede ke snížení schopnosti proniknout membránou. To je pravděpodobně důsledek současného snížení hydrofobicity, které doprovází zvýšení náboje⁸.

4.3. Peptidy s rozvolněnou strukturou

Peptidy s rozvolněnou strukturou postrádají klasickou sekundární strukturu, zpravidla v důsledku vysokého zastoupení prolinu a glycinu. Ve skutečnosti tyto peptidy nevytvářejí svou finální strukturu intramolekulárními vodíkovými vazbami, ale pomocí vodíkových vazeb a van der Waalových interakcí s membránovými lipidy. Ze zástupců této skupiny lze jmenovat přirozeně se vyskytující indolicidin⁵⁰, Ac-AMP2 (cit.⁵¹) nebo syntetické peptidy Pw2 (cit.⁵²) nebo tripticin⁵³. Asi nejlépe charakterizovaným zástupcem této skupiny kationických antimikrobiálních peptidů je indolicin bohatý na tryptofan a prolin. Indolicin byl izolován z cytoplazmatických granulí lidských neutrofilů, skládá se ze 13 aminokyselin s amidovaným C-koncem. Mezi těmito 13 aminokyselinami je tryptofan zastoupen v 5 případech, což z indolicinu dělá peptid s nejbohatším známým zastoupením tryptofanu⁵⁴. Konformace indolicinu závisí na okolním prostředí. Struktura indolicinu byla determinována s využitím metody ¹H NMR v micelách tvořených SDS nebo zwitterionickým dodecylfosfocholinem (DPC)⁵⁵. V obou lipidových prostředích molekuly indolicinu zaujímají rozvolněnou konformaci, ačkoli v neutrálních DPC micelách zaujímá molekula více ohnutou strukturu díky přítomnosti dvou poloohybu u pátého a osmého aminokyselinového zbytku. U indolicinu byla zaznamenána střední antimikrobiální aktivita (MIC 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proti *E. coli*)⁵⁶, avšak ve srovnání

s ostatními peptidy např. s vlásenkovou strukturou (tachyplesin) nemá výraznou afinitu k LPS⁵⁷.

Antimikrobiální mechanismus indolicinu doposud nebyl uspokojivě vysvětlen. Předpokládalo se, že indolicin způsobuje narušení cytoplazmatické membrány vytvářením kanálů změnou membránového potenciálu⁵⁶. Tato hypotéza byla obecně přijímána vzhledem k malé velikosti indolicinu, která by umožňovala jeho přechod skrz biologickou membránu⁵⁵. Avšak v experimentech s celými buňkami, kdy bylo usmrceno více než 99 % bakterií, se neprokázala schopnost indolicinu úplně depolarizovat cytoplazmatickou membránu *E. coli*⁵⁸ ani *S. aureus*⁵⁹, což hovoří proti předpokládanému mechanismu rozpadu membrány. Ačkoli u *E. coli* může indolicin zřejmě jako důsledek inhibice syntézy DNA způsobit filamentaci, což ukazuje na to, že přechod přes membránu zřejmě probíhá⁶⁰. Ve shodě s modelem micelárních agregátů vysvětlují mechanismus účinku indolicinu obě hypotézy, kdy vytváření neobvyklých transmembránových kanálů při kolapsu buňky vede ke vniknutí peptidu do cytoplazmy⁸.

Při pokusech s modelovými membránami se prokázalo, že indolicin není efektivní při přechodu přes membránu a předpokládá se, že je u bakterií nutný membránový gradient alespoň –140 mV k tomu, aby translokace mohla proběhnout. Pro pochopení strukturních podmínek pro antimikrobiální působení indolicinu bylo syntetizováno několik analog. Do popředí zájmu se dostala dvě analoga, CP-11 se zvýšeným kladným nábojem a CP10A, u kterého byly všechny proliny nahrazeny alaninem, a která vykazovala vyšší aktivitu na grampozitivní i gramnegativní bakterie. U peptidu CP-11 vedlo zvýšení náboje ke snížení schopnosti vmezeřit se do membránové vrstvy, k uvolňování calceinu a bez membránového potenciálu k přechodu přes membránu téměř nedošlo. V případě modifikovaného peptidu CP10A došlo ke zvýšení schopnosti začlenění se do membrány, překlápění lipidů a snadnějšímu přechodu přes membránu, zatímco uvoňování calceinu bylo sníženo⁶¹. Strukturální analýza pomocí ¹H NMR odhalila, že substituce prolinu alaninem znemožňuje peptidu CP10A zaujmout při přiblížení membráně helikální konformaci na rozdíl od původní rozvolněné struktury indolicinu^{55,62}. Zdá se tedy, že u skupiny indolicinů způsobují změny v aktivitě peptidů především konformační změny spíše než změny náboje či hydrofobicity. Změna konformace z rozvolněné struktury na helikální vedla k intenzivnějšímu začlenění do membrány a přechodu, což má za následek lepší přístup do cytoplazmy a zde umístěným intracelulárním cílům⁸.

4.4. Peptidy se strukturou smyčky

Pro tuto třídu peptidů je charakteristická smyčková struktura, která je dána přítomností jednoduché vazby (disulfidové, amidové nebo isopeptidové). Zástupcem s podrobně objasněnou strukturou je thanatin skládající se z 21 aminokyselinových zbytků, který byl izolován z brouka *Podiscus maculiventris*⁶³. Podrobná struktura thanatinu popsána pomocí ¹H NMR potvrdila antiparalelní β -list

tvořený aminokyselinovými zbytky 8–21 a stabilizovaný disulfidovým můstkem mezi zbytky 11 a 18 (cit.⁶⁴). U thanatinu byla zaznamenána vedle mírné antibakteriální aktivity proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím rovněž aktivita antifungální, což je srovnatelné s aktivitou peptidů se strukturou β -listu.

Ačkoli přesný mechanismus účinku thanatinu dosud nebyl objasněn, předpokládá se, že cílem není cytoplazmatická membrána. Mechanismus usmrcení bakteriálních buněk zřejmě závisí na konkrétním mikroorganismu, zvláště s přihlédnutím k faktu, že ačkoli D- i L-enantiomery jsou stejně aktivní proti grampozitivním bakteriím a plisním, L-thanatin vykazuje aktivitu pouze na gramnegativní bakterie. Toto nasvědčuje tomu, že u gramnegativních bakterií se vyvinul stereospecifický cíl typu receptoru, zatímco u grampozitivních bakterií a mikroskopických vláknitých hub dominují nespecifické interakce. Studie věnující se závislosti aktivity peptidu na struktuře odhalily, že zkrácení C-terminálního konce nebo N-terminálního konce o více než tři aminokyseliny významně redukuje aktivitu izolovaného smyčkového úseku peptidu⁶³.

5. Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům

5.1. Konstitutivní rezistence

Konstitutivní rezistence vůči antimikrobiálním peptidům byla pozorována u bakterií rodu *Proteus*, *Serratia* a často i *Pseudomonas*. Jedním z možných důvodů této rezistence je elektrostatická afinita mezi antimikrobiálními peptidy a bakteriální stěnou. Další možnou příčinou rezistence může být nevhodný energetický metabolismus nebo růstová fáze mikroorganismu. Opouzdřené bakterie jsou často rezistentní nejen k antimikrobiálním peptidům, ale rovněž k opsonizaci či fagocytóze. Tvorba bakteriálního pouzdra nebo biofilmu zvyšuje rezistenci jak k antimikrobiálním peptidům, tak k syntetickým antibiotikům, což je typické pro rody a druhy bakterií *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus anthracis*¹.

5.2. Adaptivní rezistence

Salmonella typhimurium přežívá v makrofázích díky změnám vnější membrány, navíc produkuje proteasy, které snadno rozloží antimikrobiální peptidy. Produkce proteas poskytuje rezistenci i bakteriím jako *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* a *Streptococcus pneumoniae*. *Haemophilus influenzae* často exprimuje vysoké množství fosfatidylcholinu, jež imituje fosfatidylcholin v savcích membránách, díky tomu na něj antimikrobiální peptidy neúčinkují. Změna fluidity, potenciálu a složení bakteriální stěny vede také k rezistenci vůči antimikrobiálním peptidům. Příkladem může být modifikace fosfatidylcholinu (inkorporace D-lysinu do fosfatidylcholinu) nebo kyseliny lipoteichoové (inkorporace D-alaninu) vedoucí k redukci negativního náboje a rezistenci k antimikro-

biálním peptidům. Za rezistenci mohou být zodpovědné rovněž genetické mutace. Kupříkladu mutace genu *mur B* vede ke změnám struktury peptidoglykanu u kmene *Staphylococcus aureus* a výsledné rezistenci k působení některých antimikrobiálních peptidů. U pathogenu *Neisseria gonorrhoeae* bylo rovněž pozorováno zpětné vyloučení peptidů, které do buňky již pronikly¹.

6. Perspektivy praktického využití antimikrobiálních peptidů

Hlavní motivací pro vývoj peptidů s terapeutickým účinkem spočívá převážně v jejich různých způsobech aplikace. Efektivní může být jejich samotný antimikrobiální nebo imunomodulační účinek nebo mohou působit synergicky s již známými antibiotiky. Antimikrobiální peptidy vykazují aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů a ačkoliv jejich účinek není tak silný jako u běžně používaných antibiotik, jejich hlavní výhodou je jejich antimikrobiální efekt na multirezistentní kmeny. Ačkoli interakce peptidů s cytoplazmatickou membránou je zjevná a některé peptidy mají schopnost narušit membránu již při jejich minimální inhibiční koncentraci (MIC), u některých peptidů byl prokázán jejich přechod přes cytoplazmatickou membránu a následný vliv na intracelulární procesy v buňce. Minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace jsou často velmi podobné, což naznačuje, že antimikrobiální peptidy mají v drtivé většině baktericidní účinek. Vedle toho na antimikrobiální peptidy nevzniká rezistence tak často a snadno jako na klasická antibiotika, a proto se stávají významnými činiteli v boji proti multirezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Avšak existují i mikroorganismy, které jsou vůči antimikrobiálním peptidům přirozeně rezistentní, např. *Burkholderia*, *Proteus* nebo *Serratia* sp.⁶⁵.

Počátečním bodem pro vývoj nových peptidových preparátů je jejich izolace z přírodních zdrojů a následná modifikace jejich struktury. Tímto výzkumem se zabývá např. společnost Micrologix (<http://www.migenix.com>), v minulosti se mu rovněž věnovaly dnes již neexistující společnosti Magainin Pharmaceuticals a IntraBiotics. Mezi peptidové preparáty „první generace“ se řadí např. pexiganan odvozený z magaininu 2 nebo IB 367 odvozený z prasečího protegrinu. Vývoj těchto preparátů byl pozastaven, neboť se neprokázala očekávaná účinnost nebo byl preparát shledán příliš toxickým. Jeden z preparátů, který byl úspěšný ve třetí fázi klinických zkoušek, je MX-226 (Migenix) odvozený z peptidu na bázi indolicinu. Tento preparát byl vyvinut pro prevenci kontaminace žilních katétrů a vykazoval 49% pokles infekcí a 21% pokles kolonizace katétrů. Dalším úspěšným preparátem je MX594AN na bázi indolicinu (Migenix) určený pro léčbu mírného až středního akné. Z dalších preparátů lze jmenovat např. Pexiganan v podobě krému pro léčbu impetiga a kožních vředů nebo Isegranin v podobě ústního roztoku^{6,65,66}.

7. Závěr

Ačkoli množství antimikrobiálních peptidů, jejichž chemická struktura již byla objasněna, stále roste, počet peptidů s přesně známou strukturou je stále relativně malý. Analýzy, které zkoumají vztah struktury a aktivity, prozatím odhalily dvě hlavní podmínky pro antimikrobiální aktivitu – kladný náboj a indukovanou amfipatickou konformaci. Ve skutečnosti jsou zřejmě nutné i změny konformace na aktivnější strukturu. Třeba u tachyplesinu s β -vlásečkovou strukturou se předpokládalo, že jeho struktura zůstává rigidní, avšak v lipidovém prostředí dochází k výrazným změnám ve struktuře. Studie zkoumající mechanismus účinku se zaměřily primárně na chemické a strukturní vlastnosti peptidů, na ostatní faktory již méně. Speciálně komponenty membrán mohou mít významný vliv na antimikrobiální aktivitu peptidů. Lze zmínit především lipidy, jejichž rozmanitost u různých mikroorganismů může uspokojivě vysvětlit rozdíly v aktivitě peptidů u jednotlivých bakteriálních druhů.

Seznam zkratk

DPC	dodecylfosfocholin
LPS	lipopolysacharidy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PDB	databáze Protein Data Bank
SDS	sodiumdodecylsulfát
VSV	virus vesikulární stomatitidy

Tato studie byla podpořena granty GA ČR 522/09/1693, MSM 60461375, GA ČR 305/09/H008.

LITERATURA

1. Marková J.: *Alergie* 4, 332 (2007).
2. Bechinger B., Lohner K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1529 (2006).
3. Fales – Williams A. J., Brogden K. A., Huffman J. M., Gallup J. M., Ackermann M. R.: *Vet. Pathol.* 39, 706 (2002).
4. Heidari M., Hamir A., Cutlip C. R., Brogden K. A.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 69 (2002).
5. Brogden K. A., Ackermann M. R., McCray P. B. Jr., Huttner K. M.: *Infect. Immun.* 67, 4256 (1999).
6. Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).
7. Yeaman M. R., Yount N. Y.: *Pharmacol. Rev.* 55, 27 (2003).
8. Powers J. P. S., Hancock R. E. W.: *Peptides* 24, 1681 (2003).
9. Blondelle S. E., Lohner K.: *Biopolymers* 55, 74 (2000).
10. Rotem S., Mor A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1582 (2009).
11. Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086 (2000).
12. Hancock R. E. W., Chapple D. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317 (1999).
13. Epand R. M., Vogel H. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 11 (1999).
14. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 7235 (1999).
15. Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y.: *Biochemistry* 31, 12416 (1992).
16. Friedrich C., Scott M. G., Karunaratne N., Yan H., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1542 (1999).
17. Hong R. W., Shchepetov M., Weiser J. N., Axelsen P. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1 (2003).
18. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K.: *Biochemistry* 34, 6521 (1995).
19. Park C. B., Yi K. S., Matsuzaki K., Kim M. S., Kim S. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8245 (2000).
20. Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K.: *J. Biol. Chem.* 276, 5836 (2001).
21. Park C. B., Kim H. S., Kim S. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 253 (1998).
22. Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y.: *Biochemistry* 31, 2998 (1992).
23. Patrzykat A., Friedrich C. L., Zhang L., Mendoza V., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 605 (2002).
24. Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B. A., Hoffman R., Otvos Jr. L.: *Biochemistry* 40, 3016 (2001).
25. Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl H. G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 154 (1998).
26. Giacometti A., Cirioni O., Barchiesi F., Del Prete M. S.: *Peptides* 20, 1265 (1999).
27. Giacometti A., Cirioni O., Greganti G., Quarta M., Scalise G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3320 (1998).
28. Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S.: *J. Biol. Chem.* 263, 16709 (1998).
29. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1562, 32 (2002).
30. Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 35714 (2001).
31. Matsuzaki K., Nakayama M., Fukui M., Otaka A., Funakoshi S., Fujii N.: *Biochim. Biophys. Acta* 32, 11704 (1993).
32. Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y.: *Biochemistry* 36, 9799 (1997).
33. Tamamura H., Ikoma R., Niwa M., Funakoshi S., Murakami T., Fujii N.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 41, 978 (1993).
34. Rao A. G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 361, 127 (1999).
35. Shimanouchi T., Ishii H., Yoshimoto N., Umakoshi H., Kuboi R.: *Colloids Surf., B* 73, 156 (2009).
36. Fujita T., Yamada H., Fukuzumi M., Nishimaki A.,

- Yamamoto A., Muranishi S.: *Life Sci.* 60, 303 (1996).
37. Laederach A., Andreotti A. H., Fulton D. B.: *Biochemistry* 41, 12359 (2002).
 38. Zhang L., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 8102 (1999).
 39. Zasloff M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5449 (1987).
 40. Gesell J., Zasloff M., Opella S. J.: *J. Biomol. NMR* 9, 127 (1997).
 41. Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 391 (1998).
 42. Bessalle R., Kapitkovsky A., Gorea A., Shalit I., Fridkin M.: *FEBS Lett.* 274, 151 (1990).
 43. Wade D., Boman A., Wahlin B., Drain C. M., Andreu D., Boman H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4761 (1990).
 44. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K.: *Biochemistry* 34, 6521 (1995).
 45. Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1327, 119 (1997).
 46. Juretic D., Chen H. C., Brown J. H., Morell J. L., Hendler R. W., Westerhoff H. V.: *FEBS Lett.* 249, 219 (1989).
 47. Juretic D., Hendler R. W., Kamp F., Caughey W.S., Zasloff M., Westerhoff H. V.: *Biochemistry* 33, 4562 (1994).
 48. Zasloff M., Martin B., Chen H. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 910 (1988).
 49. Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M.: *FEBS Lett.* 501, 146 (2001).
 50. Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W., Cullor J. S.: *J. Biol. Chem.* 267, 4292 (1992).
 51. Martins J. C., Maes D., Loris R., Pepermans H. A., Wyns L., Willem R.: *J. Mol. Biol.* 258, 322 (1996).
 52. Trabi M., Schirra H. J., Craik D. J.: *Biochemistry* 40, 4211 (2001).
 53. Schibli D. J., Hwang P. M., Vogel H. J.: *Biochemistry* 38, 16749 (1999).
 54. Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W., Cullor J. S.: *J. Biol. Chem.* 267, 4292 (1992).
 55. Rozek A., Friedrich C. L., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 39, 15765 (2000).
 56. Falla T. J., Karunaratne D. N., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 271, 19298 (1996).
 57. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1562, 32 (2002).
 58. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 7235 (1999).
 59. Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086 (2000).
 60. Subbalakshmi C., Sitaram N.: *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 91 (1998).
 61. Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 35714 (2001).
 62. Friedrich C. L., Rozek A., Patrzykat A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 24015 (2001).
 63. Fehlbauer P., Bulet P., Chernysh S., Briand J. P., Roussel J. P., Letellier L., Hetru Ch., Hoffmann J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1221 (1996).
 64. Mandard N., Sodano P., Labbe H., Bonmatin J. M., Bulet P., Hetru C., Ptak M., Vovelle F.: *Eur. J. Biochem.* 256, 404 (1998).
 65. Marr A. K., Gooderham W. J., Hancock R. E. W.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468 (2006).
 66. Andres E., Dimarcq J. L.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 448 (2005).
 67. Vizioli J., Salzet M.: *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 494 (2002).

I. Doležilková^{a,b}, M. Macková^{a,b}, and T. Macek^{a,b}

(^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Joint Laboratory of IOCB and Institute of Chemical Technology, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Antimicrobial Peptides: The Relationship of Their Structure and Antibacterial Activity**

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important component of natural defence of most living organisms against invading pathogens. AMPs are mostly cationic and amphipathic peptides (mol. weight <10 kDa) of variable length, amino acid sequence and structure. In the past two decades several AMPs have been isolated from a wide variety of animals, both vertebrates and invertebrates, and plants as well as from bacteria and fungi. The peptides exhibit a broad-spectrum antimicrobial activity against a wide range of microorganisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, yeasts, fungi and viruses. A few peptides are also cytotoxic to sperm and tumour cells. AMPs are classified by three-dimensional NMR structure analysis. To date, a number of AMPs have been chemically characterized. Structure-activity studies reveal two main requirements for antimicrobial activity – a positive charge and an induced amphipathic conformation. AMPs are excellent candidates for novel antimicrobial agents; a few peptides have undergone clinical trials.

PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH DERIVÁTY CHUTI PÁLIVÉ

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

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, FarmF UK v Praze, 500 05 Hradec Králové, ^c Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavel.Drasar@vscht.cz

Došlo 24.11.10, přijato 3.3.11.

Klíčová slova: přírodní látka, pálivá a palčivá chuť, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Alkaloidy
3. Sloučeniny obsahující síru
4. Terpeny
5. Fenoly
6. Sloučeniny zvýrazňující pálivou chuť
7. Závěr

1. Úvod

Ze všech smyslů je to pravděpodobně chuť, která přináší lidem největší potěšení. Ovšem vnímání chuti jídla je složitý proces, podporovaný i dalšími smysly, čichem, zrakem a v menší míře i hmatem a sluchem. Pálivá chuť není obecně považována za jeden z chuťových principů (sladký, slaný, kyselý, hořký a umami)¹, možná proto tuto vlastnost, podobně jako chuť svíravou, někteří autoři zařazují mezi pocity², což jistě laskavý čtenář shledá plausibilním, pokud si sáhne prstem od paprik do oka, nebo bude sledovat pocity ve svém zažívacím traktu po požití několika papriček jalapeño (čti halapeño). V této souvislosti je nutno podotknout, že starobylé indické učení o holistické medicíně, ayurveda, uvádí pálivou chuť (katu) mezi šesti základními chutěmi: sladká (madhura), kyselá (amla), slaná (lavana), hořká (tikta) a svíravá (kashaya). Tento článek je dalším z řady přehledů, ve kterých popisujeme přírodní látky a potravní doplňky^{3–6} a které mohou sloužit jako učební pomůcka.

V literatuře je možno nalézt několik přehledných prací na toto téma^{7–9}. Pálivá chuť je v angličtině označová-

na obecně jako „hot“ (ostře kořeněný, pálivý, palčivý či pepřený), nicméně např. v Merckově Indexu¹⁰ se dozvíme, že kapsaicin je „pungent principle of *Capsicum*“ (palčivý, štiplavý nebo ostrý; s tím souhlasí i pojetí ayurvedické); táž kniha uvádí i termín „acrid“ (ostrý, štiplavý, trpký), „burning“ (palčivý, pálivý), a další. Podle četnosti v odborné literatuře odpovídá českému termínu pálivý nejlépe anglický výraz „pungent“.

Přírodní látky pálivé chuti jsou tradičně přidávány do potravin jako koření, a to zejména různé druhy pepře (rod *Piper*, čeleď *Piperaceae*) a papriky (*Capsicum* spp., *Solanaceae*), česnek, cibule (*Alium sativa* a *A. cepa*, *Liliaceae*), ředkvičky, hořčice a další brukvovité (*Brassicaceae*) rostliny (wasabi, křen japonský zelený (*Wasabia japonica* (Miq.) Matsum.), květák, zelí, brokolice, tuřín, kapusty, kedlubny, ředkve, řepka, řeřicha), kaparovité (*Capparidaceae*) a rezedovité (*Resedaceae*). Zdrojem pálivých látek je i zázvor (*Zingiber officinale*, *Zingiberaceae*), asa foetida neboli čertovo lejno (*Ferula assafoetida* L.; *Apiaceae*), bazalka a šalvěj, (*Occimum basilicum* a *Salvia officinalis*, *Lamiaceae*), skořice (*Cinnamomum verum*, *Lauraceae*), hřebíček (*Syzygium aromaticum*, *Myrtaceae*), vřesna, voskovník a další. Ayurveda uvádí použití pálivých potravin a bylin zevně k podpoře prokrvení, a obecně k léčení špatného zažívání, dysenterie, nachlazení a chřipky, astmatu, kašle, obesity, diabetu, některých kožních chorob a proti parazitům. Naopak jsou ayurvedou kontraindikovány při zánětech trávicího ústrojí, krvácivosti, pocitech pálení, reprodukčních problémech a zadržování moči.

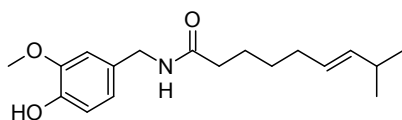
2. Alkaloidy

Podíváme-li se na dvě nejdůležitější kuchyňské přísady, na pepř a papriku, najdeme v obou alkaloidy. Plody a výrobky z pálivých paprik, jako feferonky a jalapeño, chilli, cayennský pepř a podobně (*Capsicum* spp.) jsou pálivé proto, že rostliny syntetizují a akumulují ve svých tkáních kapsaicin a celou skupinu jeho analogů, známých jako kapsaicinoidy. Tyto sekundární metabolity, ceněné zejména v orientální a mexické kuchyni¹², jsou důležité nejen v potravinářství, ale nalézají uplatnění i v kosmetickém, vojenském a farmaceutickém průmyslu¹³. Pálivé látky z paprik způsobují zvýšení sekrece katecholaminů z dřene nadledvin u anestezizovaných krys¹⁴. Kapsaicinoidy ovlivňují vnímání bolesti a termoregulaci¹⁵. Jejich působení na nociceptivní (to jest přijímající, či vedoucí škodlivé zejména bolestivé podněty) nervová zakončení je zprostředkováno membránovým receptorem spáženým s kationtovým kanálem, označovaným TRPV1 (transient receptor potential ion channel of the vanilloid type 1). TRPV1 se aktivuje i dalšími, strukturně odlišnými, látkami

Tabulka I
Škála pálivé chuti (Scoville scale)

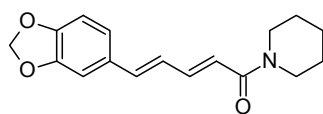
Pálivost	Příklad
15000000–16000000	kapsaicin
8600000–9100000	kapsaicinoidy jako homokapsaicin
5000000–5300000	pepřový sprej
855000–1075000	Naga Jolokia
350000–580000	Red Savina habanero
100000–350000	Habanero chili, jamajský pepř
50000–100000	thajský pepř
30000–50000	kayenský pepř, papričky tabasco
10000–23000	pepř serrano
2500–8000	jalapeño, maďarská pálivá paprika, omáčka „Tabasco“ (červená)
500–2500	anaheimský pepř
100–500	pimento, peperoncini
0	bez pálivé chuti, sladká paprika

odvozenými od kyseliny vanilové a také bez přítomnosti ligandu teplem (nad 42–45 °C) a kyselým extracelulárním prostředím (pH pod 6,3) (cit.^{16–18}). Nezbytným předpokladem aktivity kapsaicinoidů je přítomnost amidové vazby, naproti tomu délka řetězce amidově vázané karboxylové kyseliny má pouze modulační účinek. Obdobné látky s esterovou vazbou, nazývané kapsinoidy, které vznikají v kultivarech s mutací genu pro aminotransferasu zodpovědnou za konverzi vanilaldehydu na vanilamin, jsou neaktivní^{19,20}.

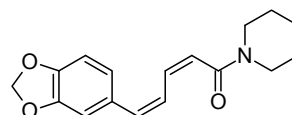


kapsaicin

Druhé nejběžnější pálivé koření, pepř černý (*Piper nigrum*), je klasicky znám tím, že obsahuje až 5 % alkaloidů piperinu a chavicinu. Blíže se nedávno na identifikaci alkaloidů pepře podívali na univerzitě v Kielu a zjistili, že chavicin, o němž se předpokládalo²¹, že je *cis,cis*-piperinem, je ve skutečnosti směsí piperinu a dalších minoritních alkaloidů. Za pálivou chuť pepře černého a dalších členů čeledi *Piperaceae* je tedy zodpovědný zejména sám piperin²². Analogů piperinu a podobných alkaloidů bylo izolováno několik desítek²³. Piperin není genotoxický a má protirakovinné a protimutagenní účinky²⁴.

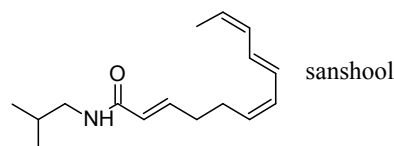


piperin

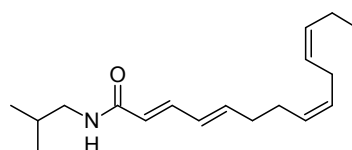


předpokládaná struktura chavicinu

Z japonského (sečuánského) pepře (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC./*Fagara rhetsa* (Roxb.) DC.; Huajiao, žlutodřev pepřový) a dalších příbuzných bylin byl izolován pálivý amid sanshool a jeho deriváty²⁵ a rovněž pálivý hazaleamid²⁶.

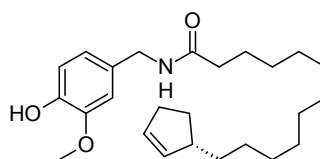


sanshool

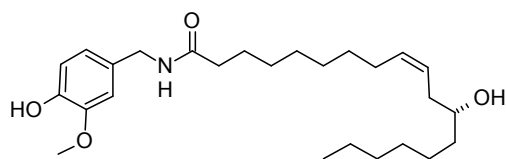


hazaleamid

Z kořenů *Heliopsis longipes* (Gray) Blake²⁷ byly izolovány chaulmoogramidy a příbuzné sloučeniny pálivé chuti.



N-vanillyl-chaulmoogramid

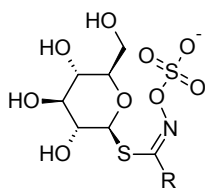


N-vanillylricinoleamid

Obecně se soudí, že alkaloidy mají hořkou až pálivou chuť, ale systematická studie zde chybí.

3. Sloučeniny obsahující síru

Rostliny řádu brukvotvaré (*Brassicales*) obsahují glukosinoláty, po staru též thioglukosidy, ještě dříve jako hořčičné oleje. Např. v semeni řepky je kolem deseti glukosinolatů, přičemž progoitrin a glukonapin tvoří 75–90 % z nich. Glukosinoláty jsou dobře rozpustné ve vodě a mohou se v roztoku hydrolyzovat. Glukosinoláty a jejich některé štěpné produkty vyvolávají vjemy palčivosti, štiplavosti, případně hořkosti^{28,29}.



obecný vzorec glukosinolatů

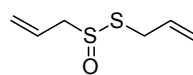
R = -CH₂CH₂CH=CH₂, glukonapin

R = -CH₂CH=CH₂, sinigrin

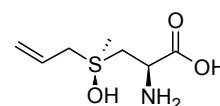
R = -CH₂CH(OH)CH=CH₂, progoitrin

Rozumný příjem glukosinolatů v potravě může být velmi prospěšný, neboť tato skupina látek a jejich deriváty a metabolity slouží jako přírodní pesticidy. V současnosti se věnuje pozornost jejich možné roli v prevenci rakoviny (cit.³⁰). Při dlouhodobém a nadměrném příjmu glukosinolatů může dojít ke snížení produkce thyroxinu T₄, k hypertrofii štítné žlázy, vzniku krvácivosti jater a za určitých okolností k poklesu plodnosti³¹. Některé hořčičné oleje obsahují příjemně cibulově vonící allylkyanid¹⁰.

Řada přírodních zdrojů, jako např. česnek, cibule, asa foetida (čertovo lejno) obsahují další plejádu sirných sloučenin. Česnek (*Allium sativum* L.), zejména ten čerstvě rozdrčený, obsahuje biologicky aktivní a charakteristicky páchnoucí allicin, který je tvořen enzymem alliinasou z nepáchnoucího alliinu, právě tehdy, je-li česnekový stroužek čerstvě rozdrčen. Z česneku se připravuje tzv. česnekový olej, který má charakteristický zápach a obsahuje řadu sirných látek, jako diallyldisulfid, diallyltrisulfid, methylallyltrisulfid, methylallyldisulfid, a diallylsulfid. Česnekový olej má antimikrobiální účinek a působí příznivě na srdce a cévy; používá se v potravinářství¹⁰.

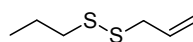


allicin



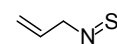
alliin

Z cibule (*Allium cepa* L.) je podobně připravován cibulový olej, který obsahuje allylpropyldisulfid, S-(1-propenyl)cystein-sulfoxid a 1-propenylsulfenovou kyselinu, o té se soudí, že je hlavní slzotvornou látkou cibule³². Nicméně jsou v cibuli zastoupeny podobné látky jako v česneku, které se ostatně vyskytují ve všech druzích rodu *Allium* L. Štiplavou vůni opět udává allicin.



allylpropyldisulfid

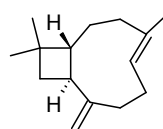
V kari koření (curry), skořici, hořčici a dalších přírodních zdrojích se kromě výše popsaných glukosinolatů (hořčice) vyskytuje i pálivý allylisothiokyanát¹⁴. V semenech hořčice se vyskytuje jako hlavní pálivá složka ve formě glykosidu sinigrinu (viz výše), ze kterého je allylisothiokyanát uvolněn hydrolyzou. Ve skořicové kůře se vyskytuje jako druhá pálivá složka skořicový aldehyd³³.



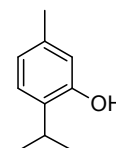
allylisothiokyanát

4. Terpeny

Bazalka (*Ocimum basilicum* L.; Herba Basilici) je na chuť nasládlá ale zároveň pálivá. Vůně a pálivý pocit jsou připisovány terpenům, zejména protizánětlivému β-karyofylenu a thymolu, jejichž obsah se liší mezi jednotlivými varietami. β-Karyofylen je obsažen rovněž v hřebíčku (hřebíčkovec vonný (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et L. M. Perry)), konopí setém (*Cannabis sativa* L.), rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis* L.) a chmelu otáčivém (*Humulus lupulus* L.) a thymol v tymiánu obecném (*Thymus vulgaris* L.) a zavínutce tečkované (*Monarda punctata* L.).

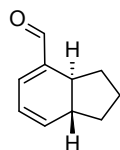


β-karyofylen



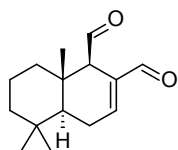
thymol

Černý kardamon (*Amomum aromaticum* Roxb.; droga (plod) Fructus amomi tsaoko) obsahuje pálivý *trans*-2,3,3a,7a-tetrahydro-1*H*-inden-4-karbaldehyd označovaný jako t-THIC cpd, který je pozoruhodný tím, že byl izolován kombinací kapalinové chromatografie a testování chuti jednotlivých frakcí³⁴.



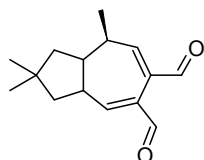
t-THIC cpd

Persicaria odorata (Lour.) Soják a *Persicaria hydro-piper* (L.) Spach obsahují pálivý polygodial a řadu dalších terpenických analogů. Tyto látky, kromě toho, že mají pálivou chuť, působí i jako antifeedanty, tj. omezují požer listů. Lze tedy soudit, že jedna z funkcí látek pálivé chuti v přírodě může být obrana rostlin proti škůdcům³⁵.



polygodial

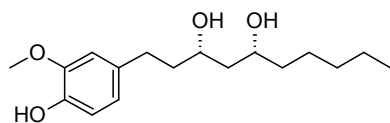
Z pálivé silice z *Lippia hastulata* (Grisebach) Hieron byla získána celá řada chuťově aktivních látek, 50–55 % z obsahu byly terpenické uhlovodíky. Silice je používána jako populární lék při žaludečních obtížích³⁶. Nenasycené seskviterpeny marasmanového a laktaranového typu, např. laktardial, jsou chuťovými principy pálivých ryzců (rod *Lactarius*), např. kravského, pepného a pýřitého (*L. torminosus*, *L. piperatus* a *L. vellereus*). Chuťově aktivní dialdehydy vznikají po poranění plodnice sledem enzymově katalyzovaných reakcí z prekursorů, jimiž jsou estery seskvitertepenových diolů s mastnými kyselinami^{37,38}.



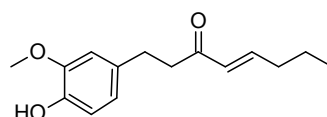
laktardial

5. Fenoly

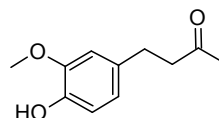
Celá řada přírodních sloučenin má pálivou chuť, ale neobsahuje ani alkaloidy, ani sírné sloučeniny ani terpeny. Je zde ale výrazná skupina fenolických látek. Pokud začneme v této skupině zázvorem (*Zingiber officinale* Rosc.), jsou za pálivou chuť zodpovědné gingerol a shogaol a jejich deriváty a dále zingeron. 6-Gingerol má antibakteriální, protizánětlivé, antitumorové a antiangiogenní aktivity³⁹.



gingerol

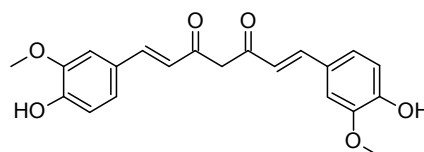


shogaol



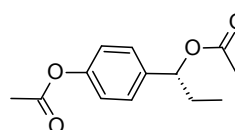
zingeron

Kurkuma (*Curcuma domestica* Val. / *Curcuma longa* L.) a samozřejmě karí koření obsahují pálivý kurkumin. Šalvěj (*Salvia officinalis* L.) obsahuje pálivý kurkumin též.

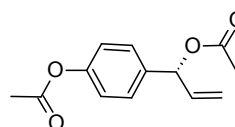


kurkumin

Dihydrogalangal-acetát z kořenů siamského zázvoru (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) a jeho nenasycený analog byly shledány jako sloučeniny zodpovědné za pálivou chuť galangalu. Prvá z nich je stálejší a používá se v potravinářství.



dihydrogalangal-acetát



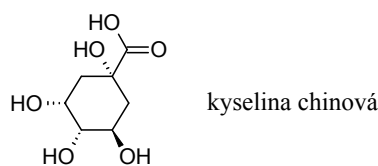
galangal-acetát

6. Sloučeniny zvýrazňující pálivou chuť

Každý, kdo se napil alkoholického nápoje po požití ostrého jídla, ví, že alkohol zesiluje pálivý pocit. Ne nadarmo se v Rusku vyráběla vodka Pertsovka.

Kyselina chinová (nesprávně nazývaná kyselina chininová), je látka získávaná např. z chinovníku, čajových lístků a kávových zrn. Ona a její deriváty mohou být použity v koncentraci 0,1–500 ppm jako zesilovače pálivého pocitu např. u wasabi, česneku, zázvoru a feferonek. Zde je vidět, že i přestože jsou pálivé chuti různých odstínů, jsou pravděpodobně vázány na podobný mechanismus účinku⁴⁰.

Byla provedena i studie a potvrzeno vzájemné synergické působení obsahových látek česneku a látek s chutí umami⁴¹.



7. Závěr

Přehled přírodních látek pálivé a ostré 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 chuťových látek použitelných nejen v humánní, ale i zemědělské praxi (živočišné výrobě, kde se mohou uplatnit jako prostředek regulující krmení) je však jen jednou stránkou problému pálivého pocitu: druhou je hledání postupů (a látek) – modifikátorů vnímání, které mohou tento vjem naopak tlumit. Dokud však nebudou dobře známy molekulární mechanismy principů vnímání těchto pocitů, budeme jen na začátku tohoto studia „tlumení chuti pálivé“, tak jako v současnosti.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a specifického výsokoškolského výzkumu 2010-SVV-2010-261-002.

LITERATURA

- Chandrashekar J., Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: *Nature* 444, 288 (2006).
- Noble A. C.: *Chemistry of Wine Flavor, ACS Symposium Series* 714, 156 (1998).
- 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).
- Čopíková J., Moravcová J., Lapčík O., Opletal L., Drašar P.: *Chem. Listy*, v tisku.
- Kawada T.: *Rinsho Eiyo* 81, 529 (1992); *Chem. Abstr.* 118, 79871 (1993).
- Freist W.: *Chemie Uns. Zeit* 25, 135 (1991).
- Ziegler H. (ed.): *Flavourings*, 2. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- The Merck Index, 13. vyd. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
- Peter K. V. (ed), *Handbook of Herbs and Spices* Vol 1, CRC Press, 2001.
- Xue D.: *Zhongguo Tiaoweipin* 9, 37 (2004); *Chem. Abstr.* 144, 50588 (2005).
- Ochoa-Alejo N.: *Methods Mol. Biol.* (Clifton, N.J.) 318, 327 (2006).
- Kawada T., Sakabe S., Watanabe T., Yamamoto M., Iwai K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188, 229 (1988).
- Liu L., Wang Y., Simon S. A.: *Pain* 64, 191 (1996).
- Kress M., Zeilhofer H. U.: *TiPS* 20, 112 (1999).
- Holzer P.: *Eur. J. Pharmacol.* 500, 231 (2004).
- Špicarová D., Paleček J.: *J. Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3), S69 (2008).
- Kobata K., Todo T., Yazawa S., Iwai K., Watanabe T.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 1695 (1998).
- Tanaka Y., Hosokawa M., Miwa T., Watanabe T., Yazawa S.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 1761 (2010).
- Buchheim R.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 5, 455 (1876).
- Grewe R., Freist W., Neumann H., Kersten S.: *Chem. Ber.* 103, 3752 (1970).
- Freist W.: *Chem. Unserer Zeit* 25, 135 (1991).
- Srinivasan K.: *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 735 (2007).
- Sugai E., Morimitsu Y., Iwasaki Y., Morita A., Watanabe T., Kubota K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1951 (2005).
- Shibuya H., Takeda Y., Zhang R. S., Tong R. X., Kitagawa I.: *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2325 (1992).
- Dominguez J. A., Diaz G. L., de los Angeles Vinales M. D.: *Ciencia (Mexico City)* 17, 213 (1957).
- Katalog krmiv, ÚVŽP Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*, Brno 2007, http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/krmiva/ (staženo 5/8 2010).
- Fahey J. W., Zalcman A. T., Talalay P.: *Phytochemistry* 56, 5 (2001).
- Hayes J. D., Kelleher M. O., Eggleston I. M.: *Eur. J. Nutr.* 47 (Suppl 2), 73 (2008).
- Lapčík O.: *Czech J. Food Sci.* 22, 29 (2004).
- Virtanen A. I.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 74, 374 (1962).
- Iwasaki Y., Tanabe M., Kobata K., Watanabe T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2608 (2008).
- Starkenmann C., Mayenzet F., Brauchli R., Wunsche L., Vial C.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 10902 (2007).
- Caprioli V., Cimino G., Colle R., Gavagnin M., Sodano G., Spinella A.: *J. Nat. Prod.* 50, 146 (1987).
- Pereyra L.: *Univ. Nacl. Tucuman Museo Historia Natural* 8, 3 (1926); *Chem. Abstr.* 22, 1099 (1928).
- Bergendorff O., Sterner O.: *Phytochemistry* 27, 97 (1988).
- Sterner O., Bergman R., Franz C., Wickberg B.: *Tetrahedron Lett.* 26, 3163 (1985).
- Kim E. C., Min J. K., Kim T. Y., Lee S. J., Yang H. O., Han S., Kim Y. M., Kwon Y. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 300 (2005).
- Togawa M., Maeda K., Matsumoto K., Masuda H.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP* 2005204555 (2005); *Chem. Abstr.* 143, 171860 (2005).
- Fuke S., Konosu S.: *Psychol. Behav.* 49, 863 (1991).

O. Lapčík^a, L. Opletal^b, J. Moravcová^a, J. Čopíková^c, and P. Drašar^a (^a *Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b *Department of the Chemistry of Natural Products, Pharmaceutical Faculty, Charles University, Hradec Králové,* ^c *Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*):
Natural Compounds and Their Derivatives of Hot or Pungent Taste

The review article brings a comprehensive survey of compounds with hot or pungent taste and of compounds responsible for modifications of this sensation. It is aimed as teaching material for students and teachers. It may bring some information to food and other specialists.

SLANÁ CHUŤ PŘÍRODNÍCH LÁTEK A JEJICH DERIVÁTŮ

LUBOMÍR OPLETAL^a, ZDENĚK WIMMER^{b,c},
JANA ČOPÍKOVÁ^d, OLDŘICH LAPČÍK^b,
JITKA MORAVCOVÁ^b, LUCIE CAHLÍKOVÁ^a
a PAVEL DRAŠAR^b

^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 Ústav experimentální botaniky AV ČR, Izotopová laboratoř, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, ^d Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavel.Drasar@vscht.cz

Došlo 5.8.11, přijato 30.8.11.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: přírodní látka, chuť slaná, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Látky slané chuti
3. Trocha teorie o chuti slané
4. Závěr

1. Úvod

Chuťové vjemy jsou dlouhou dobu předmětem vědeckého výzkumu¹. Tento článek je dalším z řady přehledů, ve kterých popisujeme rozmanitost přírodních látek^{2–5} a který může sloužit i jako vhodná učební pomůcka.

Slaná chuť je klasicky jedním z pěti chuťových principů (sladký, slaná, kyselý, hořký a umami)⁶. Organoleptický vjem na různé chuti může být přidáním slané komponenty značně modifikován, což od nepaměti vědí například kuchaři, neb dobré cukroví či dobrá káva se bez špetky soli udělat nedá⁷. Hledání látek se slanou chutí (mimo Na⁺) je záležitostí velmi žádoucí, protože kuchyňská sůl je významným rizikovým faktorem pro hypertenzi – osoby s tímto onemocněním mají značně zvýšený chuťový práh pro NaCl na rozdíl od normotoničků. Slaná chuť je velmi důležitá pro regulaci příjmu Na⁺. Nerovnováha tohoto kationtu v organismu vyvolává řadu neurokrinních změn spojených se snahou změnit intenzitu slané chuti. Dochází

k zásahu do systému RAAS (renin-angiotenzin-aldosteron), který hraje velmi důležitou roli ve vnímání slané chuti, resp. odrazu obsahu Na⁺ v těle. Některé citlivé mozkové neurony regulují citlivost na slanou chuť a tím regulují příjem sodíku⁸. Při poruše však dojde ke změně rozlišovací schopnosti chuťových buněk jazyka pro NaCl a tím ke zvýšenému příjmu a podpoře esenciální hypertenze. Samotné akceptování slané chuti jedincem je však z fylogenetického hlediska složité, jak ukázaly studie komerčních potravinářských výrobků⁹. Situace je komplikována navíc faktem, že vnímání slané chuti může být u jedinců fixováno geneticky¹⁰. Zvýšený příjem soli je významným rizikovým faktorem nejen pro postižení kardiovaskulárního systému, ale ve svém důsledku i pro případné nastartování Alzheimerovy choroby, která velmi často začíná po ischemizaci mozkové cévy, resp. po prodělaném infarktu (mozkové mrtvici).

2. Látky slané chuti

Samozřejmě, že slanou chuť budeme hledat u soli kamenné, chloridu sodného. Čistý chlorid sodný, nicméně, bude mít jinou chuť, než mořská sůl a u všech bude oscilovat kolem chuti vysloveně slané, někdy s nádechem sladké, jindy hořké, nebo kovové¹¹. Typická „slaná“ chuť některých mořských řas je způsobena vyváženou směsí solí sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku, železa a stopových prvků¹². Obecně pak chuť solí závisí jak na kationtu, tak na aniontu¹³. Nejběžnější soli se slanou chutí jsou LiCl, LiBr, LiI, NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI. Nejslanější chuť má však NaCl¹⁴. Slanou chuť s chladivou příchutí a „pálivou“ dochutí¹⁵ má KNO₃. Slanohořkou chuť pak mají např. KCl, KBr, NH₄Cl a NH₄I. U vápenatých solí již hořká chuť převládá, záleží však na koncentraci. Organické soli sodíku a lithia jsou pak o poznání méně slané¹⁶ než NaCl. Ostrost slané chuti NaCl ovlivňuje přítomnost zinku v organismu¹⁷. Byla studována i závislost slané chuti na přítomnosti řady kationtů¹⁸.

V dnešní době hojně, zejména v USA, prodáváná „sůl s nízkým obsahem sodíku“ je převážně chlorid draselný, který však zanechává hořkou či kovovou pachutí. Objevují se ale i slané potraviny se sníženým obsahem chloru¹⁹.

Zbývá se tedy zamyslet nad reálnou cestou, jak dopřát příjemci slanou chuť a přitom snížit obsah kuchyňské soli na minimum. Nabízejí se tři cesty:

- 1) Ovlivnit chuťové receptory (mozkové signální cesty) neslanými látkami, které změněnou expresi proteinů, vycházejících z ovlivnění receptoru pro slanou chuť navodí u uživatele nižší potřebu solení. Ačkoliv jsou v tomto směru už jisté výsledky a různé nálezy, tento přístup je v současnosti spíše utopický: naprosto není známo, jak takové látky mohou ovlivnit jiné receptory nebo enzymové systémy v těle.

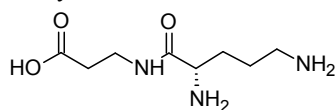
- 2) Najít přírodní látky, které by byly netoxické, bez problému metabolizovatelné, nevykazovaly by žádnou pachut' a byly by slanější než kuchyňská sůl. Po dlouholetých zkušenostech populace s umělými sladidly *versus* sacharosa můžeme (ještě) dnes říci, že je to postup stejně utopický jako v bodě 1).
- 3) Nalézt netoxické přírodní látky, které velmi silně zvýrazní přirozenou slanou chut' chloridu sodného do té míry, že bude možné jeho obsah v potravinách a nápojích redukovat do nízké míry. Tento přístup se zdá být v současnosti jediný reálný a náš příspěvek se v hlavní míře zabývá právě jím.

Se slanými organickými látkami je to složité, již proto, že při poptávce po „bio“ a „organických“ potravinách jsou obchodníci (např. The Salt Seller Ltd. Hereford, UK) ochotni prodávat i organickou sůl kuchyňskou (NaCl).

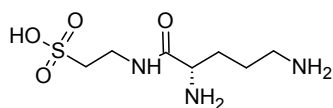
Nicméně i zde se dá leccos zajímavého najít. Skupina sloučenin, zasahujících do slané chuti, není nijak široká; zpravidla se jedná o malý počet látek (včetně kovových solí některých organických kyselin, nepočítáme-li běžné soli anorganické), které se v zesilovačích slané chuti střídavě objevují v závislosti na patentových možnostech a komerčním zájmu.

Mezi prvními látkami, které tuto chut' ovlivňují, je nutné jmenovat některé primární metabolity – aminokyseliny, případně proteiny. Tyto látky samy o sobě čistě slanou chutí většinou nedisponují, ale markantně zvýrazňují slanosť chloridu sodného. Zvýšení slané chuti (a tím redukce množství NaCl) bylo nalezeno u leucinu²⁰, případně také u isoleucinu. Směs leucinu nebo isoleucinu s KCl a glutamátem sodným dovede údajně výrazně zvýšit slanou chut' potravin a nápojů²¹. Podobně působí směs obsahující hydrochlorid lysinu, KCl a malé množství jantarové kyseliny; tato směs maskuje hořkou pachut' KCl a kromě toho saturuje vhodně organismus esenciální aminokyselinou^{22,23}. Další bazickou aminokyselinou amplifikující slanou chut' kuchyňské soli je arginin (D- i L-forma) kombinovaný s KCl^{24,25}.

V případě některých oligopeptidů byly zjištěny také zajímavé organoleptické vlastnosti. Je popsáno²⁶, že L-ornithyl-β-alanin je slaný a že jeho slanosť závisí na hodnotě pH a přítomných iontech.



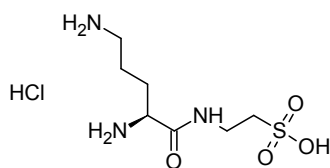
L-ornithyl-β-alanin



L-ornithyl-taurine

„Údajná“ původně deklarovaná²⁷ slaná chut' „peptidu Beefy-Meaty“ L-ornithyltaurin-monohydrochloridu byla podrobena rozsáhlému zkoumání ve firmě Nestlé; bylo zjištěno, že slanou chut' nemá²⁸. Autoři tohoto článku si

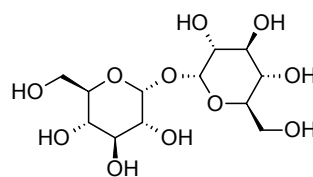
dovolují vyslovit domněnku, že půjde spíše o chut' umami, která může být „slaná“ podobná²⁹.



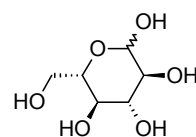
L-ornithyltaurin-monohydrochlorid

Jako zvýrazňovače slané chuti mohou fungovat určité peptidy a proteiny, resp. hydrolyzáty z ryb (sardel obecná – *Engraulis encrasicolus*), nebo z rostlinných bílkovin (semena sóji – *Glycine max*, pšenice – *Triticum aestivum* anebo kukuřice – *Zea mays*). Tyto proteiny jsou většinou nevýrazného zápachu, slané chuti, jsou rozpustné ve vodě a jejich chut' je zvýrazňována přidávkou některých solí (KCl, MgCl₂), bazickými aminokyselinami, případně glukonanem sodným^{30–32}.

Z ostatních primárních metabolitů se jeví jako zajímavé glykosylderiváty α,α-trehalosu. Slanou chut' (a také chut' umami) výrazně zvyšuje α,α-maltosyl-trehalosa více než samotná trehalosa³³. Za slabě slanou považovali někteří i L-glukosu³⁴.



α,α-trehalosa



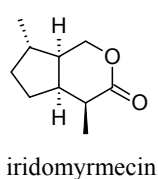
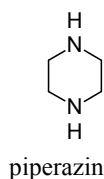
L-glukosa

Existuje poměrně kuriózní nález v oblasti mastných kyselin: hovoří o tom, že tuky a oleje, které obsahují více než 70 hmotnostních procent olejové kyseliny, mohou výrazně zvyšovat slanou chut' jídel a nápojů³⁵.

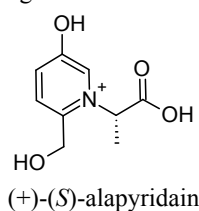
Jako amplifikátory slané chuti by se údajně mohly uplatnit také některé sloučeniny, jejichž základem jsou nukleové base, např. 5'-inosinová kyselina (5'-IMP) nebo 5'-guanosinová kyselina (5'-GMP) ve směsi s aminokyselinami, glukosou, některými draselnými solemi a hydrolyzovaným rostlinným proteinem³⁶, anebo 5'-ribonukleotid s rozvětvenými aminokyselinami³⁷.

V oblasti sekundárních metabolitů rostlin nenacházíme prozatím výrazné množství sloučenin, o kterých by mohlo být uvažováno jako o látkách nahrazujících sůl.

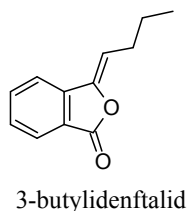
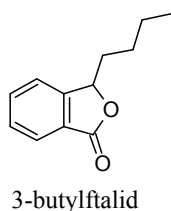
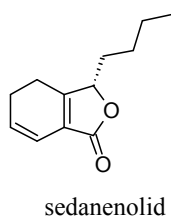
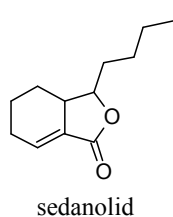
Slanou chut' mají piperazin a iridomyrmecin, izolovaný z argentinských mravenců *Iridomyrmex humilis*²⁷.



Je-li přidán pyridinový derivát (+)-(S)-alapyridain (*N*-(1-karboxy-ethyl)-6-hydroxy-methyl-pyridinium-3-ol) k potravinám, výrazně ovlivňuje práh chuti; snižuje práh pro sladkou chuť sacharosy a glukosy, chuť umami a také slanou chuť. Podílí se rovněž na výrazné synergizaci slané chuti např. po aplikaci L-argininu³⁸.



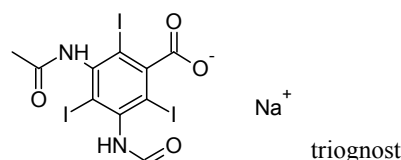
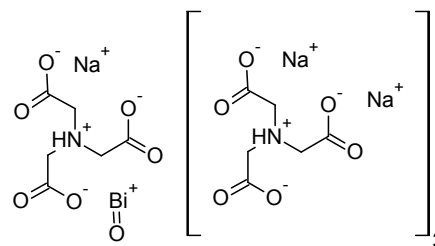
Slanou chuť zvyšují také některé ftalidy (sedanolid, sedanenolid, 3-butyľftalid, 3-butyľidenftalid), aniž by zvyšovaly chuť k příjmu potravy³⁹.



Indolové deriváty, připravené polosynteticky zvyšují slanou chuť opět ve směsi s argininem, navíc s některými alifatickými kyselinami a jejich solemi (mléčnou, jablečnou, citronovou, jantarovou)⁴⁰.

Slabě slanou chuť má bistrimát $C_{24}H_{28}BiN_4Na_7O_{25}$ a diagnostikum triognost, sodná sůl kyseliny 3,5-bis-(acetylamino)-2,4,6-triiodobenzoové; má ji i enzym chymosin (rennin, ECN 3.4.23.4), součást syřidla používaného pro výrobu sýrů⁴¹.

Lyofilizované extrakty z *Salicornia herbacea* (suché listy), *Laminaria japonica* (stélka) a *Lycium chinensis* (kukoshi; suché plody) byly zkoumány jako náhražka potravinářské NaCl. Bylo zjištěno, že jejich slanost relativně k NaCl je 0,65, což vedlo k předpokladu, že takové látky skutečně mohou sůl nahradit⁴². Jde o sprejově sušené vodné extrakty, u kterých nebylo prozatím objasněno, jaké

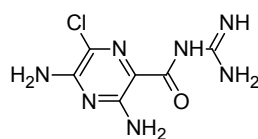


metabolity mohou slanou chuť podporovat. Z těchto vegetabilních zdrojů však výrazně vyčnívají dvě rostliny: *Salicornia herbacea* (salikornie bylinná) a *Apium graveolens* (mrkvička celer). Salikornie je rostlinou halofytní, rostoucí v příslušných teplých oblastech a z toho plyne, že její morfologické části budou obsahovat zvýšené množství NaCl. Nechceme však předjímat, že by tato skutečnost byla v nějaké souvislosti se slanou chutí vysušeného vodného extraktu z nadzemní části. V některých případech je totiž použit extrakt získaný fermentací nadzemní části⁴³, což dává vznik představě o přítomnosti už dříve zmíněných organických látek slané chuti, peptidů nebo proteinů. Domníváme se rovněž, že podobným případem je mrkvička celer. Nadzemní část celeru je enzymaticky zpracována, vodný produkt vysušen a navržen pro zvýšení slané chuti potravin. Může se zde opět uplatnit vliv proteinů (peptidů) vzniklých fermentací rostlinné tkáně a navíc zde určitou roli mohou hrát některé ftalidy, které jsou zcela běžné pro čeled' mrkvičovitých⁴⁴.

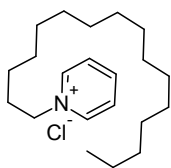
3. Trocha teorie o chuti slané

Soudí se, že jeden způsob vnímání slané chuti je vyvolán některými kationty a je ovlivněn cetylpyridinium-chloridem, zatímco druhý mechanismus je selektivně stimulován ionty Na^+ a inhibován amiloridem⁴⁵. Za vnímání slané chuti je zodpovědný protein TRPM3 (MCO3)⁴⁶. Je však možné usoudit, že vnímání slané chuti u kojenců se vyvíjí až po odstavení⁴⁷. Je popsáno, že při zánětech trojklanného nervu je práh pocitu slané chuti zvýšen⁴⁸.

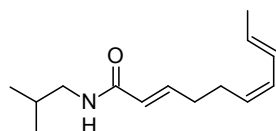
Je také známo, že člověk může pociťovat slanou a někdy i slano-kovovou chuť při některých chorobách a při stavech silné dehydratace. Sám pocit slané chuti v ústech může být spojen také s Sjögrenovým syndromem, bakteriální infekcí, zánětem (sialadenitis) nebo infekcí slinných žláz, kdy je slaná chuť slin často velmi výrazná.



amilorid

cetylpyridinium-
chlorid

Je též zajímavé, že vnímání chuti KCl a NaCl může být jak zesíleno, tak zeslabeno, pokud jsou v různých koncentracích přítomny kyseliny octová, jantarová či citronová⁴⁹, přestože pocit slanosti nezávisí na pH⁵⁰. Kyselina hyaluronová pak modifikuje slanou chuť k „příjemné“⁵¹. Je dostatečně známo, že soli kyseliny glutamové zesilují pocit slané chuti, méně je známo, že tak mohou způsobovat i látky chuti chladivé⁵² či vůně sojové omáčky⁵³. Slanou chuť zesiluje i L-leucin²⁰ a L-arginin³⁸, ale i například kapsaicin⁵⁴. Spilanthiol zesiluje slanou chuť a neovlivňuje chuť umami⁵⁵.



spilanthiol

Bylo též překvapivě zjištěno, že muži, kteří měli otce alkoholika, méně tolerují slaná a kyselá jídla⁵⁶.

Při zkoumání možností, jak snížit použití NaCl v potravinách, bylo zjištěno, že pocit slanosti může být zvýšen při použití hyperosmotických roztoků obsahujících až 30 % polymerních kompozit, jak například dextranů⁵⁷.

4. Závěr

Přehled přírodních látek slané chuti ukazuje zajímavost této skupiny sloučenin, přispívá k poznání biodiverzity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, například potravinářských a farmaceutických chemiků při hledání nových možností využití takových látek v praxi. Je vidět z připojené literatury, zejména patentové, že jde o tematiku velmi aktuální. Hledání nových spojitostí mezi vnímáním chutí použitelných nejen v humánní, ale i zemědělské praxi (živočišné výrobě, kde se mohou uplatnit jako krmení ovlivňující) je však jen jednou stránkou problému, druhou je hledání postupů (a látek) – modifikátorů vnímání²⁹, které mohou tento vjem zesilovat nebo tlumit, zvláště pokud se budou více brát na ohled teorie jako ta, že chuťové, barevné a zvukové vjemy spolu významně souvisejí⁵⁸.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a grantu NAZV ČR č. 111A166.

LITERATURA

- Boudreau J. C.: *Naturwissenschaften* 67, 14 (1980).
- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy* 100, 778 (2006).
- Lapčík O., Opletal L., Moravcová J., Čopíková J., Drašar P.: *Chem. Listy* 105, 452 (2011).
- 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).
- Chandrashekar J., Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: *Nature* 444, 288 (2006).
- Němcová B.: *Sůl nad zlato*, Junior, Říčany u Prahy 2008.
- Lu B., Yan J.: *Shengli Kexue Jinzhan* 42, 43 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 570193 (2011).
- Drake S. L., Lopetcharat K., Drake M. A.: *J. Dairy Sci.* 94, 636 (2011).
- By Feeney E., O'Brien S., Scannell A., Markey A., Gibney E. R.: *Proc. Nutr. Soc.* 70, 135 (2011).
- Heath H. B.: *Source Book of Flavors*, Van Nostrand Reinhold, New York 1981.
- Page L.: http://www.byregion.net/articles-healers/Sea_Greens.html (staženo 30. 12. 2010).
- DeMan J.M., *Principles of Food Chemistry*, 3. vydání, Aspen Publishers, Gaithersburg 1999.
- Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy & Physiology*, Pearson Education, San Francisco 2007.
- Ash M., Ash I.: *Handbook of Preservatives*, Synapse Information Resources, Endicott 2004.
- Van Der Klaauw N. J., Smith D. V.: *Physiol. Behavior* 58, 295 (1995).
- Ahn E. J., Noh H. Y., Chung J., Paik H. Y.: *Korean J. Nutr.* 43, 132 (2010).
- Ichikawa T., Shimomura M.: *Food Sci. Technol. Res.* 16, 31 (2010).
- Chiba S., Saegusa T., Ishii M.: *PCT Int. Appl.* (2010), WO 2010150918. Application: WO 2010-JP61227 20100624. *Chem. Abstr.* 154, 1626625 (2010).
- Harada Y., Sakimori M., Nishimura T.: *Nippon Aji to Nioi Gakkaishi* 14, 441 (2007); *Chem. Abstr.* 148, 115060 (2008).
- Nishimura T., Sakimori M., Harada Y.: *PCT Int. Appl.* WO 2008120726 A1 20081009 (2008); *Chem. Abstr.* 149, 1212172 (2008).
- Berglund K. A., Alizadeh H.: US 5897908 A 19990427 (1999); *Chem. Abstr.* 130, 295832 (1999).
- Berglund K. A., Alizadeh H.: *PCT Int. Appl.* WO 9727763 A1 19970807 (1997); *Chem. Abstr.* 127, 532204 (1997).
- Brand J., Riha W. E. III, Breslin P. A. S.: *Abstr. Papers*, 236th ACS Natl Meet., Philadelphia, PA, United States, August 17–21, 2008, AGFD-261 (2008); *Chem. Abstr.* 948981 (2008).
- Shimono M., Sugiyama K., Matsuzaki T., Nishizawa S.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 2011062168 A 20110331 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 395011 (2011).

26. Seki T., Kawasaki Y., Tamura M., Tada M., Okai H.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 25 (1990).
27. Nakamura K., Kuramitsu R., Kataoka S., Segawa D., Tahara K., Tamura M., Okai H.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2481 (1996).
28. Tuong H.B., Philippoussian G.: *J. Agric. Food Chem.* 35, 165 (1987).
29. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 1002 (2007).
30. Di Cesare L. F.: *LWT-Edition*, 7 (Prog. Food Eng.), 741 (1983); *Chem. Abstr.* 100, 66789 (1984).
31. Shimono M., Sugiyama K., Omine K., Ichikawa A.: *PCT Int. Appl. WO* 2011034133 A1 20110324 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 371496 (2011).
32. Shimono M., Sugiyama K., Omine K., Ichikawa A.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 2011062171 A 20110331 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 394800 (2011).
33. Nishida T., Ikegami S., Saito N., Miyake T.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 2009082070 A 20090423 (2009); *Chem. Abstr.* 150, 446621 (2009).
34. Boyd W. C., Matsubara S.: *Science* 137, 669 (1962).
35. Kanamori H., Iida T., Matsumoto A.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 2006262896 A 20061005 (2006); *Chem. Abstr.* 145, 1029449 (2006).
36. Mohlenkamp M. J. Jr., Hiler G. D.: *US* 4243691 A 19810106 (1981); *Chem. Abstr.* 94, 190549 (1981).
37. Tanizawa J., Fushimi Y.: *PCT Int. Appl. WO* 2008126678 A1 20081023 (2008); *Chem. Abstr.* 149, 1278249 (2008).
38. Soldo T., Blank I., Hofmann T.: *Chem. Senses* 28, 371 (2003).
39. Kurobayashi Y., Nakai S., Kubota K.: *PCT Int. Appl. WO* 2011059047 A1 20110519 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 618158 (2011).
40. Maekawa T., Eto Y., Amino Y., Tahara Y., Miyaki T., Saikawa W., Kai Y., Ishiwatari Y.: *PCT Int. Appl. WO* 2011010748 A1 20110127 (2011); *Chem. Abstr.* 154, 105408 (2011).
41. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
42. Lee G.H.: *Food Res. Int.* 44, 537 (2011).
43. Cha K. J.: *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo KR* 2004096850 A 20041117 (2004); *Chem. Abstr.* 145, 805184 (2006).
44. Bhowmik T., Myaka S. I., Van Leersum J. P., Smith R. W.: *PCT Int. Appl. WO* 2009114954 A1 20090924 (2009); *Chem. Abstr.* 151, 1165120 (2009).
45. Stahler F., Riedel K., Demgensky S., Neumann K., Dunkel A., Taubert A., Raab B., Behrens M., Raguse J.D., Hofmann T., Meyerhof W.: *Chemosens. Percept.* 1, 78 (2008).
46. Sugita M.: *Cellul. Mol. Life Sci.* 63, 2000 (2006).
47. Schwartz C., Chabanet C., Boggio V., Lange C., Issanchou S., Nicklaus S.: *Arch. Pediatr.* 17, 1026 (2010).
48. Siviero M., Teixeira M. J., de Siqueira J. T. T., Siqueira S. R. D. T.: *Oral Diseases* 16, 482 (2010).
49. Murata Y., Kataoka-Shirasugi N., Amakawa T.: *Chem. Senses* 27, 57 (2002).
50. Kuramitsu R.: *Recent Adv. Food Flavor Chem.* 326, 224 (2010).
51. Buonpensiero P., de Gregorio F., Sepe A., di Pasqua A., Ferri P., Siano M., Terlizzi V., Raia V.: *Adv. Therapy* 27, 870 (2010).
52. Čopíková J., Moravcová J., Lapčík O., Opletal L., Drašar P.: *Chem. Listy* 105, v tisku.
53. Shimoda M.: *Nippon Aji to Nioi Gakkaishi* 14, 3 (2007); *Chem. Abstr.* 148, 531810 (2007).
54. Narukawa M., Sasaki S., Watanabe T.: *Food Sci. Technol. Res.* 17, 167 (2011).
55. Miyazawa T., Matsuda T., Muranishi S., Miyake K.: *JP* 2006296357 *Chem. Abstr.* 145, 1146774 (2006).
56. Sandstrom K.A., Rajan T.M., Feinn R., Kranzler H.R.: *Alcoholism – Clin. Exper. Res.* 27, 955 (2003).
57. Koliandris A.L., Michon C., Morris C., Hewson L., Hort J., Taylor A.J., Wolf B.: *Chemosens. Percept.* 4, 9 (2011).
58. Simner J., Cuskley C., Kirby S.: *Perception* 39, 553 (2010).

L. Opletal^a, Z. Wimmer^{b,c}, J. Čopíková^d, O. Lapčík^b, J. Moravcová^b, L. Cahlíková^a, and P. Drašar^b
^(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)Institute of Experimental Botany AS CR, Isotope Laboratory, Prague, ^(d)Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague): **Salty and Metallic Taste of Natural Compounds and Their Derivatives**

A brief survey of the naturally occurring compounds and their derivatives with salty taste aims to show the importance of this group of renewable materials, to contribute to the knowledge of the biodiversity of secondary metabolites that can be utilized, among others, in food and pharmaceutical industry. The article is also aimed as a teaching tool for teachers and students. Mainly from the patent literature it may be seen that this topic is very actual.

PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH DERIVÁTY CHUTI CHLADIVÉ

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

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, ^b Ústav chemie
přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28
Praha 6, ^c Katedra farmaceutické botaniky a ekologie,
FarmF UK v Praze, 500 05 Hradec Králové
pavel.drasar@vscht.cz

Došlo 13.6.11, přijato 16.9.11.

Klíčová slova: přírodní látka, chladivá chuť, potravní
doplňek, obnovitelné zdroje, menthol

Obsah

1. Úvod
2. Látky ovlivňující trigeminální percepci
3. Látky s negativním rozpouštěcím teplem
5. Faktory ovlivňující chladivou chuť
6. Závěr

1. Úvod

Organoleptický vjem je složitý proces; jde o komplex vnímání některých vlastností ať již jednotlivě, nebo spolu s jinými vjemy a pocity. Chladivá (česky též „větrová“) chuť nepatří mezi pět běžně uznávaných chuťových principů (sladký, slaný, kyselý, hořký a umami)¹, možná proto, že tuto vlastnost, podobně jako chuť svravou a pálivou někteří autoři zařazují mezi pocity^{2,3}. V této souvislosti je nutno podotknout, že např. Wikipedie uvádí⁴, kromě klasických chutí též další: tučnou, vápenatou, suchou, kovovou, pálivou, chladivou (mátovou), znecitlivující (mati rasa; čínsky „má“), ústa naplňující (japonsky „kokumi“) a nakonec i chuť tepla (pocit teploty potravy)⁵. V rámci zkoumání chuťových vjemů a individuální citlivosti na ně je nalézáno stále více analogií citlivosti a necitlivosti tak jako u nejznámějšího případu, 6-propylthiouracilu⁵.

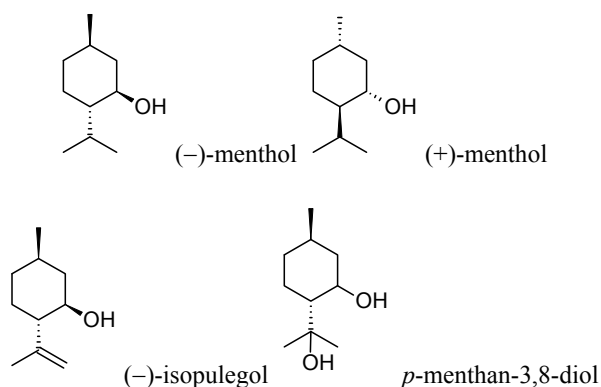
Tento článek je dalším z řady přehledů, ve kterých jsou popisovány přírodní látky a potravní doplňky^{6–13}, a je koncipován ve zmíněné řadě zejména jako učební pomůcka. Pocit chladu tak, jak ho vidí autoři tohoto článku, může být definován čtyřmi způsoby. Jednak triviálně a to tak, že příslušná potravina nebo nápoj má teplotu nižší, než je teplota v ústech. Další možností je aplikace nízkovroucích

sloučenin, které ochlazují okolí fyzikálním působením díky vysokému výparnému teplu. Typickým příkladem je ethanol, acetaldehyd nebo diethylether, kde se s dvěma posledními samozřejmě v potravě často nesetkáváme. Pocit chladivé čerstvosti či mátovitosti vyvolávaný mentholem či kafrem bývá označován jako fyziologický. Teprve nedávno bylo prokázáno, že tyto sloučeniny aktivují trojklaný nerv (trigeminus) citlivý na chlad, který je odpovědný za vnímání pocitů ve tváři. Jejich účinek je vysvětlován aktivací iontového kanálu TRPM8, což vyvolá průnik vápenatých iontů do nervové buňky a odeslání elektrického impulsu do mozku, který poté signalizuje chlad¹⁴. Na rozdíl od skutečného snížení teploty v ústech vyvolaného přítomností studených či chladivých látek je tato popsána chladivá chuť (čerstvost, mátovitost) pouze vnímaným jevem (angl. „perceived phenomenon“), který se též nazývá trigeminální percepcce. Posledním důvodem, proč vnímáme pocit chladu, je přítomnost látek, které mají záporné rozpouštěcí teplo (enthalpii) a při jejichž rozpouštění se okolí ochlazuje. V dalším textu se zaměříme na důležité příklady posledních dvou skupin látek.

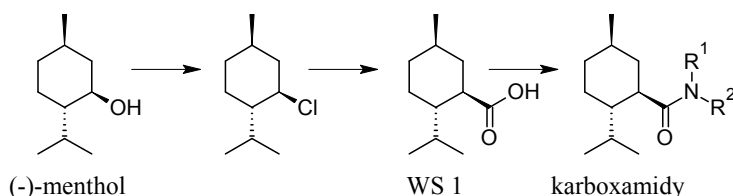
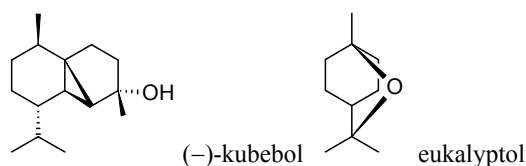
Pravděpodobně největším odběratelem chladivých látek je kosmetický průmysl pro výrobu zubních past, ústních vod, deodorantů, šamponů, holicích krémů a parfémů. Chladivá chuť je velmi důležitá v potravinářství při výrobě žvýkaček, bonbónů a nápojů. Tak se například společnosti Senomyx a Firmenich shodly na společném programu hledání takových látek, které by měly chladivou chuť a byly prosty nežádoucích vedlejších účinků^{15,16}. O látkách chladivé chuti se dozvíme i v Merckově Indexu¹⁷, kde je uvedeno pouze pět takových látek, z nichž čtyři lze považovat za přírodní. V databázi IUPHAR¹⁸ je takových látek již 18 a nejobsáhlejší je přehled Leffingwellův¹⁹.

2. Látky ovlivňující trigeminální percepci

Největší skupinu těchto látek představují terpeny a klasickým představitelem je (–)-menthol ze silice máty peprné (*Mentha piperita*). Menthol zaujímá mezi chladivými látkami prominentní postavení, neboť se používá od nepaměti a stále je jeho produkce nejvyšší. Bohužel má i některé nevýhodné vlastnosti. Je těkavý, proto se nemůže používat v některých kosmetických krémech, protože by způsoboval podráždění očí. Dále má ve vyšších koncentracích hořkou chuť a ostrou vůni. Je standardem pro posouzení chladivého účinku látek definovaným jako tzv. isointenzita, což je koncentrace látky vyvolávající stejný chladivý pocit jako (–)-menthol o koncentraci 2 ppm. Ostatní stereoisomery (–)-mentholu mají podstatně nižší účinnost ve srovnání s (–)-isomerem, např. (+)-menthol má jen 27% účinnost¹⁹.



Dalšími přírodními látkami tohoto typu jsou (-)-isopulegol z voňatky (citronová tráva, *Cymbopogon* Spreng.) a blahovičnicku (eukalyptus, *Eucalyptus* L'Her.), *p*-menthan-3,8-diol též z blahovičnicku, a seskviterpen (-)-kubebol z kryptomerie japonské (japonský cedr, *Cryptomeria japonica* D. Don.). Další chladivou látkou izolovanou z blahovičnicku (*Eucalyptus globulus* Labill) je eukalyptol²⁰ (cineol, kajeputol, Dinkum oil), který se používá jako vonná látka.



WS 3 $R^1 = H, \quad R^2 = Et$

1 $R^1 = H, \quad R^2 =$

2 $R^1 = H, \quad R^2 =$

3 $R^1 = Me, \quad R^2 = Me$

4 $R^1 = H, \quad R^2 = Me$

CPS 195 $R^1 = H, \quad R^2 =$

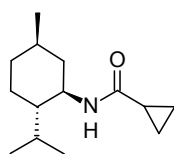
Struktura přírodního (-)-mentholu byla a stále je inspirací pro hledání syntetických či semisyntetických chladivých látek, které by neměly nevýhody (-)-mentholu²¹. Další požadovanou vlastností, kterou by měly splňovat, je rychlý nástup dostatečně vysokého a dlouhotrvajícího účinku. Protože ale organoleptický vjem závisí i na vlastnostech matrice, ve které je chladivá látka podávána, je tato podmínka obtížně splnitelná pro jednu jedinou sloučeninu. Jestliže nějaká sloučenina vyvolává pocit chladu, je-li rozpuštěna ve vodě, nelze předpokládat, že bude mít stejný účinek jako součást žvýkacích gum nebo zubní pasty. V současné době je proto dávana přednost směsím látek přesně definovaným pro konkrétní způsob použití.

Průmyslově důležitou skupinou látek s chladivou chutí jsou karboxamidy, které se vyrábějí z (-)-mentholu trístupňovou syntézou (Schéma 1)²¹. Karboxamid WS 3 je jedna z nejpoužívanějších chladivých látek a má vyšší účinek než (-)-menthol (isointenzita = 1,5). Velice účinným chladivým karboxamidem, je sloučenina **1** (isointenzita 0,15) a vůbec nejúčinnějším je karboxamid **2** (isointenzita 0,05). Karboxamidy **3** a **4** se přidávají do tabáku a koupelových přípravků. Karboxamid CPS 195 se vyznačuje téměř tříhodinovým chladivým účinkem na kůži při topické aplikaci v koncentraci 1 % v masťovém základu.

Je pozoruhodné, že amid FEMA 4558 nemá chuť chladivou ale umami¹⁹.

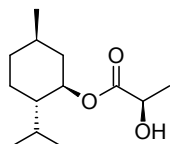
Další skupinou chladivých látek odvozených od (-)-mentholu jsou estery, které byly původně zamýšleny jako jeho náhrada při parfemaci cigaret a nyní se používají hlavně v kosmetických přípravcích i potravinách. Estery

Schéma 1

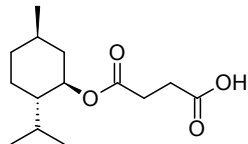


FEMA 4558

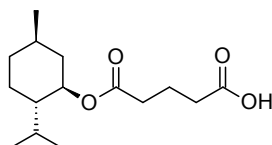
s kyselinou jantarovou¹⁹ (FEMA 3810) a kyselinou glutarovou (FEMA 4006) jsou perspektivní pro potravinářské aplikace stejně jako karbonáty FEMA 3805 a FEMA 3806 (frescolat MGA).



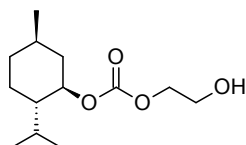
FEMA 3746



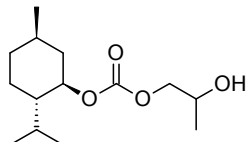
FEMA 3810



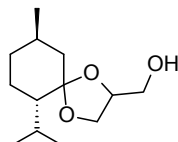
FEMA 4006



FEMA 3805

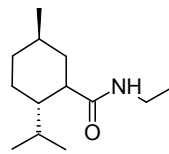


FEMA 3806

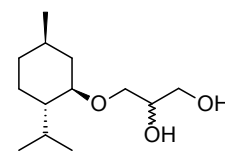


FEMA 3808

Komerčně úspěšný je ester s kyselinou mléčnou (FEMA 3746) s poloviční chladivostí v porovnání s (–)-mentholem, který se přidává do tabáku. "3-(–)Menthoxyl-1,2-propandiol" nazývaný Cooling Agent 10 (FEMA 3784) je komerčně úspěšným produktem s chladivostí srovnatelnou s (–)-mentholem. Další sloučeninou, o které se z velké množiny syntetických derivátů zmíníme, je ketal FEMA 3808, který je srovnatelně účinný jako (–)-menthol. Rovněž byly připraveny celé série více či méně úspěšných derivátů kyseliny WS 1 (Schéma 1) a zejména estery a amidy jsou perspektivními chladivými látkami. Zajímavý je *N*-ethyl-5-methyl-2-(1-methylethyl)cyklohexanocarboxamid (FEMA 3455), jehož práh chuťového rozeznání je až 200 ppb. Řada látek vycházejících ze struktury (–)-mentholu obdržela registraci GRAS (Generally Recognized as Safe) u americké asociace FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States)²².

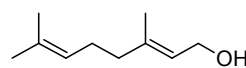


FEMA 3455

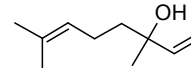


FEMA 3784

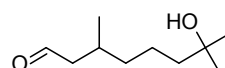
Mezi látky vyvolávající chladivý pocit patří i acyklické terpeny geraniol, linalool a hydroxycitronellal¹⁸.



geraniol

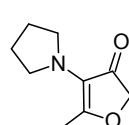


linalool

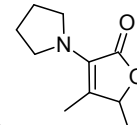


hydroxycitronellal

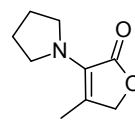
Relativně nedávno, v roce 2001, byly popsány²³ látky chladivé chuti izolované ze sladu, furanon I, II a III. Tyto látky mají práh chuťové detekovatelnosti v setinách až jednotkách ppm.



furanon I

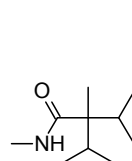


furanon II

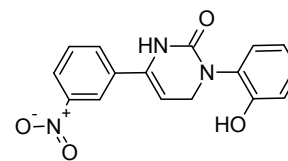


furanon III

Dihydroxyaceton chuti nasládlé až chladivé, produkováný z glycerolu bakteriemi *Acetobacter* sp. za aerobních podmínek²⁴ se používá do prostředků na umělé opalování¹⁷. Pro zajímavost si uvedme, že některé syntetické látky nepřipomínající terpeny vykazují často velmi silné chladivé účinky. Cooling Sensate WS 23 je používán v kosmetice²⁵, syntetický icilin (AG 3-5) je mnohem silnější než menthol²⁶, je tak chladivý, že vyvolává třes. 4-Methyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2[5*H*]-furanon (furanon III) je dokonce 35krát účinnější než (–)-menthol²⁷.



WS 23

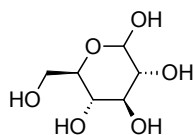


icilin (AG 3-5)

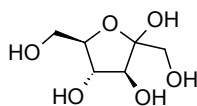
3. Látky chladivé chuti s negativním rozpouštěcím teplem

Pocit chladu je v této kategorii látek důsledkem porušování sítě vodíkových vazeb, které jsou v krystalové struktuře a rozpouštěním se porušují. Obecně vzato, celá

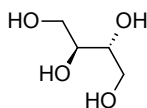
řada cukrů, polyolů a cyklicitolů má často chuť chladivou jako jednu ze složek chuťového vjemu. Nejběžnějšími takovými sloučeninami jsou D-glukosa a D-fruktosa. I když jsou tyto látky používány v potravinářství primárně díky chuti sladké, v mnoha aplikacích je výhodné spojení sladké chuti s pocitem chladu. Nejčastěji se tato kombinace využívá u nekariogenních sladidel jako jsou alditoly, např. xylitol, který dodává chladivou chuť bonbonům a zubním pastám. Erythritol, dokonce i v roztoku, rovněž vyvolává v ústech pocit chladu²⁸.



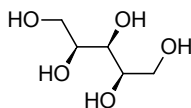
D-glukosa



D-fruktosa



erythritol



xylitol

I některé anorganické sloučeniny mají chladivou chuť. Typickým případem je dusičnan draselný (salnytr, salnitr, sanytr), jehož kvalitu a kvalitu suroviny na jeho výrobu průmyslníci zjišťovali ochutnáváním²⁹. Hydrogenfosforečnan amonný (Fyrex), který vzbuzuje při rozpouštění pocit chladu, se používá většinou jako omezovač hořlavosti látek, při rafinaci cukru, do prostředků na čištění zubů, jako inhibitor koroze a hnojivo¹⁷.

4. Faktory ovlivňující chladivou chuť

Zajímavé je zjištění, že chuťové vjemy i trigeminální percepci ovlivňuje vjem čichový³⁰. Znovu a znovu se potvrzuje pravidlo, že potrava je vnímána všemi použitelnými smysly a ty se navzájem ovlivňují jak pozitivně, tak negativně.

Je pozoruhodné, že obecně ovlivňuje vnímání chuti též infekce středního ucha a horních cest dýchacích, úrazy, chirurgické výkony a radiační terapie hlavy a krku, působení některých chemikálií a léků např. antibiotik a antihistaminik, kouření, zubní problémy a špatná ústní hygiena³¹. Ročně jen v USA vyhledá lékaře pro problémy vnímání chuti více než 200 tisíc pacientů.

5. Závěr

Přehled přírodních látek chladivé chuti ukazuje zajímavost i komerční význam této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiversity sekundárních metabolitů a může i inspirovat chemiky při hledání nových struktur a nových možností využití takových látek v praxi. Nejdůležitější představitelé přírodních chladivých látek

jsou součástí rostlinných silic používaných po staletí ve výrobě lihovin a parfémů. Postupně se jejich využití rozšířilo zejména na prostředky ústní hygieny a výrobu bonbonů a žvýkacích gum. Poslední slovo ještě řečeno nebylo, neboť látky s účinkem na trigeminální percepci jsou často používány jako látky odpuzující hmyz. Tak například WS 3 je schopen odpuzovat šváby (*Blattodea*) po několik dní od aplikace z více než 95 %, přičemž někteří švábi jsou též zhubeni (0,5–1 %) ³². K odpuzování švábů se používá i eukalyptol a *p*-menthan-3,8-diol působí jako repelent proti komáru *Anopheles*³³. V současnosti jeví o tyto látky zvýšený zájem i farmaceutický výzkum, protože iontové kanály TRPM8 jsou zastoupeny v různých tkáních a podílejí se na řadě signálních cest. Pravděpodobně budou receptory TRPM8 novým cílem pro protinádorovou terapii³⁴.

Autoři děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a grantu NAZV č. 71284/2007.

LITERATURA

- Chandrashekar J., Hoon M.A., Ryba N.J.P., Zuker C.S.: *Nature* 444, 288 (2006).
- Noble A. C.: *Chemistry of Wine Flavor, ACS Symposium Series 714*, 156 (1998).
- Lapčík O., Opletal L., Moravcová J., Čopíková J., Drašar P.: *Chem. Listy* 105, 452 (2011).
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Taste>, staženo 25/8 2010.
- Bajec M. R., Pickering G. J.: *Physiol. Behavior* 95, 581 (2008).
- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy* 100, 778 (2006).
- Opletal L., Wimmer Z., Čopíková J., Lapčík O., Moravcová J., Čáhlíková L., Drašar P.: *Chem. Listy* 105, 761 (2011).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 44 (2007).
- Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: *Chem. Listy* 102, 480 (2008).
- Řeháková Z., Karlíčková J., Jahodář L.: *Chem. Listy* 103, 116 (2009).
- Ondrejovič M., Maliar T., Polívka L., Šilhár S.: *Chem. Listy* 103, 394 (2009).
- Karabín M., Brányik T., Kruliš R., Dvořáková M., Dostálek P.: *Chem. Listy* 103, 721 (2009).
- Hámpel F., Moravcová J., Čopíková J., Opletal L., Lapčík O., Drašar P.: *Chem. Listy* 103, 15 (2009).
- McKemy D. D., Neuhauser W. M., Julius D.: *Nature* 416, 52 (2002).
- Rosenberg G., Saddler K.: *Press Release, Senomyx and Firmenich to collaborate on novel flavors that provide a cooling taste effect Senomyx*, San Diego, CA a Geneva, Switzerland, January 3, 2008.
- Fuganti C., Joulain D., Maggioni F., Malpezzi L., Serra S., Vecchione A.: *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 2425 (2008).

17. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
18. <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=500>, staženo 8/9 2010.
19. Leffingwell J.C.: *Cool without Menthol & Cooler than Menthol and Cooling Compounds as Insect Repellents*, Leffingwell & Associates, Canton 2010; http://www.leffingwell.com/cooler_than_menthol.htm, staženo 9. 9. 2010.
20. Cloez F. S.: Ann. 154, 372 (1870).
21. Furrer S. M., Slack J. P., McCluskey S. T., Unguram I. M., Daniher A. T., Blancher G., Bell K., Krawee L. C., Gray K.: Chem. Percept. 1, 419 (2008).
22. <http://www.femaflavor.org/GRAS%2024.pdf>, staženo 9. 9. 2010.
23. Ottinger H., Soldo T., Hoffmann T.: J. Agric. Food Chem. 49, 5383 (2001).
24. Bernhauer K., Schön K.: Z. Physiol. Chem. 177, 107 (1928).
25. McLaughlin K. T., Hall W. G.: US 5407665 (1993); Chem. Abstr. 122, 298736 (1995).
26. Wei E. T.: Fed. Proc. 40, 1491 (1981).
27. Ottinger H., Soldo T., Hofmann. T.: J. Agric. Food Chem. 49, 5383 (2001).
28. de Cock P. W. H. A.: US 6066345 (1999); Chem. Abstr. 132, 49397 (1999).
29. Taušová Z., Brněnský denník Rovnost 15. 3. 2010.
30. Labbe D., Gilbert F., Martin N.: Chemosens. Percep. 1, 217 (2008).
31. <http://www.nidcd.nih.gov/health/smelltaste/taste.html>, staženo 8/9 2010.
32. Gautschi M., Blondeau P.: US Appl. 2002015692 (2002); Chem. Abstr. 136, 195654 (2002).
33. Trigg J. K.: J. Am. Mosquito Control Assoc. 12 (2 Pt. 1), 243 (1996).
34. Beck B., Bidaux G., Bavencoffe A., Lemonnier L., Thebault S., Shuba Y., Barrit G., Skryma R., Prevarskaya N.: Cell Calcium 41, 285 (2007).

J. Čopíková^a, J. Moravcová^b, O. Lapčík^b, Opletal L.^c, and P. Drašar^b (^aDepartment of Carbohydrate Chemistry and Technology, ^bDepartment of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague, ^cPharmaceutical Faculty, Charles University, Hradec Králové): **Natural Compounds with Cooling Taste and Their Derivatives**

Review article brings comprehensive survey on compounds having cooling taste (sensation) of both types, influencing the trigeminal perception and expressing negative enthalpy on dissolution. Other use of these compounds is discussed.

ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – MECHANIZMUS KATALÝZY VO VZŤAHU K TVORBE BIOLOGICKY ÚČINNÝCH EIKOZANOIDOV

PETER HOFFMAN, LÝDIA BEZÁKOVÁ,
IVANA HOLKOVÁ, MÁRIA PEKÁROVÁ
a MAREK OBLOŽINSKÝ

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava
hoffman@fpharm.uniba.sk*

Došlo 3.10.11, prijaté 25.11.11.

Kľúčové slová: lipoxigenáza, mechanizmus katalýzy, eikozanoidy

Obsah

1. Úvod
2. Eikozanoidy
3. Lipoxigenázy – výskyt a štruktúra
4. Klasifikácia živočíšnych lipoxigenáz
5. Mechanizmus enzýmovej katalýzy
6. Mechanizmus kontroly oxidácie mastnej kyseliny
7. 5-Lipoxigenáza
8. Záver

1. Úvod

Lipoxigenázy (LOX) tvoria rodinu dioxigenáz, obsahujúcich v aktívnom mieste nehémovo viazaný kation železa, katalyzujúcich adíciu molekulového kyslíka na násobnú väzbu polynenasýtených mastných kyselín so (Z,Z)-1,4-pentadiénovým zoskupením^{1,2}. Vznikajúce špecializované lipidy – leukotriény (LT), lipoxíny (LX) a hydroxyeikozatetraénové kyseliny (HETE) – nazývame spolu s ďalšími nemenej významnými metabolitmi kyseliny arachidónovej (AA) eikozanoidy.

V riši rastlín sú produkty LOX metabolickej dráhy zapojené v odpovedi na environmentálny stres (najmä prostredníctvom kyseliny jasmónovej a jej derivátov), obrane rastliny pri napadnutí patogénmi a v komunikácii rastlín. V živočíšnej riši metabolity lipoxigenázovej cesty prostredníctvom s G-proteínom spriahnutými receptormi (GPCR) sa zúčastňujú na udržiavaní bunkovej homeostázy, proliferácie a diferenciácie a taktiež vo viacerých patofyziologických procesoch, ako sú chronické zápalové ochorenia a nádorové procesy^{3,4}.

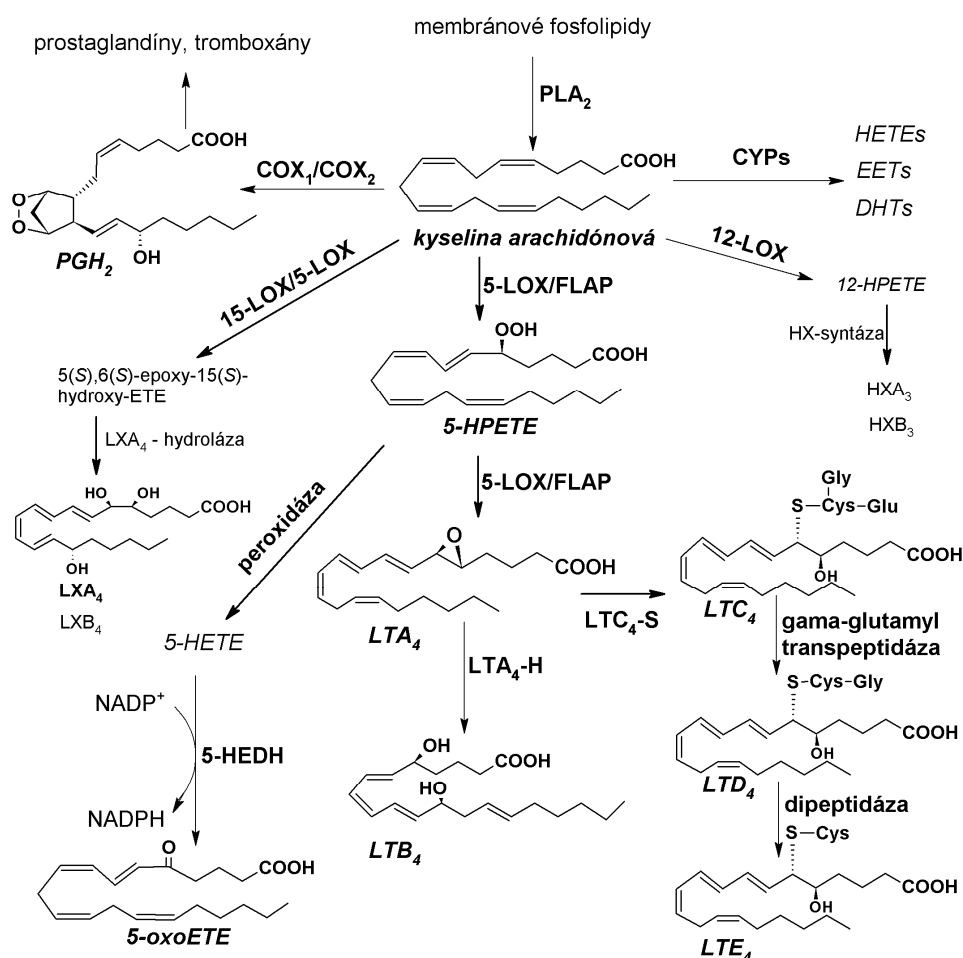
2. Eikozanoidy

Kyselina arachidónová (AA) je polynenasýtená mastná kyselina (MK) obsahujúca 20 atómov uhlíka, ktorá je súčasťou bunkovej membrány. Jej význam nie je len v stavebnej funkcii, ale aj v medzibunkovej komunikácii. Odvodzujeme od nej skupinu bunkových signálnych molekúl a sekundárnych poslov, ktoré spoločne nazývame eikozanoidy. Sú to produkty a medziprodukty troch hlavných signálnych ciest: cyklooxygenázovej, lipoxigenázovej (LOX) a cytochrómu P-450. Eikozanoidy môžu tiež vznikáť neenzýmovými reakciami (obr. 1).

Cyklooxygenázy (COX) sú počiatočnými enzýmami v tvorbe prostaglandínov (PG), prostacyklínov a tromboxánov. Tieto zlúčeniny obsahujú vo svojej molekule 5článkový prostánový kruh alebo 6článkový oxánový kruh (tromboxány) vznikajúci za ôsmym uhlíkom AA. Cyklooxygenázy obsahujú dve rôzne aktívne miesta: cyklooxygenázové a peroxidázové. Obe využívajú rovnaký tyrozylový radikál a hémovo-viazaný ión železa pre katalýzu. Kým cyklooxygenázové aktívne miesto začleňuje molekulový kyslík na C11 a C15 za vzniku prostaglandínu G₂ (PGG₂), peroxidázové redukuje peroxid na hydroxid za vzniku prostaglandínu H₂ (PGH₂)⁵. Účinky prostaglandínov boli pozorované v mnohých biologických a patologických procesoch, vrátane bronchodilatácie, signalizácie bolesti, vrodenej a adaptívnej imunitnej odpovede, nádorových procesoch či ateroskleróze.

Enzýmy cytochrómu P-450 (CYP-450) tvoria rodinu enzýmov prítomných v baktériách, hubách, prvokoch, rastlinách i živočíchoch. CYP uľahčujú adíciu kyslíka do štruktúry veľkého množstva substrátov, čím zabezpečujú metabolizmus xenobiótik v pečeni, ale aj signalizáciu v rámci celého tela. CYP obsahujú hémovo-viazaný ión železa, ktorý využitím NADPH ako kofaktora prechádza redukčným cyklom a s molekulovým kyslíkom tvorí Fe-oxo (Fe^V=O) formy s vysokým oxidačným stupňom a využíva ich na odštiepenie vodíka. V závislosti od polohy AA, reaktívny kyslíkový radikál môže zabezpečiť odštiepenie sp³ hybridizovaného vodíka alebo odstránenie elektrónu z sp² hybridizovaného uhlíka. V oboch prípadoch prenesením kyslíka na nestabilný medziprodukt vedie k vzniku hydroxyeikozatetraénových kyselín (HETE) alebo epoxy-eikozatriénových kyselín (EET). CYP-450 katalyzuje hydroxyláciu naviazaním kyslíka prednostne na tú istú stranu substrátu (suprafaciálna oxygenácia). Cyklooxygenázy (COX) a lipoxigenázy (LOX), ktoré aktivujú substrát stereoselektívnym odštiepením vodíka, vkladajú molekulový kyslík na opačnú stranu substrátu (antarafaciálne).

LOX tvorí jediný polypeptidový reťazec, ktorý na rozdiel od CYP-450 nevytvára hémovú štruktúru a v porovnaní s COX obsahuje len jedno aktívne centrum s ligandovo viazaným centrálnym atómom. Je kľúčovým



Obr. 1. **Metabolické dráhy kyseliny arachidónovej**; AA môže byť po uvoľnení z membránových fosfolipidov metabolizovaná cyklooxygenázami (COX), cytochrómom P-450 (CYP-450), alebo lipoxigenázami (LOX). Pôsobením 5-LOX v spolupráci s 5-lipoxigenázou aktivujúcim proteínom (FLAP) vzniká primárny produkt 5-HPETE, ďalším pôsobením vetva leukotriénov – LTB₄, C₄, D₄ a E₄ – z allylového epoxidu LTA₄. Enzymatickou hydrolýzou LTA₄ (katalyzovanú LTA₄-hydrolázou; LTA₄-H) vzniká dihydroxykyselina LTB₄ a konjugáciou s glutatiónom (pôsobením LTC₄-syntázy; LTC₄-S) LTC₄. 5-HPETE je tiež predpokladom pre vznik 5-oxoETE, katalyzovaný 5-hydroxyeikozanoid dehydrogenázou (5-HEDH) využívajúcou kofaktor NADP⁺. Produkt 15-LOX metabolismu – 15-HPETE – môže byť premieňaný 15-LOX na eoxíny, prípadne aktiváciou enzýmu 5-LOX cez epoxidický medziprodukt a ďalšou katalýzou lipoxín A₄-hydrolázou (LXA₄-hydroláza) vzniká koncový produkt: LXA₄. 12-LOX dáva vzniknúť 12-HPETE, ktorý je redukovaný na 12-HETE alebo hepxilín-syntázou premieňaný na hepxilíny A₃ (HXA₃) alebo B₃ (HXB₃)

enzýmom v syntéze bronchokonstrikčných cysteinyl-leukotriénov (cysLT), protizápalových lipoxinov (LX), chemoatraktantov leukotriénu B₄ (LTB₄) a 5-oxoETE (5-oxoeikozatetraénovej kyseliny).

Neenzymatický spôsob vzniku lipidových metabolitov je spojený s oxidatívnym stresom. Morrow a spol.⁶ opísali skupinu PG-podobných zlúčenín tvorených *in vivo* peroxidáciou katalyzovanou voľnými radikálmi. Lipidová peroxidácia, nasledujúca po odštiepení vodíka a vzniku radikálu (delokalizovaného na 5 uhlíkov), vedie k vzniku

hydroperoxyeikozatetraénových kyselín (HpETE) a ich redukciou môžu byť vytvorené všetky polohové a priestorové izoméry HETE produkované lipoxigenázami a CYP-450.

Názov „eikozanoidy“ odkazuje na 20 uhlíkov obsahujúce mastné kyseliny, avšak všeobecne sa do tohto názvu zaraďujú aj štrukturálne podobné metabolity príbuzných polynenasýtených MK, napríklad kyseliny linolénovej či dokozahehexaénovej kyseliny.

3. Lipoxygenázy – výskyt a štruktúra

Lipoxygenázy sú rozšírené v ríši rastlín, húb i živočíchov. Ich najvhodnejšími substrátmi sú polynenasýtené mastné kyseliny obsahujúce sériu *cis* násobných väzieb. Sú tvorené jedným polypeptidovým reťazcom s relatívnou molekulovou hmotnosťou približne 75–80 kDa u živočíchov a približne 94–104 kDa u rastlín⁷.

V živočíšnych organizmoch bola trojrozmerná štruktúra určená len pre lipoxygenázu izolovanú z králičích retikulocytov⁸. Proteín LOX sa skladá z 2 domén: katalytickej C-terminálnej domény a menšej N-terminálnej domény. Katalytická doména je zväčša helikálnej štruktúry a obsahuje nehémovo viazaný ión železa. N-terminálna doména pozostáva z ôsmich antiparalelných β -listov usporiadaných do štruktúry β -barelu. Živočíšne LOX majú N-koncovú doménu kratšiu asi o 150–160 aminokyselín (AK) v porovnaní s rastlinnými LOX. Táto doména obsahuje ligand-viažuce slučky, ktorých bočné reťazce AK viažu Ca^{2+} a sprostredkovávajú väzbu na jadrové membrány⁹.

Esenciálnou súčasťou aktívneho miesta LOX je ión železa, ktorý je viazaný v oktaédrickej koordinačnej sfére. Pozostáva z His-365, His-540, His-544 a molekuly vody vytvárajúcej rohy oktaédrového štvorca, His-360 a C-terminálny izoleucín-662 vytvárajú vertikálnu os¹⁰. Sekvenčné porovnania odhalili vysokú konzervovanosť ligandov s výnimkou jediného histidínu. U všetkých rastlinných lipoxygenáz, živočíšnych 5-LOX, hlodavčích a ľudských doštičkových 12-LOX je nahradený asparagínom, u ostatných cicavčích 12-LOX a všetkých cicavčích 15-LOX je prítomný¹¹.

V bielkovinovej štruktúre lipoxygenáz boli identifikované 2 veľké dutiny. Prvá z nich je miestom katalytických dejov enzýmu. Začína sa pri terminálnej karboxylovej skupine a dvoch z histidínových ligandov, vytvára úzku dutinu s dvoma hlavnými ohybmi, kde sa mení jej smer o viac ako 90°. Vytvára tak predpoklady pre správne umiestnenie substrátu s *cis* izomérou. Jeden z týchto ohybov hraničí s centrálnym iónom železa a umožňuje odštiepenie vodíka z požadovanej polohy. Vnútornú stranu dutiny tvoria zväčša hydrofóbne alebo neutrálne postranné reťazce AK. Práve postranné reťazce AK vystielajúce vnútorné strany dutín sú vysoko konzervované v sekvencii všetkých známych lipoxygenáz¹².

Druhej dutine sa pripisuje úloha v usmernení molekulového kyslíka pri presune z vonkajšieho prostredia k substrátu. Jej prítomnosť je predpokladaná nielen z dôvodu priestorovej špecificity LOX, ale aj umiestnenia aktívneho centra hlboko v štruktúre enzýmu. Sekvencia aminokyselín v tejto dutine napriek tomu nie je konzervovaná sekvenciou. V sójovej LOX je táto dutina tvorená 29 AK zvyškami hydrofóbného charakteru¹². Kühn a spol.¹³ identifikovali v rámci cicavčej 15-LOX kanál umožňujúci presun molekulového kyslíka k reakčnému miestu, ktorý však je odlišný od dutiny v sójovej lipoxygenáze.

4. Klasifikácia živočíšnych lipoxygenáz

LOX sú kategorizované s ohľadom k ich polohovej špecificite pri oxidácii AA (kyseliny arachidónovej)¹⁴. Teoreticky by mohlo existovať 6 LOX rodín (5-, 8-, 9-, 11-, 12- a 15-LOXs), avšak dodnes boli u cicavcov objavené iba 4 izoformy: 5-LOXs, 8-LOXs, 12-LOXs a 15-LOXs (5-LOX [EC 1.13.11.34], 8-LOX [EC 1.13.11.40], 12-LOX [EC 1.13.11.31], 15-LOX [EC 1.13.11.33]). Vo výskume rastlinnej lipoxygenázy sa však uprednostňuje nomenklatúra na základe kyseliny linolénovej, ktorá sa u rastlín vyskytuje v najväčšom množstve v membránach fosfolipidov¹⁵.

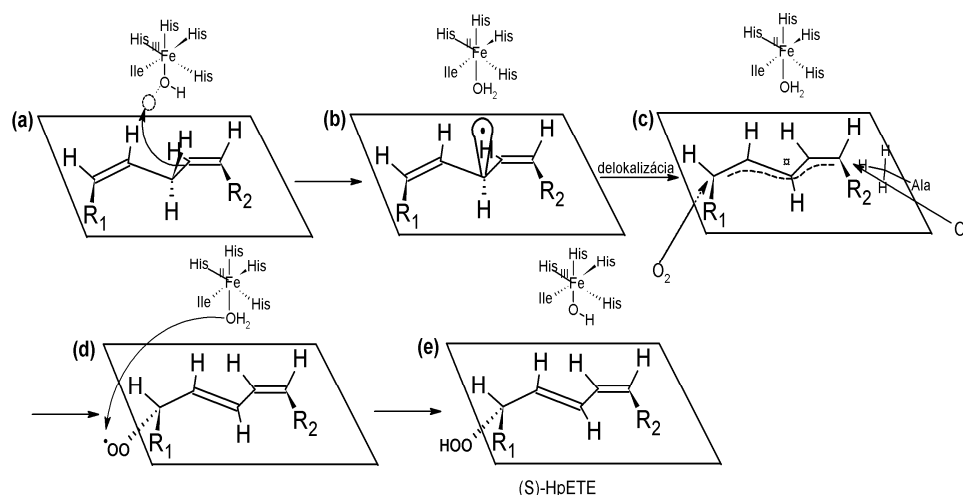
Dalšou alternatívou klasifikácie môže byť klasifikácia na základe enantioselektivity. V prípade väčšiny živočíšnych aj rastlinných LOX dochádza k adícii molekulového kyslíka selektívne na pro-S stranu bis-alylového radikálového medziproduktu. Nazývame ich preto (S)-LOX. Lipoxygenázy R-typu sa častejšie vyskytujú v nižších morských organizmoch¹⁶, ale boli objavené aj u cicavcov¹⁷.

5. Mechanizmus enzýmovej katalýzy

LOX aj COX dioxygenázy používajú podobný mechanizmus oxidácie mastných kyselín (MK). Tento mechanizmus je porovnateľný s reakciami polynenasýtených MK počas autooxidácie¹⁸. Samotný proteín vyžaduje oxidáciu z kľudového stavu (Fe^{2+} formy) na katalyticky aktívnu formu (Fe^{3+} forma), čo zabezpečujú hydroperoxydy MK. Katalyticky aktívny enzým iniciuje odštiepenie vodíka zo substrátu, ktorý je následne oxidovaný na voľný radikál schopný reagovať s neaktivovaným molekulovým kyslíkom. Primárnym produktom je peroxylový radikál MK a jeho redukciou sa vytvorí hydroperoxidový produkt (obr. 2).

U lipoxygenáz sa nehémovo viazaný ión železa priamo zúčastňuje katalýzy. Na rozdiel od CYP-450 nie sú známe žiadne dôkazy vzniku Fe-O_2 alebo Fe-OOH medziproduktov¹⁸. Molekulový kyslík nie je viazaný na železitý ión počas odštiepenia vodíka zo substrátu. Väzba a aktivácia O_2 nie je potrebná, keďže substrát je oxidovaný na voľný radikál. Na základe mechanizmu autooxidácie neexistuje žiadna energetická bariéra pre tvorbu peroxylového radikálu obyčajnou adíciou molekulového kyslíka na pentadienyllový radikál mastnej kyseliny.

Odštiepenie vodíka z MK je ireverzibilným a zároveň rýchlosť určujúcim krokom v celej LOX katalyzovanej reakcii. Je nasledovaný väzbou molekulového kyslíka (reverzibilný krok katalýzy) nazývanou aj β -fragmentácia, pretože kyslík sa viaže v β -polohe od miesta vzniku radikálu. Vzniknuté peroxylové radikály sú konjugované s diénom a tak relatívne stabilné. Odštiepenie vodíka z bis-alylového metylénu je rýchlosť určujúcim krokom v LOX katalýze a vyžaduje vysokú aktivačnú energiu. LOX odštiepuje vodík z jedného z bis-alylových metylénov (polohová špecificita) a zároveň pro-R alebo pro-S vodík (priestorová špecificita)¹³.



Obr. 2. **Mechanizmus oxidácie 1,4-*cis,cis* násobných väzieb v nenasýtených mastných kyselinách na 1,3-*cis,trans*-5-hydroperoxy;** a) Katalyticky aktívny enzým ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ forma) odštiepi príslušný vodík (pro-*S*) z bis-alylového metylénu za vzniku neaktívnej $\text{Fe}^{2+}\text{-OH}_2$ formy a substrátového radikálu (b). Konjugáciou s nenasýtenými väzbami dochádza k delokalizácii radikálového elektrónu (c). Vzniká tak pentadienylový radikál s planárnym usporiadaním. Oxidácia je možná v pozícii [+2] alebo [-2], avšak sterickým tienením (c) vo vhodnej polohe, v prípade 15(*S*)-lipoxygenáz reziduálna -CH_3 skupina alanínu v oblasti C-11, a usmernením prístupu molekulového kyslíka je preferovaná iba jedna z týchto polôh. Navyše, oxidácia substrátu prebieha z opačnej strany, ako bol odštiepený vodík – antarafaciálne. Vznikajúci peroxidový radikál (d) je lokalizovaný a prijíma vodík za vzniku hydroperoxidu. Súčasne sa oxiduje centrálny ión $\text{Fe}^{2+}\text{-OH}_2$ na katalyticky aktívnu formu $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ (d). Výsledným produktom je hydroperoxid mastnej kyseliny v (*S*) konfigurácii

LOX v katalyticky aktívnej forme ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) odstráni atóm vodíka z požadovanej pozície substrátu za vzniku $\text{Fe}^{2+}\text{-OH}_2$ a substrátového radikálu¹⁹. Ten ďalej reaguje s molekulovým kyslíkom a dáva vzniknúť peroxylovému radikálu. V ďalšom kroku radikál prijíma elektrón a vodík z $\text{Fe}^{2+}\text{-OH}_2$ formy za vzniku hydroperoxidového produktu a aktívneho ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) enzýmu. Alternatívne sa môže peroxylový radikál priamo viazať na ión železa za vzniku komplexu enzým-produkt. Disociácia komplexu vedie k vzniku aktívneho $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ stavu, ktorý môže vstúpiť do ďalšieho katalytického cyklu (obr. 2).

Vodíkový atóm odštiepený lipoxygenázou sa však neprenáša typickým mechanizmom transferu atómu vodíka (HAT – hydrogen-atom transfer) na ión železa, ale využíva s protónom spojený elektrónový prenos (PCET – proton coupled electron transfer), čo je evidentné z faktu, že elektrón nie je lokalizovaný na protóne pozdĺž reakčnej koordináty, ale je transportovaný priamo zo substrátu na atóm Fe^{3+} (cit.^{18,19}). Prenos elektrónu na Fe^{3+} je spojený s prenosom protónu na hydroxy skupinu v aktívnom mieste enzýmu. Elektrón aj protón sú premiestňované súčasne, ale zároveň izolovane na Fe^{3+} , resp. hydroxy-ligand v procese PCET (cit.²⁰). Relatívne nízka energetická bariéra pre PCET proces u LOX je umožnená kovalentným prepojením pozdĺž $\text{Fe-O}\cdots\text{H}\cdots\text{C}$ mostíka v prechodnom stave (kde O je hydroxidový kyslík a C je uhlík substrátu, z ktorého je odštiepený vodík). Aby mohol prebehnúť tento prenos elektrónu, nesmú byť redoxné miesta v aktívnom centre LOX tienené objemnými ligandmi.

6. Mechanizmus kontroly oxidácie mastnej kyseliny

Odštiepením bis-alylového vodíka sa vznikajúci radikál mastnej kyseliny stabilizuje konjugáciou s nenasýtenými väzbami v jeho blízkosti. Vzniká pentadienylový radikál, ktorý uplatňuje konformáciu s najnižšou energiou – planárnu štruktúru s nespárovaným elektrónovým spinom (radikálom) delokalizovaným cez všetkých 5 uhlíkov (obr. 2c).

V ďalšom kroku je pentadienylový radikál preskupený elektrónovou redistribúciou v smere k metylovému koncu ([+2]-preskupenie) alebo v smere ku karboxylovému koncu ([-2]-preskupenie)². To umožňuje reakcie s molekulovým kyslíkom v polohách C-1 alebo C-4 preskupeného pentadienylového radikálového systému, obe v *R*- a *S*-chiralite. Počas enzymaticky kontrolovaných oxidácií je však prístup k radikálu obmedzený viacerými mechanizmami priestorovej kontroly.

Najčastejším je priestorové tienenie objemnými postrannými reťazcami AK samotného enzýmu. V prípade *S*-LOX je aminokyselinou v kritickej pozícii (na opačnej strane substrátu oproti nehemovému Fe^{3+}) aminokyselina alanín, v prípade *R*-LOX glycín (obr. 2c). U 15-LOX tak môžeme predpokladať, že reziduálna CH_3 -formácia alanínu sa bude nachádzať v blízkosti C-11 a bude brániť prístupu molekulového kyslíka na radikál v [-2]-preskupení. Oxidácia substrátu je tak umožnená len na preferovanom mieste – v 15(*S*) pozícii^{18,21}.

Vo forme peroxylového radikálu, kedy sa nespárovaný elektrón stáva lokalizovaným, môže prebehnúť izomerizácia dvojitej väzby z *cis* na *trans*. Je typická počas autooxidácie nenasýtených mastných kyselín. U LOX katalyzovaných reakcií je neuskutočniteľná samotným ukotvením substrátu (obr. 3).

Okrem stérického tienenia substrátu je výrazná aj kontrola prostredníctvom usmernenia prístupu kyslíka. Mastná kyselina je ukotvená v substrát viažucej dutine tým spôsobom, že iba jeden uhlík z reaktívnych uhlíkových centier pentadienylového radikálu je prístupný molekulovému kyslíku. Prístup k ostatným centráram je znemožnený proteinovou štruktúrou, ktorá zároveň zabezpečuje udržiavanie a väzbu substrátu v správnej pozícii pre odštiepenie vodíka. Môžeme teda povedať, že maskuje súčasti reaktívneho substrátu. V blízkosti aktívneho miesta, kam sa dostáva O_2 pomocou dutiny usmerňujúcej jeho presun, sa nachádza priehlbina. Pre udržiavanie substrátu vo vhodnej pozícii k aktívnemu miestu sa predpokladá enzým-substrátová interakcia v troch bodoch: 1) hydrofóbne interakcie metylového konca mastnej kyseliny substrátu s tými AK, ktoré tvoria „dno“ dutiny viažucej substrát: Ile418 a Met419; 2) iónové interakcie karboxylovej skupiny MK s pozitívne nabitými bočnými reťazcami: Arg^{+403} ; 3) π -elektrónové interakcie dvojitych väzieb MK s bočnými reťazcami AK enzýmu: Phe415¹³ (obr. 3).

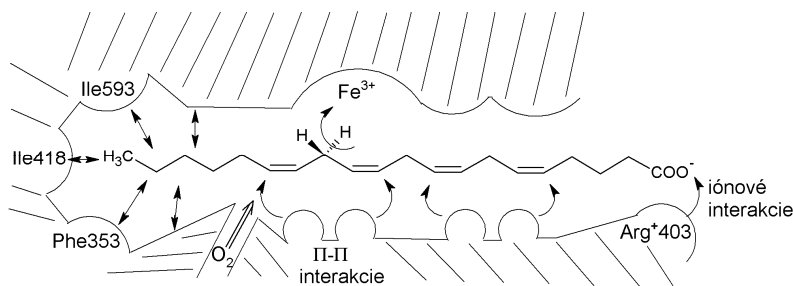
7. 5-Lipoxygenáza

5-LOX, enzým s centrálnou úlohou v biosyntéze leukotriénov (LT), je primárne exprimovaný v rôznych typoch leukocytov. V bunke, ktorá je v pokojovom stave, je 5-LOX umiestnená v troch hlavných lokalitách: cytoplazme, jadre a peri-nukleárnej membráne. Jej umiestnenie je bunkovo závislé, a preto v cirkulujúcich leukocytoch ako sú neutrofily, eozinofily a monocyty sa prevažne vyskytuje v cytoplazme. V tkanivových leukocytoch sa prevažne

nachádza v jadre⁹.

Aktiváciu 5-LOX spúšťa kombinácia niekoľkých faktorov. Najdôležitejším stimulom je uvoľnenie kyseliny arachidónovej z bunkovej membrány prostredníctvom cytozolovej fosfolipázy A_2 (cPLA₂) aktivovanej pri vzniku zápalovej odpovede organizmu. Možnosti presunu lipofilného arachidonátu v rámci hydrofilnej cytoplazmy k enzýmu sú minimálne, preto sa v tomto procese predpokladá účasť malého integrálneho membránového proteínu FLAP (5-lipoxygenase activating protein). Tento proteín s Mr 18 kDa nemá vlastnú enzymatickú aktivitu, no pomáha 5-LOX pri oxidácii substrátu. V neposlednom rade je dôležitým parametrom aj redoxný stav kationu železa. Enzým sa stáva aktívnym až oxidáciou kationu ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) prostredníctvom lipidových peroxidáz. Preto podmienky, ktoré podporujú lipidovú peroxidáciu (napr. dodaním peroxidáz, inhibícia GPx enzýmov, oxidatívny stres), budú zvyšovať tvorbu 5-LOX produktov. Zaujímavosťou je, že leukocytový homogenát môže byť stimulovaný lipidovými peroxidázami, ale napríklad peroxid vodíka či iné organické peroxidy v tomto ohľade zlyhali²². Regulačnou aktivitou sa prejavuje aj štruktúra podobná C2 doméne prítomná v N-terminálnej oblasti sprostredkujúca väzbu Ca^{2+} iónov a ďalších sekundárnych poslov medzi-bunkovej komunikácie.

Metabolická cesta polohovo špecifickej 5-lipoxygenázy je najlepšie preskúmanou (obr. 1), jej produkty tak môžeme rozdeliť do troch skupín: a) cysteinyl leukotriény: LTC₄, LTD₄ a LTE₄, v minulosti známe ako pomaly pôsobiace mediátory anafylaxie (SRS-A) transformované z leukotriénu A₄ konjugáciou s cysteínom, prípadne ďalšími aminokyselinami; b) leukotrién B₄, metabolizovaný z LTA₄ prostredníctvom stereoselektívnej hydrogenácie cez LTA₄-hydrolázu; c) 5-oxoETE, metabolit 5-HETE vznikajúci pôsobením vysoko stereoselektívneho mikrozomálneho enzýmu 5-hydroxyeikozanoid dehydrogenázy (5-HEDH).



Obr. 3. Uloženie substrátu v katalyticky aktívnej oblasti kráľicej 15-LOX; Substrát (kyselina arachidónová – AA) vstupuje do katalyticky aktívnej oblasti enzýmu svojím metylovým koncom a je v ňom uchytený interakciami v troch oblastiach: a) hydrofóbnymi interakciami nepolárneho metylového konca s hydrofóbnymi bočnými reťazcami AK enzýmu (Ile593, Ile418, Phe353), b) π - π elektrónovými interakciami medzi násobnými väzbami AA a aromatickými AK enzýmu, c) iónovými interakciami karboxylového konca substrátu s kladne nabitým arginínom (Arg^{+403}). Správne umiestnenie substrátu je nevyhnutným pre odštiepenie bis-alylového vodíka z C-13. Prístup molekulového kyslíka je sprostredkovaný tzv. tunnelingom – vstupuje do aktívneho centra enzýmu hydrofóbnym tunelom a je usmernený do pozície pre vznik peroxidu. (upravené podľa Kühn¹³)

Práve naposledy menovaná keto zlúčenina je považovaná za najvýznamnejší chemoatraktant eozinofilov u ľudí, spája sa s predlžovaním životnosti mnohých zápalových buniek a patogenézou astmy²³. LTB₄, produkt polymorfonukleárných leukocytov, sprostredkúva autokrinnú aktiváciu chemotaxie a agregácie, ako aj degranulácie žírnych buniek väzbou na receptory spriahnuté s G-proteínom (GPCR) – označovanými ako BLT₁ a BLT₂. Jeho syntézu zabezpečuje LTA₄-hydroláza stereoselektívnou hydrogenáciou leukotriénu A₄ – vysoko nestabilného alylového epoxidu vznikajúceho dehydratáciou primárneho produktu lipoxygenázy (5-HETE).

Cysteinyl leukotriény (cys-LTs) patria popri prostaglandínoch k najznámejším a najpreštudovanejším eikozanoidom. Ich preukázateľný vplyv pri rozvoji astmy je známy už celé desaťročia, spočiatku ako pomaly pôsobiace mediátory anafylaxie (SRS-A) a neskôr po objavení ich štruktúry ako cysteinyl leukotriény. Už len fakt, že cys-LTs sú približne tisíckrát silnejšie bronchokonstrikčné než histamín alebo metacholín vo forme aerosolu, upriamuje pozornosť na vývoj liečiv s antileukotriénovou aktivitou a inhibitorov 5-LOX.

8. Záver

Eikozanoidy sú lipidové sekundárne mediátory podieľajúce sa na intracelulárnej komunikácii. Tvoria sa oxygenáciou kyseliny arachidónovej účinkom lipoxygenáz, cyklooxygenáz a epoxygenáz (CYPs).

Lipoxygenázy predstavujú veľkú génovú rodinu di-oxygenáz, ktoré obsahujú nehémovo viazaný kation železa. Sú široko distribuované v rastlinných i živočíšnych organizmoch katalyzujúce adíciu molekulového kyslíka na systém *cis*, *cis*-1,4-pentadiénového zoskupenia polynenasýtenej mastnej kyseliny.

Poznanie mechanizmu enzýmovej katalýzy lipoxygenáz a tiež usporiadanie funkčných skupín v aktívnom centre bielkovinovej štruktúry je nevyhnutnou súčasťou vývoja nových terapeuticky účinných zlúčenín. Intenzívne úsilie posledných troch desaťročí vyvinúť účinné a zároveň bezpečné liečivo inhibujúce lipoxygenázovú signálnu dráhu viedlo k uvedeniu len niekoľkých molekúl do preskripčnej praxe. Napriek značnému pokroku zatiaľ nie je dostatočne známe zapojenie lipoxygenáz v mnohých biologických procesoch, a preto je potrebný ďalší výskum.

LITERATÚRA

- Boudreau L. H., Bertin J., Robichaud P. P., Laflamme M., Ouellette R. J., Flamand N., Surette M. E.: *FASEB J.* 25, 1097 (2011).
- Kuhn H.: *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 62, 255 (2000).
- Holková I., Bezáková L., Vanko M., Bilka F., Obložinský M.: *Chem. Listy* 103, 487 (2009).
- Stock N., Baccei C., Bain G., Broadhead A., Chapman C., Darlington J., King C., Lee C., Li Y., Lorrain D. S., Prodanowich P., Rong H., Santini J., Evans J. F., Hutchinson J. H., Prasit P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 213 (2010).
- Rouzer C. A., Marnett L. J.: *J. Lipid Res.* 20, 29 (2008).
- Morrow J. D., Chen Y., Brame C. J., Yang J., Sanchez S. C., Xu J., Zackert W. E., Awad J. A., Roberts L. J.: *Drug Metab. Rev.* 31, 117 (1999).
- Brash A. R.: *J. Biol. Chem.* 274, 23679 (1999).
- Gillmor S. A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F.: *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003 (1997).
- Radmark O., Werz O., Steinhilber D., Samuelsson B.: *Trends Biochem. Sci.* 32, 332 (2007).
- Kuban R. J., Wiesner R., Rathman J., Veldink G., Nolting H., Sole V. A., Kuhn H.: *Biochem. J.* 332, 237 (1998).
- Solomon E. I., Zhou J., Neese F., Pavel E. G.: *Chem. Biol.* 4, 795 (1997).
- Prigge S. T., Boyington J. C., Faig M., Doctor K. S., Gaffney B. J., Amzel L. M.: *Biochimie* 79, 629 (1997).
- Kuhn H., Saam J., Eibach S., Holzhutter H. G., Ivanov I., Walther M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 93 (2005).
- Smith W. L., Borgeat P., Hamberg M.: *Methods Enzymol.* 187, 1 (1980).
- Vanko M., Holková I., Obložinský M., Bilka F., Bezáková L.: *Chem. Listy* 101, 384 (2007).
- Brash A. R., Boeglin W. E., Chang M. S., Shieh B. H.: *J. Biol. Chem.* 271, 20949 (1996).
- Sun D., McDonnell M., Chen X. S., Lakkis M. M., Li H., Isaacs S. N., Elsea S. H., Patel P. I., Funk C. D.: *J. Biol. Chem.* 273, 3540 (1998).
- Schneider C., Pratt D. A., Porter N. A., Brash A. R.: *Chem. Biol.* 14, 473 (2007).
- Lehnert N., Solomon E. I.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 294 (2003).
- Fukuzumi S.: *Helv. Chim. Acta* 89, 2425 (2006).
- Coffa G., Schneider C., Brash A. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 87 (2005).
- Werz O., Steinhilber D.: *Pharmacol. Ther.* 112, 701 (2006).
- Powell W. S., Rokach J.: *Prog. Lipid Res.* 44, 154 (2005).

P. Hoffman, L. Bezáková, I. Holková, M. Pekárová, and M. Obložinský (*Department of Cellular and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Animal Lipoxygenases – Mechanism of Catalysis in Relation to Formation of Biologically Active Eicosanoids**

Lipoxygenases form a family of nonheme iron-containing enzymes involved in the lipid peroxidation processes. They participate, together with cyclooxygenases

and cytochrome P-450, in the arachidonic acid metabolism, forming a group of cell signal molecules and secondary messengers called eicosanoids. The lipoxygenase-catalyzed reactions are highly controlled processes mediated by steric shielding of substrate by bulky amino acid side chains in the reaction center. Equally important is the

channeling of molecular oxygen and the anchoring of substrate in a substrate-binding cavity. From the viewpoint of development of new effective drugs, study of lipoxygenases and biologically active eicosanoids opens new horizons for affecting pathological processes.

KOVOVÁ CHUŤ PŘÍRODNÍCH LÁTEK A JEJICH DERIVÁTŮ

ZDENĚK WIMMER^{a,b}, LUBOMÍR OPLETAL^c,
JANA ČOPÍKOVÁ^d, JITKA MORAVCOVÁ^a,
KHALED SALEH OMAR ABDULMANEA^a,
OLDŘICH LAPČÍK^a a PAVEL DRAŠAR^a

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav experimentální botaniky AV ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^c Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^d Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Klíčová slova: přírodní látka, chuť kovová, potravní doplňěk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Přírodní látky chuti kovové
3. Nežádoucí projevy kovové chuti
4. Omezení vnímání kovové chuti
5. Závěr

1. Úvod

Článek je dalším z řady recentních přehledů, ve kterých tento časopis popisuje rozmanitost přírodních látek^{1–7} a který může sloužit i jako vhodná učební pomůcka. Chuťové vjemy jsou dlouhou dobu předmětem vědeckého výzkumu⁸.

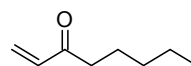
Kovová chuť⁹ není jedním z pěti zásadních chuťových principů (sladký, slaný, kyselý, hořký a umami)¹⁰, některými autory je však tato vlastnost jako chuť uváděna. Samotné ionty kovů se však účastní např. vnímání vůní a pachů¹¹. Organoleptický vjem kovové chuti může znehodnotit například maso či zeleninu v konzervě, pokud byl její kovový obal špatně chráněn izolační vrstvou uvnitř.

Jako fenomén podobný kovové chuti je zkoumána i chuť „elektrická“, která s přítomností kovových iontů v elektrolytech ústní dutiny může souviset¹²; zajímavou „chuť“, či spíše galvanický pocit má člověk s amalgámovými plombami, když kousne do předmětu z neušlechtilého kovu.

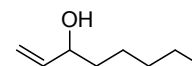
2. Přírodní látky chuti kovové

Chuť kovu znají zvířata od doby bronzové a železné, proto nevezmou návnadu masa z pastí, pokud byla návnada krájena kovovým nožem¹³. Půjde zřejmě o kontaminaci masa oxidy a solemi kovů z povrchu kovových nástrojů. Kovovou chuť železa a mědi cítí člověk v pitné vodě ještě při koncentracích cca 0,05 mg l⁻¹ pro ionty železa a 0,61 mg l⁻¹ pro ionty mědi¹⁴. Nepříjemnou kovovou chuť může mít i titan použitý pro dentální náhrady¹⁵. Kovovou chuť¹⁶ nalezneme nejvýrazněji u solí rtuti a stříbra a dále železa, mědi a cínu, ať již organických (laktát, glukonát) nebo anorganických kyselin. Merckův Index¹⁷ uvádí šest látek s kovovou chutí. Typicky anorganickou sloučeninou s kamencově kovovou chutí je „bílý rtuťnatý precipitát“ HgClNH₂ a ostře kovově chutnající ZnBr₂. Kovová chuť byla zaznamenána též u uhličitanu lanthanitého¹⁸.

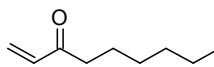
Říká se, že čerstvá krev má kovovou chuť. O povaze této chuti však nejsou další informace v odborné literatuře, může to být tím, že slaný je údajně sám hem¹⁹. V literatuře se vyskytuje dokonce termín „blood-like, metallic bitter taste“²⁰. Bylo zjištěno, že okt-1-en-3-on je zodpovědný za kovovou chuť mléčných produktů²¹. Podobné látky z houby *Tricholoma matsutake* Sing., jmenovitě 1-okten-3-on a 1-okten-3-ol, jsou dávány do souvislosti s kovovou chutí²². Někdy je tento vjem popisován jako kovová vůně a mezi nejaktivnější látky je zařazován též non-1-en-3-on (cit.²³).



okt-1-en-3-on



okt-1-en-3-ol

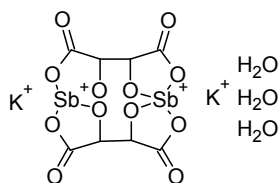


non-1-en-3-on

U alkaloidů z lupiny (*Lupinus albus*) (spartein, lupinin, epilupinin, angustifolin, lupanin, 13-hydroxylupanin) je známa hořká chuť; při sledování 7 senzorických vlastností semen několika odrůd lupiny se však ukázalo, že tyto látky mohou mít i chuť kovovou, možná podpořenou jinými látkami v semenech (tríslovinami): pozitivní korelace se ukázala mezi chutěmi hořkou, kovovou a dřevnatou a obsahem alkaloidů. Jednotlivé alkaloidy ani trísloviny však nebyly ve spojení s žádným ze smyslových znaků²⁴. Poznání těchto souvislostí má velký význam při šlechtění,

protože se stává ve formě mnohých odrůd významným objektem potravinářského a pícninářského využití.

Sladce kovovou chuť má vinan antimonito-draselný, používaný jako mořidlo v barvířství a částečně i jako antihelmintikum. Kovovou chuť se sladkým nádechem pak mají hexamethylenetetramin, urotropin a některé kvarterní amoniové soli²⁵.

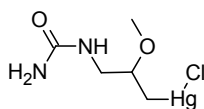


vinan antimonito-draselný

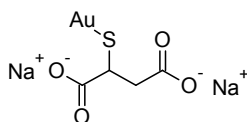


urotropin

Hořko-kovovou chuť má diuretikum chlormerodin, čistě kovovou pak zlatnosodná sůl kyseliny thiojablonoé, používaná jako antireumatikum Myochrysin.

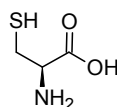


chlormerodin

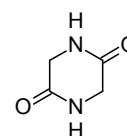


Myochrysin

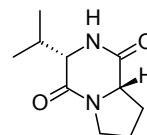
kovové pachuti²⁷. Kovovou chuť má mít L-cystein²⁸. Některé 2,5-di-keto-piperaziny (cyklické dipeptidy; jako např. cyklo(L-Val-L-Pro)) z piva, hovězího masa, či vznikající při pražení kakaových bobů, mají hořce-kovovou chuť²⁹. V dichloromethanovém extraktu pražených kakaových bobů bylo nalezeno 25 takových diketopiperazinů²⁰. V souvislosti s jejich studiem je nutno zmínit i veličinu, tzv. nadprahovou hodnotu rozeznání DoT (Dose over Threshold), která se stanoví jako poměr koncentrace použité a prahové (kdy je ještě efekt rozeznáván). Používá se i termín chuťová zředovací analýza TDA (Taste Dilution Analysis), která přidá například k HPLC další rozměr stanovení, například UV/VIS – chuť. Výsledky jsou významně korelovatelné, pokud chuťové vjemy u jednotlivých frakcí z HPLC odpovídají identifikovaným látkám³⁰.



L-cystein



2,5-diketopiperazin



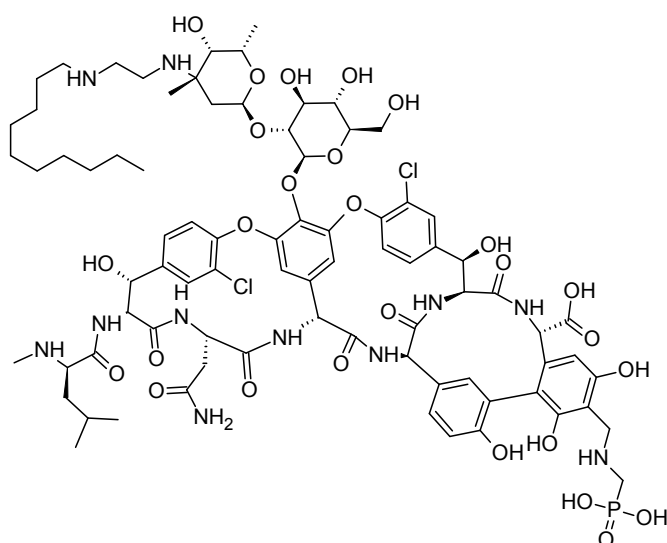
cyklo(L-Val-L-Pro)

Baktericidní (i MRSA) lipoglykopeptid telavancin (Vibativ) má údajně kovovou chuť, nebo její vnímání vyvolává²⁶.

Umělá sladidla jako sacharin, aspartam (Nutrasweet), acesulfam-K a cyklamát u některých lidí vyvolávají pocit

3. Nežádoucí projevy kovové chuti

O biologické podstatě této chuti není zatím mnoho známo, byť je zmiňována jistá role kanálů TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1)³¹ a TRPV1



telavancin

(Transient Receptor Potential Vanilloid 1)²⁷. Jsou hledány možnosti predikce této chuti, při kterých mohou být využity objektivní fyzikální metody. Jednou z takových metod může být NMR spektrometrie využitelná jako „magnetický jazyk“ pro chuťový popis konzervovaných rajčat, zahrnující kromě zjištění různých senzorických vlastností také identifikaci kovové chuti³². Je však známo, že člověk může pociťovat slanou a někdy i slano-kovovou chuť při některých chorobách (*keratosis obturans*, „metal fume fever“ (MFF), kvasinkových onemocněních vyvolaných především kvasinkami rodu *Candida*, příčinou může být i diagnostikovatelná závada či změna chuti, tzv. dysgeusie aj.)*³³ a při stavech silné dehydratace. Byla také popsána zajímavá kakogeusie**, která nastala po požití semen borovice (*Pinus* sp.)³⁴. Ačkoliv stav po několika dnech odezněl, není dosud zřejmé, jak velkou část populace (zejména asijské) může tento proces postihnout.

Kovová chuť v ústech může být spojena s otravou některými anorganickými jedy a je popisována i u počátečních stavů těhotenství či jistých cyklických hormonálních stavů (fluktuace estrogenů) anebo u onemocnění ledvin a hypervitaminose D. Snadno si ji v některých případech vysvětlíme, jak již bylo řečeno, přítomností zejména neúšlechtilých kovů v ústní dutině. Bývá popisována i po léčení některými léky, jako např. botulotoxinem A³⁵, lidokainem³⁶, cimetidinem³⁷, tetracyklinem³⁸, fluorouracilem³⁹, metronidazolem⁴⁰ či methylprednisolonem⁴¹ a řadou dalších léčiv. Tato chuť se však vyvíjí i při některých obtížně diagnostikovaných stavech⁴² anebo chirurgických zákrocích (po implantaci stentu do koronární arterie)⁴³.

Nežádoucí kovová chuť může vznikat i v průběhu konzervace a zpracování potravinářských surovin, např. mražením masa lososa, kde je navozena volnými polyneenasycenými mastnými kyselinami⁴⁴.

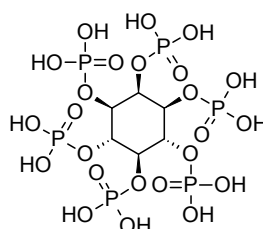
4. Omezení kovové chuti

Ze všech „chutí“ se zdá být kovová tou nejméně žádoucí, jak je patrné např. z výzkumu nových umělých sladidel; právě u této skupiny široce používaných látek může tvořit dodatečný nepříznivý pocit. Je tedy žádoucí její odstranění. Touto chutí disponují některé kationty, bohužel velmi běžně využívané v potravinářství, v produktech dentální hygieny, při výrobě krmiv, ale také v produkci léčivých přípravků. Jsou proto hledány přísady, které by tuto chuť významně maskovaly.

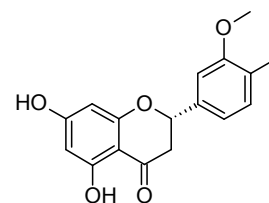
V případě produktů dentální hygieny to mohou být směsi aminokyselin a proteinů, které zároveň zmírňují svíravou chuť přípravků⁴⁵. V tomto typu přípravků bývají velmi často přítomny ionizovatelné zinečnaté soli, které jsou nositeli kovové chuti. Příznivě se uplatnilo použití laurylalkoholu a některých silic (mátové) nebo jejich slo-

žek (karvonu, anetholu)⁴⁶, polyolu a anetholu⁴⁷, polyaminového komplexu⁴⁸. Kovovou chuť nejen zinečnatých iontů, ale i jiných iontů údajně účinně odstraňuje přísada L-mentholu a *N*-methyl-*p*-menthan-karboxamidu⁴⁹. Dalším významným prvkem, jehož soli navozují kovovou chuť, je železo. Kovovou a svíravou chuť iontů železa v nápojích či potravinách tlumí přísada polyfenolů z čajovníkových listů⁵⁰, u farmaceutických přípravků xylitol a extrakt z kořenů rehmanie (*Rehmannia glutinosa*)⁵¹. Kationty železa (ale také mědi, zinku, manganu, kobaltu, niklu a hliníku) lze vázat na laktoferriny a snížit kovovou příchutí přípravků na minimum⁵².

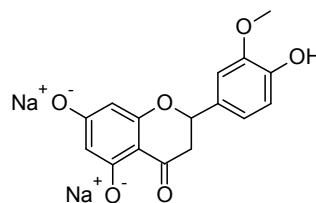
Omezení kovové chuti u vzorků potravy (vína) obsahujících kovy může být m.j. působením fytové kyseliny (phytic acid, látky překvapivě se vyskytující v některých významných rostlinách jako zásobárna zbytků kyseliny fosforečné)⁵³, soli hydroxyflavanonů⁵⁴, ι -karagenanu⁵⁵ a dalších sloučenin^{56,57}.



fytová kyselina



hydroxyflavanon X



příklad soli flavanonu

Zajímavá bude jistě i souvislost kovové chuti s kovovou vůní⁵⁸, která bývá vysvětlována tak, že např. síran železnatý v ústech napomáhá tvorbě těkavých oxidačních produktů lipidů, které jsou retronasálně vnímány s kovovou vůní^{59,60}, může to souviset s výše popsanými látkami jako non-1-en-3-on. Práh citlivosti je velmi nízký⁶¹ a dosahuje koncentrací kolem 10 μ M. Že to nebude všechno jednoduché, ukazuje např. i fakt, že silná pole (3 T a více), použitá při zobrazování pomocí magnetické rezonance (MRI), mohou vyvolat pocit kovové chuti⁶².

*Dysgeusie je závada či porucha chuti, ageusie znamená totální nedostatek chuťových vjemů a hypogeusie je snížení citlivosti chuťových vjemů; všechny mohou být diagnostikovatelnými chorobami. **Kakogeusie, resp. metalogeusie, je patologické vnímání kovové chuti po přijetí některých látek nebo potravin.

5. Závěr

Přehled přírodních látek kovové chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiverzity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci např. potravinářských a farmaceutických chemiků při hledání nových možností využití takových látek v praxi. Hledání nových spojitostí mezi vnímáním chutí použitelných nejen v humánní, ale i zemědělské praxi (živočišné výrobě, kde se kovová chuť může uplatnit jako negativní faktor), je však jen jednou stránkou problému, druhou je hledání postupů (a látek) – modifikátorů vnímání⁶³, které mohou tento vjem zesilovat nebo tlumit.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305 a grantu NAZV Q111A166.

Stručné odborné životopisy autorů:

Prof. Ing. Zdeněk Wimmer, DrSc. (<http://www.ueb.cas.cz/cs/users/wimmer>), narozen: 1952; vědní obor: chemie přírodních látek, organická chemie; Web of Science: publikace 124, H index 14, citace 853, bez autocitací 392.

Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. (<http://www.phyto.cz/doc-rndr-lubomir-opletal-csc>), narozen: 1952; vědní obor: fytochemie, rostlinné metabolity, obsahové látky vyšších rostlin a hub; Web of Science: publikace 60, H index 10, citace 313, bez autocitací 266

Prof. Ing. Jana Čopíková, CSc.; vědní obor: chemie a technologie sacharidů; Web of Science: publikace 89, H index 10, citace 385, bez autocitací 334

Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc. (http://www.vscht.cz/lam/new/lide_moravcova.html), narozena: 1950; vědní obor: chemie a stereochemie sacharidů a jejich derivátů, bioaktivní přírodní látky, separační metody; Web of Science: publikace 61, H index 10, citace 441, bez autocitací 395

Prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčík (http://www.vscht.cz/lam/new/lide_lapcik.html), narozen: 1960; vědní obor: chemie přírodních látek, imunoanalýza, separační techniky, vztah mezi sekundárními metabolity a nutriční hodnotou rostlinných potravin; Web of Science: publikace 67, H index 16, citace 894, bez autocitací 767

Prof. RNDr. Pavel Drašar, DSc. (http://www.vscht.cz/lam/new/lide_drasar.html), narozen: 1948; vědní obor: chemie přírodních látek, organická chemie; Web of Science: publikace 161, H index 13, citace 730, bez autocitací 488

LITERATURA

1. Maruna M., Šturdíková M., Ondřejíčková P.: Chem. Listy 104, 103 (2010).
2. Lapčík O., Opletal L., Moravcová J., Čopíková J., Drašar P.: Chem. Listy 105, 452 (2011).
3. Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Čahlíková L.: Chem. Listy 106, 113 (2012).
4. Opletal L., Wimmer Z., Čopíková J., Lapčík O., Moravcová J., Čahlíková L., Drašar P.: Chem. Listy 105, 761 (2011).
5. Čopíková J., Moravcová J., Lapčík O., Opletal L., Drašar P.: Chem. Listy 105, 938 (2011).
6. Doležilková I., Macková M., Macek T. L.: Chem. Listy 105, 346 (2011).
7. Kamlar M., Uhlík O., Kohout L., Harmatha J., Macek T.: Chem. Listy 104, 93 (2010).
8. Boudreau J. C.: Naturwissenschaften 67, 14 (1980).
9. Henkin R.I.: JAMA-J. Amer. Med. Assoc. 270, 1369 (1993).
10. Chandrashekar J., Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: Nature 444, 288 (2006).
11. Wang J., Z. Luthey-Schulten A., Suslick K. S.: PNAS 100, 3035 (2003).
12. Ohla K., Toepel U., le Coutre J., Hudry J.: Biol. Psych. 85, 446 (2010).
13. Mowat F.: *Nedělejte poplach (Never Cry Wolf)*, Svoboda, Praha 1968.
14. Omur-Ozbek P., Dietrich A. M.: J. Water Health 9, 1 (2011).
15. Ohkubo C., Hanatani S., Hosoi T.: J. Oral Rehab. 35, 706 (2008).
16. Moncrieff R.W.: *The Chemical Senses*, London, Hill 1967.
17. The Merck Index, 13. vyd. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
18. Filiopoulos V., Koutis I., Trompouki S., Hadjiyannakos D., Lazarou D., Vlassopoulos D.: Ther. Apher. Dial. 15, 20 (2011).
19. Matsumura N., Shimizu T.: JP 01157357 (1989); Chem. Abstr. 111, 593369 (1989).
20. Stark T., Hofmann T.: J. Agric. Food Chem. 53, 7222 (2005).
21. Stark W., Forss A. A.: J. Dairy Res. 29, 173 (1962).
22. Cho I. H., Lee S. M., Kim S. Y., Choi H. K., Kim K. O., Kim Y. S.: J. Agric. Food Chem. 55, 2323 (2007).
23. Lubran M. B., Lawless H. T., Lavin E., Acree T. E.: J. Agric. Food Chem. 53, 8325 (2005).
24. DuPont M. S., Muzquiz M., Estrella I., Fenwick G. R., Price K. R.: J. Sci. Food Agric. 65, 95 (1994).
25. Bandelin F. J., Tuschhoff J. V.: J. Am. Chem. Soc. 74, 4271 (1952).
26. Attwood R. J., LaPlante K. L.: Am. J. Health-Syst. Pharm. 64, 2335 (2007).
27. Riera C. E., Vogel H., Simon S. A., le Coutre J.: Am. J. Phys., Regul. Integ. Comp. Physiol. 293, R626 (2007).
28. Hettinger T. P., Myers W. E., Frank M. E.: Chem. Senses 15, 755 (1990).

29. Stark T., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 7222 (2005).
30. Frank O., Ottinger H., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 231 (2001).
31. Simon S. A.: *Chem. Senses* 34, E27 (2009).
32. Malmendal A., Amoresano C., Trotta R., Lauri I., De Tito S., Novellino E., Randazzo A.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 10831 (2011).
33. Frank M. E., Hettinger T. P., Mott A. E.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.: Offic. Publ. Am. Assoc. Oral Biologists* 3, 371 (1992).
34. Munk M.-D.: *J. Med. Toxicol. : Offic. J. Am. Coll. Med. Toxicol.* 6, 158 (2010).
35. Murray C., Solish N.: *Dermatol. Surgery* 29, 562 (2003).
36. Bigeleisen P. E.: *Anesth. Analg.* 89, 1239 (1999).
37. Melchior W. R., Jaber L. A.: *Ann. Pharmacol.* 30, 158 (1996).
38. Magnasco L. D., Magnasco A.J.: *Clin. Pharm.* 4, 455 (1985).
39. Han S. Y., Youker S.: *J. Drugs. Dermatol.* 10, 1201 (2011).
40. Stein R. B., Hanauer S. B.: *Drug Safety* 23, 429 (2000).
41. Mignogna M. D., Lo Muzio L., Ruoppo E., Fedele S., Lo Russo L., Bucci E.: *J. Oral Pathol. Med.* 31, 339 (2002).
42. Will U., Eger H., Hartmut S., Meyer F.: *BMJ Case Rep.* 2009; MEDLINE 2011618102.
43. Becker D., Maurovich-Horvat P., Jambrik Z., Barczy G., Merkely B.: *Int. J. Cardiol.* 2011; v tisku, doi:10.1016/j.ijcard.2011.10.033; MEDLINE 2012373101.
44. Refsgaard H. H. F., Brockhoff P. M. B., Jensen B.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3280 (2000).
45. Fukasawa T., Ebine Y.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000159647 A 20000613* (2000); *Chem. Abstr.* 2000, 388864.
46. Bilali E.: *PCT Int. Appl. WO 2000028952 A1 20000525* (2000); *Chem. Abstr.* 2000, 351333.
47. Takatsuka T., Nakao A.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 11246376 A 19990914* (1999); *Chem. Abstr.* 1999, 583114.
48. Domke T. W., Bergmann W. R.: *Can. Pat. Appl. CA 2152982 A1 19951231* (1995); *Chem. Abstr.* 1996, 147893.
49. Ishiguro K., Shioki K., Kameda K., Kakutani H.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2003137755 A 20030514* (2003); *Chem. Abstr.* 2003, 368871.
50. Kobayashi N., Uchida T., Sakura, T., Takahashi T.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08266249 A 19961015* (1996); *Chem. Abstr.* 1996, 745578.
51. Nakano, Hiroshi: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000169385 A 20000620*; *Chem. Abstr.* 2000, 408802.
52. Uchida T., Sakurai T., Oda T., Hamashita K., Tomisawa A., Aikawa H., Takahashi, T.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10176000 A 19980630* (1998); *Chem. Abstr.* 1998, 423978.
53. Trela B. C.: *Amer. J. Enol. Vinicult.* 61, 253 (2010).
54. Ley J. P., Krammer G., Kindel G., Gatfield I.-L., Mueller M.: *Ger. Offen. DE 10122898* (2002), *Chem. Abstr.* 137, 865564 (2002).
55. Calton G. J., Wood L. L.: *US 20020187180* (2002); *Chem. Abstr.* 138, 946845 (2002).
56. May R., Roy G., Lee T.: *U.S. Pat. Appl. Publ. US 20080226801 A1 20080918* (2008), *Chem. Abstr.* 149, 331150.
57. Ichiba T.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2011135805 A 20110714* (2011); *Chem. Abstr.* 155, 151457.
58. Dietrich A.M.: *J. Water Sup. Res. Technol., Aqua* 58, 562 (2009).
59. Epke E.M., McClure S.T., Lawless H.T.: *Food Qual. Pref.* 20, 133 (2009).
60. Nann H.: *Mitt. Forsch. Prob. Edelmetalle* 7, 55 (1933).
61. Epke E. M., Lawless H. T.: *Physiol. Behavior.* 92, 487 (2007).
62. Moller H. E., von Cramon D. Y.: *Rofo-Forsch. Geb. Rontgen. Bild. Ver.* 180, 293 (2008).
63. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: *Chem. Listy* 101, 1002 (2007).

Z. Wimmer^{a,b}, L. Opletal^c, J. Čopíková^d, J. Moravcová^a, K. S. O. Abdulmanea^a, O. Lapčík^a, and P. Drašar^a
 (^a Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, ^b Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^c Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, ^d Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Metallic Taste of Natural Compounds and Their Derivatives**

A review of natural compounds and their derivatives with metallic taste shows the importance of this group of renewable materials. The review contributes to the knowledge of biodiversity of secondary metabolites that can be utilized, among others, in food and pharmaceutical industry.

ÚLOHA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ ROSTLIN V BAKTERIÁLNÍ DEGRADACI ORGANICKÝCH XENOBIOTIK

LUCIE MUSILOVÁ, ONDŘEJ UHLÍK,
MARTINA MACKOVÁ a TOMÁŠ MACEK

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6.
lucie.musilova@vscht.cz, ondrej.uhlik@gmail.com,
tomas.macek@vscht.cz*

Došlo 10.11.11, přepracováno 5.6.12, přijato 18.6.12.

Klíčová slova: bioremediace, PCB, PAH, sekundární metabolity, exudáty

Obsah

1. Úvod
2. Sekundární metabolity rostlin
3. Přírodní látky a jejich vliv na mikrobiální degradaci organických xenobiotik
 - 3.1. Přírodní látky v kořenových exudátech a jejich vliv na mikrobiální degradaci organických kontaminantů
 - 3.2. Terpeny
 - 3.3. Fenolové látky
4. Závěr

1. Úvod

Rozvoj naší společnosti s sebou přinesl širokou škálu nových chemických sloučenin, které se dostávají také do životního prostředí, ať už úmyslnou aplikací, průmyslovým používáním či během nehod při zpracování, dopravě atd. U některých z těchto látek dochází k akumulaci v prostředí a mnohdy mohou být transportovány na dlouhé vzdálenosti, protože je organismy odbourávají jen s velkými obtížemi. S tímto faktem pak souvisí i skutečnost, že jsou tyto látky také ukládány v tělech organismů a ohrožují je svou toxicitou.

Dekontaminace postižených oblastí je možná pomocí fyzikálně-chemických postupů, které zahrnují vytěžení materiálu, jeho odvoz a např. spalování v pecích. Tento postup má ale hned několik nevýhod, mezi které patří devastace a změna rázu krajiny, vznik meziproduktů s vyšší toxicitou než má původní kontaminant a také vysoké náklady¹. Uvedené skutečnosti vedly ke snaze vyvinout efektivní technologie využívající přirozený metabolický potenciál rostlin (fytoremediace) nebo mikroorganismů žijících v jejich rhizosféře (rhizoremediace) k odstraňování takovýchto látek z životního prostředí^{2,3}.

2. Sekundární metabolity rostlin

Existují metabolické dráhy, které probíhají jen v některých biologických druzích nebo jen určitých fázích jejich vývoje, a mohou být typické pro některé tkáně nebo skupiny buněk. Tyto dráhy jsou označovány jako sekundární metabolismus⁴. Sekundární metabolity stejně jako primární metabolity mohou hrát velmi významnou roli pro produkující organismus. Mají několik rozličných biologických funkcí – mohou sloužit jako přenašeče informací (hormony, transmittory), efekторы jiných organismů (barviva, vůně, atraktanty, antibiotika, insekticidy, toxiny), faktory pro využívání ekologických situací (chelatační činidla, antibiotika, inhibitory antibiotické aktivity) a také jako skladovací formy odpadních produktů primárního metabolismu⁴.

Sekundární metabolity rostlin sloužící pro komunikaci a k obraně mohou být, společně s dalšími nízkomolekulárními látkami, vylučovány ve formě rostlinných exudátů pomocí kořenů do okolní rhizosféry⁵. Jako součást exudátů byly identifikovány fytoalexiny, které slouží k ochraně rostlin před stresem, fyto siderofory využívané k získu esenciálních živin a fytoanticipiny sloužící jako antimikrobiální látky⁷. Zastoupení jednotlivých látek v exudátech se liší podle druhu rostliny, a některé tyto sloučeniny mohou fungovat jako zdroj uhlíku, dusíku a energie pro bakterie obývající rhizosféru v závislosti na druhu rostliny a potřebách mikroorganismů⁶.

Exudáty se také podílejí na utváření vzájemných vztahů mezi různými organismy. Rostliny ovlivňují složení svých exudátů chemické vlastnosti okolní zeminy, čímž mění probíhající chemické reakce a složení bakteriálních společenstev. Společně s produkcí fytotoxinů a jejich vylučováním do rhizosféry mohou exudáty sloužit jako jeden z prostředků mezidruhové konkurence. Látky obsažené v exudátech mohou ale také sloužit ke komunikaci a napomáhat sousedním rostlinám odolávat patogenům přítomným v prostředí⁵. Rostliny ovlivňují mikroorganismy a také hmyz žijící v prostředí jejich kořenů. Pozitivní vztahy zahrnují symbiózu např. s mykorrhizními houbami a bakteriemi osidlujícími rhizosféru, negativní naopak parazitující bakterie a plísňe nebo hmyz.

Veškeré tyto vztahy jsou velmi dynamické, často dochází k jejich změnám a pro jejich udržení je třeba neustálá adaptace. Býložravci působí změny v produkci těkavých látek v rostlině, kterou napadli, mikrobiální společenstva ovlivňují produkci fenolových látek v rostlině i jejich kořenech. Některými vylučovanými látkami rostliny podporují mykorrhizní společenstva a endofytní houby, které mohou zpětně ovlivnit růst rostliny a její rezistenci ke stresu a škůdcům⁶. Tyto interakce a nutnost porozumění signálům vysílaným rostlinami pravděpodobně přímo souvisí

s evolucí katabolických enzymů, které se podílejí na degradaci polutantů díky strukturní podobnosti některých z nich se sekundárními metabolity⁷.

Sekundární metabolity rostlin se do půdy dostávají také při rozkladu odumřelých kořenů nebo při jejich sezónní obměně⁸. A díky jejich velkému množství a různorodosti se očekává, že ne všechny sekundární metabolity stimulují rhizoremediaci stejně efektivně⁹.

Rostliny samotné jsou však také schopné degradace organických xenobiotik, čehož se dá efektivně využít v procesu fytořemediace, která představuje levnou a společensky přijatelnou alternativu odstraňování kontaminace ze zeminy. Jako každá metoda má však i své nevýhody. Mezi ty hlavní patří skutečnost, že vlivem toxicity prostředí dochází k menšímu nárůstu biomasy, kontaminanty uložené v listech se při opadávání mohou uvolnit zpět, a také existuje možnost vzniku toxičtějších metabolitů xenobiotik před jejich uložením v rostlinných buňkách².

3. Přírodní látky a jejich vliv na mikrobiální degradaci organických xenobiotik

Tato studie shrnuje vliv rostlin a jimi produkovaných přírodních látek (terpenů a fenolových látek včetně flavonoidů) na úbytek organických kontaminantů, jako jsou polychlorované bifenylly a polyaromatické uhlovodíky ve vzorcích kontaminovaných zemin.

3.1. Přírodní látky v kořenových exudátech a jejich vliv na mikrobiální degradaci organických kontaminantů

Díky schopnosti rostlin produkovat obrovskou a různorodou skupinu látek, které jsou často obsaženy v exudátech, jsou prováděny také experimenty zkoumající vliv celých rostlin na mikrobiální degradaci organických xenobiotik.

Yi a Crowley¹⁸ se ve své studii zaměřili na vliv 43 rostlin na úbytek pyrenu a benzo[*a*]pyrenu z půdy. Z testovaných rostlin měly pouze 4 stimulující účinek, nejlepší efekt byl pozorován u celeru. U této rostliny byly jako specifické látky identifikovány terpeny (včetně limonenu) a deriváty salicylové kyseliny, nicméně autoři neprokázali jejich vliv na stimulaci degradace v případě obohacování půdy jejich chemicky čistými formami. Společným faktorem nejúčinnějších rostlin, byla vysoká koncentrace kyseliny linoleové, která patří mezi nejrozšířenější mastné kyseliny. Mechanismu jejího působení nebyla v tomto článku věnována pozornost, ale může zodpovídat za pozitivní nabohacení hlavních degradérů, nebo pravděpodobněji slouží jako surfaktant zvyšující biologickou dostupnost polyaromatických uhlovodíků pro mikroorganismy.

Rezek a spol.¹⁹ se ve svém experimentu věnovali studiu vlivu břízy bělokoré, moruše červené a jílku vytrvalého na úbytek polyaromatických uhlovodíků (PAU) ze zemi-

ny. V této práci nebyly zkoumány specifické látky produkované dřevinami a travinou zodpovědné za zvýšení degradace PAU. Porovnání různě vegetovaných mikrokosmů (vegetace dřevinami, kombinací dřevin a traviny, hnojené nebo nehnojené a kontrolní) poukazuje na to, že hlavní roli v degradaci PAU ve studované zemině hraje pravděpodobně půdní mikroflóra. Nejlépe byly degradovány polyaromatické uhlovodíky pyren a fluoranthren, které také byly v zemině nejvíce zastoupené, jinak byl úbytek PAU ve všech mikrokosmech srovnatelný.

Další studie⁹ byla zaměřena na mikroorganismy žijící v kořenových systémech dospělých stromů přímo v dlouhodobě kontaminované zemině za účelem identifikace rostlin schopných podporovat degradaci PCB a porozumění složení bakteriálních konsorcií schopných dlouhodobé rhizoremediace. Kontaminovaná oblast byla pokryta travinami, bylinami a rostlo na ní 6 stromů – borovice černá, jasan ztepilý, dvě břízy bělokoré, vrba jíva a tmovník akát. Po celé kontaminované oblasti byly nalezeny mikroorganismy schopné degradovat PCB, jejich počet a složení nekolísalo, kromě rhizosféry borovice, kde v období od srpna do listopadu došlo ke zvýšení počtu PCB degraderů, a bříz, kde došlo naopak ke snížení jejich počtu. Množství mikroorganismů se lišilo v závislosti na vzdálenosti od povrchu, což je pravděpodobně způsobeno délkou kořenů jednotlivých rostlin, a tím tedy i hloubkou, do které jsou schopné vylučovat své exudáty.

Uhlík a spol.²⁰ se ve své práci věnovali studiu bakterií schopných metabolizace bifenylu v půdě kontaminované PCB v rhizosféře křenu selského. V experimentu byla využita metoda značení stabilními isotopy^{21,22}, která umožňuje studium bakterií aktivně metabolizující bifenyl. Aktivní populace se ve vegetované zemině liší od kontroly. Jako dominantní byla ve vegetované zemině identifikována bakterie rodu *Hydrogenophaga*. U tohoto rodu se již dříve podařilo charakterizovat²³ další bakterii schopnou metabolizace bifenylu a kometabolizace mono- až trichlorbifenylů za nízké teploty. Dále byly identifikovány některé bakterie z řádu *Burkholderiales*; z tohoto řádu je důkladně prozkoumáno mnoho kmenů s dobrými schopnostmi degradovat PCB^{24–26}. Tato práce demonstruje skutečnost, že kultivace rostlin a rostlinný druh má vliv na složení mikrobiálních společenstev a jejich metabolismus.

V naší laboratoři byl také zkoumán vliv sekundárních metabolitů limonenu, naringinu a kyseliny kávové na bakteriální degradaci PCB v dlouhodobě kontaminované zemině. Použité látky stimulovaly úbytek kontaminantů a po vyhodnocení výsledků byly sekundární metabolity v čisté formě nahrazeny přírodními materiály – kůrou citronu (limonen), kůrou grepu (naringin) a hruškami (kyselina kávová). Při použití přírodních materiálů nebyla degradace stimulována tak efektivně jako v případě čistých forem sekundárních metabolitů, což naznačuje, že přírodní materiály mohou kromě stimulujících látek obsahovat zároveň látky potlačující degradační aktivitu přítomných mikroorganismů nebo látky antimikrobiální.

3.2. Terpeny

Terpeny představují přírodní látky odvozené ze spojení jednotek isoprenu různými způsoby; biologická syntéza vychází z isopentenylidifosfátu a dimethylallyldifosfátu. Oba prekursor vznikají kondenzací tří jednotek acetylkoenzymu A. Terpeny se dělí podle počtu isoprenových jednotek na monoterpeny (spojení 2 isoprenových jednotek), seskviterpeny (3 isoprenových jednotek), diterpeny (4 isoprenové jednotky), sesterterpeny (5 isoprenových jednotek), triterpeny (6 isoprenových jednotek) a polyterpeny. Monoterpeny a seskviterpeny jsou tvořeny především v rostlinných pletivech, vyšší terpeny se vyskytují v rostlinných pletivech i živočišných tkáních. Mnohé z nich mají významnou biologickou úlohu, jsou součástí rostlinných silic a pryskyřic¹⁰.

Nejdůležitějším zástupcem monoterpenů je geraniol, který slouží jako prekurzor dalších terpenů a také je využíván v kosmetice při výrobě parfémů. Z hlediska stimulace rhizoremediace je významný především limonen, který se vyskytuje v kůře citrusových plodů, kmínové silici a silici indických trav *Andropogon nardus*, ze které se také získává. Limonen je prekurzorem karvonu produkovaného mátou, koprem a kmínem.

Bylo provedeno několik pokusů využívajících terpeny ke stimulaci degradace organických xenobiotik.

Hernandez a spol.¹¹ zkoumali vliv přírodních materiálů obsahujících terpeny – kůry pomeranče, listů břečťanu, jehličí borovice a listů eukalyptu – na snížení obsahu PCB v zemině kontaminované směsí Aroclor 1242. Po půlroční inkubaci došlo ve všech zeminách s přidavkem přírodních materiálů ke kompletní mineralizaci, zatímco v kontrolní zemině byl patrný pouze rozklad nížechlorovaných kongenerů.

Singer a spol.¹² v roce 2000 popsali vliv karvonu a surfaktantů na bioremediaci půdy kontaminované stejnou směsí PCB Aroclor 1242 pomocí bakteriálních kmenů *Arthrobacter* sp. B1B a *Ralstonia eutropha* H850, jejichž růst byl nejprve indukován bifenylenem. Surfaktanty zde sloužily jako zdroje uhlíku a zvyšovaly biologickou dostupnost PCB. Jako nejvýhodnější z testovaných surfaktantů se jevil sorbitantrioléat (ST), který je půdními mikroorganismy snadno degradován a nepředstavuje tak další toxikologickou zátěž pro prostředí. Různé kombinace přidavku karvonu a fruktosy vykazovaly srovnatelnou účinnost degradace, zatímco při použití inokula obou bakteriálních kmenů došlo k rozšíření spektra odbourávaných kongenerů. Další studie¹³ se věnovala vlivu terpenů, bifenyly a hydroxypropyl- β -cyklodextrinu na aerobní degradaci PCB. Autoři použili dvě různé zeminy lišící se obsahem organických látek a dusíku. Z výsledků je patrné, že přidávané sekundární metabolity rostlin mají srovnatelný efekt jako osvědčený induktor bifenyl. Přídavek hydroxypropyl- β -cyklodextrinu vyvolal větší úbytek tetra- a pentachlorovaných PCB v zemině s vyšším obsahem organických látek. Společná kombinace výše uvedeného surfaktantu společně s bifenylenem vyvolala naopak snížený úbytek.

Další experiment¹⁴ se věnoval studiu vlivu limonenu

a karvonu na schopnost bakteriálního druhu *Pseudomonas stutzeri* degradovat směs Delor 103. Při použití glukosy jako zdroje uhlíku došlo po indukci limonem k odbourání srovnatelného množství výšechlorovaných kongenerů jako v kontrole, odbourání níže chlorovaných kongenerů bylo po indukci limonem zvýšeno. Indukce karvonem o nižší koncentraci byla srovnatelná s indukci limonem, při zvýšení koncentrace karvonu došlo k zastavení biodegradace. Využití glycerolu jako zdroje uhlíku vedlo k menšímu úbytku PCB, ale bylo rozšířeno spektrum degradovaných kongenerů. Tento experiment poukazuje na skutečnost, že použité koncentrace používaných sekundárních metabolitů a stupeň chlorace přítomných kongenerů PCB hrají významnou roli v biodegradaci.

McLoughlin a spol.¹⁵ se zaměřili na vliv limonenu a α -pinenu, hlavní rostlinné látky vylučované do lesní půdy, na mineralizaci 2,4-dichlorfenolu (hlavní katabolický produkt degradace rozšířeného herbicidu a kontaminantu půdy i vody 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny¹⁶). Zemina pro tento experiment byla odebrána ze tří různých vegetačních typů vylučujících isopren a monoterpeny – z okolí borovice lesní, dubu letního a směsi trav rostoucích na rašelině. Mineralizace 2,4-dichlorfenolu v jednotlivých typech půdy se významně nelišila, nicméně α -pinen měl lepší vliv než limonen v travnaté půdě a v zemině z okolí borovice.

3.3. Fenolové látky

Fenolové látky představují další početnou skupinu sekundárních metabolitů. Tyto látky vznikají šikimátovou cestou, stejně jako aromatické aminokyseliny. Tato dráha probíhá u mikroorganismů a rostlin, ale u zvířat ne. Centrálním metabolitem je šikimová kyselina, která vzniká kondenzací fosfoenolpyruvátu a D-erythrosa-4-fosfátu. Ze šikimové kyseliny dále vznikají aromatické aminokyseliny, benzoové kyseliny a skořicové kyseliny. Modifikace těchto látek vedou k syntéze ligninů a lignanů, fenylypropanů a kumarinů¹⁷.

Dalším sledem reakcí vzniká také 2,3-dihydroxybenzoová kyselina, která je součástí enterobaktinu, silného sideroforu nalezeného v bakterii *E. coli* a dalších gramnegativních bakteriích. Siderofory jsou sloučeniny důležité pro získání dostatečného množství železa z prostředí ve formě využitelné pro růst mikroorganismů¹⁷.

Další významnou sloučeninou vznikající šikimátovou dráhou je *p*-aminobenzoová kyselina, která je součástí kyseliny listové (vitamin B₉)¹⁷.

L-Phe a L-Tyr slouží jako prekursor skořicové kyseliny a jejích derivátů (např. kyseliny kávové, ferulové nebo sinapové). Tyto kyseliny jsou dále využívány jako prekursor pro vznik ligninu (rostlinný polymer zesilující buněčné stěny rostlinných buněk sloužící také jako zásoba aromatických látek). Monomery využívané pro vznik ligninu jsou druhově závislé, ale většinou jde o skořicový alkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Spojování těchto jednotek je umožněno činností peroxidas. Monomery koniferylalkoholu mohou být spojovány pouze mezi sebou a jejich

dimery jsou označovány jako lignany¹⁷.

Skořicová kyselina a její deriváty mohou podléhat také redukci za vzniku sloučenin označovaných jako fenylpropanoidy. Příkladem je skořicový aldehyd obsažený v kůře skořicovníku, který se využívá v potravinářství jako koření a aroma. Podobně olej z hřebíčkovce kořeného obsahuje vysoké množství eugenolu, který je využíván jako anestetikum v zubní medicíně¹⁷.

Benzoové kyseliny mohou vznikat z intermediátů na počátku dráhy nebo alternativně z derivátů skořicové kyseliny. Tímto způsobem vzniká např. kyselina salicylová využívaná jako účinná látka v aspirinu¹⁷.

Hydroxylací derivátů skořicových kyselin vznikají kumariny, mezi které patří dikumarol s antikoagulačními účinky (předchůdce warfarinu používaného v současné době). Lineární formy jsou označovány jako psoraleny a mají schopnost vyvolávat pigmentaci kůže, díky čemuž jsou využívány v kosmetických přípravcích na opalování¹⁷.

Z esterů skořicové kyseliny a koenzymu A jako výchozích látek vznikají polyketidovou syntézou stilbeny, které mohou být dále prodlužovány stejnou cestou za vzniku flavonoidů. Flavonoidy jsou mezi rostlinami velmi rozšířené a často se vyskytují ve formě glykosidů. Většina flavonoidů obsahuje fenylbenzopyronové jádro a liší se v počtu a umístění hydroxylových skupin. U těchto sloučenin je znám antioxidační účinek (nejméně je znám u kvercetinu obsaženého v rostlinných pletivech ve vysoké koncentraci), který je využíván jako prevence kardiovaskulárních chorob nebo některých forem rakoviny¹⁷.

I v případě fenolových látek byl studován jejich vliv na stimulaci degradace organických xenobiotik. Např. Luo a spol. ve výše zmíněné studii¹³ zkoumali vliv kumarinu a naringinu se závěrem, že některé flavonoidy mají obdobný účinek na indukci mikrobiální degradace PCB jako terpeny a bifenyl.

4. Závěr

Z uvedených příkladů studií vyplývá, že při využití rostlin^{9,19,27–29} a jejich exudátů dochází v porovnání s kontrolami ke zvýšenému odbourávání kontaminantů. Tento nárůst se liší zejména v závislosti na vlastnostech použité zeminy a biologické dostupnosti kontaminantu, i když vliv jednotlivých rostlin a látek obsažených v jejich exudátech je také patrný.

Až do nedávné doby většina studií pracovala pouze s tzv. „kultivovatelnými“ mikroorganismy, případně byly vyhodnocovány pouze analytické výsledky úbytku PCB vlivem všech přítomných mikroorganismů. Účinek samotných asepticky pěstovaných rostlin bylo možno vyhodnotit pomocí tkáňových kultur³⁰. Ovšem roli dosud nekultivovatelných mikroorganismů bylo možno vysvětlit až v posledních letech s rozvojem metagenomických přístupů³¹ – zejména nových sekvenčních technologií, zavedení rutinních postupů izolace půdní DNA či RNA a rovněž značení stabilními izotopy.

Na základě výše uvedených faktů je velmi pravděpodobně možné vytipovat podmínky vyhovující konkrétnímu prostředí zahrnující rostliny schopné růstu v dané oblasti, případně přírodní látky, které by mohly nahradit jejich přítomnost, a přitom měly stejný podpůrný efekt, bakteriální kmeny, které nejlépe reagují na dostupné sloučeniny a jsou schopny efektivní degradace.

Práce vznikla za finanční podpory projektu GAČR 525/09/1058 a EU projekt MINOTAURUS (FP7-KBBE-2010-4/265946).

LITERATURA

- Demnerová K., Macková M., Speváková V., Beranová K., Kochánková L., Lovecká P., Ryslavá E., Macek T.: *Int. Microbiol.* 8, 205 (2005).
- Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnolog. Adv.* 18, 23 (2000).
- Macková M., Dowling D., Macek T.: *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background.* Springer, Dordrecht 2006.
- Vodrážka Z.: *Biochemie.* Academia, Praha 1999.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233 (2006).
- Singer A. C., Crowley D. E., Thompson I. P.: *Trends Biotechnol.* 21, 123 (2003).
- Singer A. C., Thompson I. P., Bailex M. J.: *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 239 (2004).
- Leigh M. B., Fletcher J. S., Fu X., Schmitz F. J.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 1579 (2002).
- Leigh M. B., Prouzová P., Macková M., Macek T., Nagle D. B., Fletcher J. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2331 (2006).
- Klouda P.: *Základy biochemie.* Pavel Klouda, Ostrava 2005.
- Hernandez B. S., Koh S.-C., Chial M., Focht D. D.: *Biodegradation* 8, 153 (1997).
- Singer A. C., Gilberts E. S., Luepromchai E., Crowley D. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 838 (2000).
- Luo W., D'Angelo E. M., Coyne M. S.: *Soil Biol. Biochem.* 39, 735 (2005).
- Tandlich R., Břežná B., Dercová K.: *Chemosphere* 44, 1547 (2001).
- McLoughlin E., Rhodes A. H., Owen S. M., Semple K. T.: *Environ. Pollut.* 157, 86 (2009).
- Hayward S., Muncey R. J., James A. E., Halsall C. J., Hewitt N. C.: *Atmos. Environ.* 35, 4081 (2001).
- Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products.* J. Wiley, Chichester 2009.
- Yi H., Crowley D. E.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 4382 (2007).
- Rezek J., in der Wiesche C., Macková M., Zdražil F., Macek T.: *Int. J. Phytorem.* 11, 66 (2009).
- Uhlik O., Ječná K., Macková M., Vlček Č., Hroudová M., Demnerová K., Pačes V., Macek T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6471 (2009).

21. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Leigh M. B., Demnerová K., Macek T.: Chem. Listy 102, 474 (2008).
22. Uhlík O., Ječná K., Leigh M. B., Macková M., Macek T.: Sci. Total Environ. 407, 3611 (2009).
23. Lambo A. J., Patel T. R.: J. Basic Microbiol. 46, 94 (2006).
24. Erickson B. D., Mondello F. J.: J. Bacteriol. 174, 2903 (1992).
25. Kahl S., Hofer B.: Microbiology 149, 1475 (2003).
26. Sylvestre M., Sirois M., Hurtubise Y., Bergeron J., Ahmad D., Shareck F., Barriault D., Guillemette I., Juteau J. M.: Gene 174, 195 (1996).
27. Kotyza J., Soudek P., Kafka Z., Vaněk T.: Chem. Listy 103, 540 (2009).
28. Mackova M., Prouzova P., Stursa P., Ryslava E., Uhlík O., Beranova K., Rezek J., Kurzawova V., Demnerova K., Macek T.: Environ. Sci. Pol. Res. 16, 817 (2009).
29. Šíma J.: Chem. Listy 105, 531 (2011).
30. Burkhard J., Macková M., Macek T., Kučerová P., Demnerová K.: Anal. Commun. 34, 287 (1997).
31. Kotrba P., Uhlík O., Ječná K., Macková M., Macek T.: Chem. Listy 102, 960 (2008).

L. Musilová, O. Uhlík, M. Macková, and T. Macek
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology Prague*): **The Role of Secondary Plant Metabolites in Bacterial Degradation of Organic Xenobiotics**

This article summarizes basic information about the role of plant secondary metabolites in the remediation of polychlorinated biphenyls (PCBs). Terpenes and phenolics are discussed more in detail with focus on their ability to stimulate microbial degradation of xenobiotics. The study points out that amendments of contaminated soil with plant secondary metabolites influences the removal of organic xenobiotics from soil. Many of these experiments have provided satisfactory results that can be used to improve bioremediation techniques.

VÝZNAM CHMELOVÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ

MARCEL KARABÍN, TEREZA HUDCOVÁ,
LUKÁŠ JELÍNEK a PAVEL DOSTÁLEKÚstav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technolo-
gická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Marcel.Karabin@vscht.cz

Došlo 18.4.12, přijato 18.6.12.

Klíčová slova: chmel, xanthohumol, prenylované flavonoi-
dy, fytoestrogeny, antikancerogenní účinky

Obsah

1. Úvod
2. Prenylované flavonoidy
3. Pozitivní účinky prenylflavonoidů na lidské zdraví
 - 3.1. Metabolismus prenylovaných flavonoidů
 - 3.2. Antioxidační vlastnosti
 - 3.3. Antikancerogenní vlastnosti
 - 3.4. Estrogenní vlastnosti
 - 3.5. Další pozitivní zdravotní účinky
4. Závěr

1. Úvod

Samičí hlávky chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.), používané v různě upravené podobě jako jedna ze základních surovin pro výrobu piva, obsahují kromě technologicky cenných látek (silice, α -hořké kyseliny, polyfenolové sloučeniny) i řadu dalších sekundárních metabolitů s pozitivními účinky na lidské zdraví. Už ve středověku byl chmel znám jako léčivá rostlina pro své uklidňující účinky, byl využíván i při jaterních chorobách a na čištění krve¹. Bakteriostatických a protizánětlivých vlastností odvaru z chmele bylo využíváno pro léčení špatně se hojících ran. Je tedy pochopitelné, že se chmel a další konopovité rostliny dostávají v posledních letech do popředí zájmu farmaceutického výzkumu jako zdroje nových fytoterapeutik².

Z látek, obsažených ve chmelové rostlině se nejvíce pozornosti věnuje prenylovanému chalkonu xanthohumolu, jehož jediným zdrojem v lidské výživě je právě pivo. Této látce jsou přisuzovány zajímavé antioxidační, protizánětlivé, antikancerogenní a antimikrobiální vlastnosti a podobně jako chmelová pryskyřice humulon inhibuje také proces resorpce vápníku z kostí. V neposlední řadě jsou některé další prenylované flavonoidy, jmenovitě

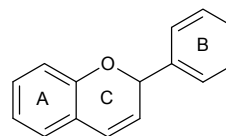
8-prenylnaringenin, velmi silnými fytoestrogeny, což umožňuje jejich aplikaci v odpovídajících oblastech medicíny^{3,4}.

Lze předpokládat, že zmíněné vlastnosti a skutečnost, že se jedné o látky z přírodního zdroje, otevrou v budoucnu dveře využití prenylovaných flavonoidů v prevenci celé řady chorob, nejen v podobě léčiv, ale i potravinových doplňků a zejména klasických (pivo) i funkčních potravin a nápojů s uměle zvýšeným obsahem těchto sloučenin.

2. Prenylované flavonoidy

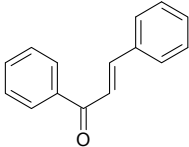
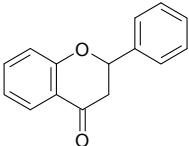
Flavonoidy jsou látky spadající do rozsáhlé skupiny rostlinných polyfenolů, pro které je charakteristická centrální struktura vycházející z molekuly flavanu (obr. 1), přičemž všechny tři cykly v tomto skeletu bývají substituovány (nejčastěji hydroxy- a methoxy- skupinami)⁵. Chmelové prenylflavonoidy se řadí do podskupin flavanonů a chalkonů, lišících se rozštěpením heterocyklu ve flavanovém skeletu (tab. I) a je pro ně charakteristická přítomnost prenylového nebo méně často geranylového řetězce na kruhu A. Svou strukturou i některými vlastnostmi tedy spíše připomínají chmelové pryskyřice. Skutečnost, že se jedná o látky na pomezí polyfenolových sloučenin a chmelových pryskyřic lze dokumentovat tím, že na rozdíl od jiných polyfenolových sloučenin nedochází k jejich syntéze v nespecifických buňkách pletiv chmelové rostliny, ale téměř výhradně (stejně jako je tomu u pryskyřic) v lupulinových žlázkách na trichomech listenů chmelových hlávek. Také samotná biosyntetická dráha je obdobná⁶, liší se pouze v druhu vstupující aminokyseliny, jak je uvedeno na obr. 2. V případě prenylflavonoidů je touto aminokyselinou tyrosin.

Nejvýznamnějším zástupcem prenylflavonoidů ve chmelu je xanthohumol ((*E*)-1-[2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)fenyl]-3-(4-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-on), jehož koncentrace se ve chmelových hlávkách pohybuje v rozmezí 0,2 až 1,1 hm.% v závislosti na odrůdě, ročníku sklizně a agrotechnických podmínkách. Spolu s ním se ve chmelu vyskytuje i řada dalších příbuzných sloučenin, jejichž obsahy jsou ovšem o jeden až dva řády nižší. Jedná se zejména o chalkon desmethylxanthohumol a odpovídající flavanony isoxanthohumol a 6- a 8-prenylnaringenin⁴.



Obr. 1. Základní flavanová struktura

Tabulka I
Prenylované chalkony a flavanony

Název skupin látek	Základní strukturní motiv	Konkrétní sloučeniny
Chalkony		xanthohumol desmethylxanthohumol xanthogalenol
Flavanony		isoxanthohumol 8-prenylnaringenin 6-prenylnaringenin 8-geranylnaringenin

3. Pozitivní účinky prenylflavonoidů na lidské zdraví

Přestože byl xanthohumol poprvé izolován a charakterizován už na počátku 20. století a podrobněji popsán⁷ v roce 1957, nebyla mu po dlouhou dobu, na rozdíl od jiných složek chmele, věnována větší pozornost. Důvodem byla skutečnost, že během klasické pivovarské technologie prakticky všechny xanthohumol isomeruje na isoxanthohumol (obr. 3), případně je odstraňován spolu s odpadními produkty⁸, takže se nepředpokládaly jeho významné technologické nebo biologické účinky. Teprve nástup moderní vědy, spojený v posledních desetiletích se snahou o nalezení nových zdraví prospěšných látek zejména v přírodních zdrojích, umožnil důkladné ověření celé řady jeho pozitivních vlastností.

3.1. Metabolismus prenylflavonoidů

Flavonoidy jsou, stejně jako ostatní polyfenoly, pro lidský organismus cizorodými látkami – xenobiotiky. V organismu existuje celá řada mechanismů, sloužících k jejich přeměně a následnému vyloučení. Na tomto procesu se kromě lidského metabolismu podílejí i bakterie kolonizující tlusté střevo⁹.

Vstup flavonoidů do organismu

Polyfenoly, vstupující do trávicího ústrojí spolu s potravou jsou velmi často konjugovány se sacharidy v podobě glykosidů. Tyto jsou následně v tenkém střevě deglykosylovány β -glukosidasami a takto vzniklé aglykony jsou vstřebávány stěnou střeva a transportovány do jater⁹. Prenylované flavonoidy piva naproti tomu obvykle glykosylovány nejsou a mohou se tedy vstřebávat spontánně v nezměněné podobě¹⁰.

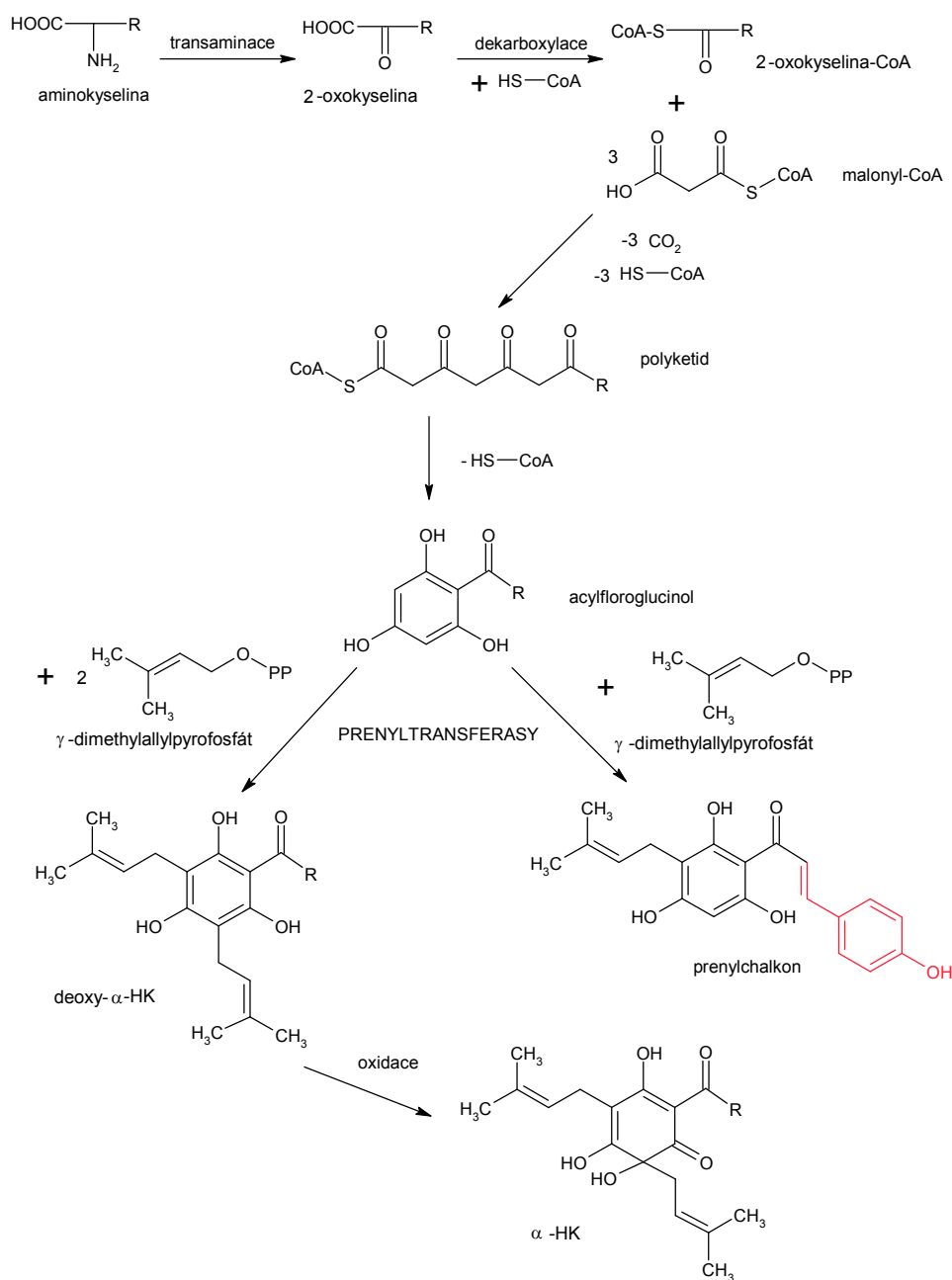
Metabolismus prenylflavonoidů v játrech

Významný podíl zmíněných látek procházejících stěnou tenkého střeva (zejména dvanáctníku) do krve je následně v játrech konjugován s kyselinou glukuronovou¹¹. Konjugát je následně se žlučí vyloučen zpět do tenkého střeva a dále přeměňován bakteriemi ve střevě tlustém. Kromě tohoto procesu mohou být prenylflavonoidy metabolizovány také sledem oxidačních reakcí¹², postihujícím převážně prenylový řetězec, kterých se účastní zejména enzymy cytochromu P450. Skutečnost, že jsou známy konkrétní enzymy podílející se na těchto přeměnách, otevírá cesty, které mohou v budoucnu vést k cílenému omezení těchto degradačních procesů a tím i k lepšímu využití přijímaných prenylflavonoidů v organismu.

Přeměny prenylflavonoidů v tlustém střevě

Kromě vstřebávání vody a solí se v tlustém střevě odehrává celá řada biochemických reakcí, majících v případě xenobiotik za následek toxifikaci případně detoxifikaci potenciálních jedů nebo naopak pozitivní i negativní změny příznivých účinků některých látek. Prenylované flavonoidy vykazují poměrně vysokou metabolickou stabilitu. Při pokusech na krysách bylo prokázáno, že až 89 % xanthohumolu je z organismu vylučováno v nezměněné podobě¹³. Příčinou je pravděpodobně nízká polarita, v důsledku přítomnosti prenylové skupiny. Bez ní by stejně jako u většiny ostatních flavonoidů docházelo k narušení základní flavanové struktury, poměrně rychlé degradaci střevními bakteriemi a tím i vymizení biologické aktivity^{9,14}.

Zvláštní pozornost v metabolismu prenylflavonoidů zasluhuje přeměna isoxanthohumolu na 8-prenylnaringenin, spočívající v demethylaci methoxyskupiny na 5' uhlíku¹⁵. 8-Prenylnaringenin, jehož silným estrogenním účinkům bude věnována pozornost v samostatné kapitole, se do lidského organismu přirozenou cestou v potravě dostává jen ve velmi malém množství a tato reakce by tak mohla mít stěžejní význam pro jeho dostupnost v tkáních.



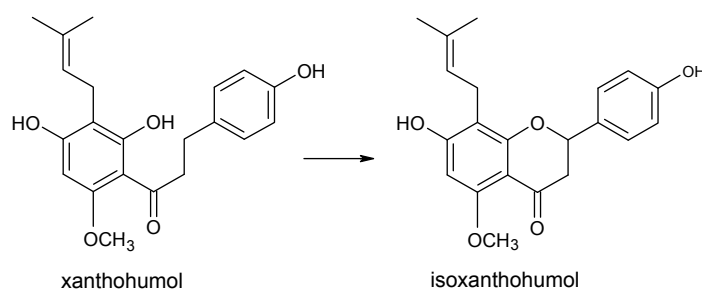
Obr. 2. Schéma biosyntézy prenylflavanoidů a měkkých pryskyřic

3.2. Antioxidační vlastnosti

Celá řada pozitivních zdravotních účinků prenylflavanoidů má svůj původ v antioxidačních vlastnostech, které jsou vlastní většině polyfenolových sloučenin¹⁶. Způsoby, kterými se tyto vlastnosti projevují, je možno shrnout do tří základních skupin^{17–19}. Polyfenoly jsou lapači volných

reaktivních (nejčastěji kyslíkatých) částic, jsou schopny inhibovat aktivitu lipoxigenas (EC 1.13.11.12) a prostřednictvím chelatace kovových iontů brání jejich katalytickému působení a tím i vzniku reaktivních částic.

Reaktivními formami kyslíku (reactive oxygen species – ROS) se rozumí částice, nejčastěji radikály, jako jsou např. hydroxylový, superoxidový a hydroperoxidový



Obr. 3. Isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol

radikál, případně singletový kyslík a peroxidový aniont²⁰. Tyto molekuly jsou schopny iniciovat sled reakcí, kterými jsou v organismu modifikovány polynenasycené mastné kyseliny, proteiny a nukleové kyseliny²¹. Tyto změny bývají spojovány s rozvojem primárních fází řady civilizačních chorob, jakými jsou určité typy rakoviny²², kardiovaskulární onemocnění²³, případně některé druhy neurodegenerativních onemocnění²⁴. Experimentálně bylo potvrzeno, že xanthohumol je už v koncentraci 1 μM výrazně účinnější v pohlcování hydroxylového (8,9-krát) i peroxylového (2,9-krát) radikálu než referenční antioxidant (derivát vitamínu E – TROLOX). Podobně byla potvrzena schopnost xanthohumolu pohlcovat superoxidový radikál²⁵.

Schopnost flavonoidů inhibovat enzymovou aktivitu lipoxxygenas (EC 1.13.11.12) bezprostředně souvisí se vznikem atherosklerózy. Jednou z příčin vzniku tohoto onemocnění je oxidace některých typů lipidových sloučenin, zejména lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), ke které může docházet přímo, za katalytického přispění Cu^{2+} iontů. Bylo prokázáno, že prenylované flavonoidy, zejména xanthohumol a ostatní prenylchalkony jsou schopny této reakci bránit účinněji než například α -tokoferol²⁶. Druhá cesta oxidace lipidů využívá specifických enzymů – lipoxxygenas, kterých má lidský organismus k dispozici několik typů, lišících se místem inkorporace kyslíku do molekuly mastné kyseliny. Enzymová aktivita těchto enzymů může být inhibována několika způsoby, zejména chelatací iontů železa, které jsou součástí vazebných míst enzymů, inhibicí translokace enzymu a nebo pohlcováním vzniklých hydroperoxidů, které umožňují regeneraci enzymu prostřednictvím oxidace železnatých iontů v jeho molekule. Byly prokázány vysoké inhibiční schopnosti celé řady flavonoidů, často specifické jen pro některé lipoxxygenasy. Příčinou této specifity je zejména počet a vzájemná poloha jednotlivých hydroxy- a methoxyskupin, konformace daného enzymu a případná glykosylace flavonoidní sloučeniny²³.

V současné době je při studiu tohoto tématu věnována prenylovaným flavonoidům jen malá pozornost (důvodem je jejich nízký příjem v potravě). Na druhou stranu přítomnost navázané prenylové skupiny činí tyto sloučeniny výrazně lipofilnějšími. Tato skutečnost by v případě zajištění

dostatečného přísunu prenylflavonoidů, mohla zajistit významné zvýšení ochrany LDL před oxidací a tím napomoci účinné prevenci vzniku artherosklerózy⁴.

3.3. Antikancerogenní vlastnosti

Rakovinné bujení je ve vyspělých zemích druhou nejčastější příčinou smrti (po kardiovaskulárních chorobách²⁷). Proto se do popředí zájmu v posledních letech dostávají látky s chemopreventivním účinkem, tj. látky schopné zastavit nebo zvrátit proces vzniku nádoru prostřednictvím inhibice dějů, které tento proces iniciují. Významnou skupinou látek s těmito vlastnostmi jsou mimo jiné i prenylované flavonoidy. Kromě přímého antioxidačního účinku těchto látek, který byl popsán v předchozí kapitole, spočívá mechanismus jejich chemopreventivního účinku zejména v inhibici metabolické aktivace prokancerogenů a indukcii aktivity kancerogen-detoxifikačních enzymů. V pokročilé fázi růstu nádoru jsou prenylflavonoidy schopny tento proces zpomalit prostřednictvím inhibice syntézy DNA, inhibice angiogeneze a navození apoptózy nádorových buněk. Soubor těchto vlastností a v běžných koncentracích prakticky nulová cytotoxicita činí z xanthohumolu a ostatních prenylflavonoidů jednu z nejnádějnějších skupin látek s antikancerogenními účinky²⁸.

Inhibice metabolické aktivace prokancerogenů

Smyslem biotransformace xenobiotik (včetně kancerogenů nebo prokancerogenů) je zejména zvýšení jejich polarity, tím i zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě a snazší vylučování z organismu. U živočichů probíhá obvykle ve dvou fázích, z nichž první se nazývá oxidační (derivatizační), využívá zejména enzymového systému monooxygenas cytochromu P450 a spočívá v souboru oxidačních, demethylačních a hydroxylačných reakcí¹². Ve druhé fázi (konjugační) dochází ke konjugaci těchto aktivovaných produktů a malých hydrofilních molekul (glukuronát, glycin, aktivní sulfát, cystein, aktivní acetylát), čímž se dále zvýší polarita molekuly. Zmíněné procesy mohou kromě detoxifikace vést i ke vzniku řady produktů s toxickými, mutagenními a kancerogenními vlastnostmi^{29,30}.

Typickým příkladem pozitivních vlastností prenylovaných flavonoidů může být například jejich vliv na metabolismus potenciálních kancerogenů ze skupiny heterocyklických aminů (HA), například 2-amino-methylimidazo[4,5-f]chinolinu, 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridinu a dalších prokancerogenů (benzopyren), vznikajících při kulinární úpravě potravin. Xanthohumol a další prenylflavonoidy jsou schopny inhibovat aktivitu celé řady enzymů patřících do skupiny již zmíněného cytochromu P450, které se účastní metabolismu těchto látek^{31–33}.

Studie prováděné *in vitro* naznačují, že na rozdíl od jednoduchých polyfenolových látek, jako jsou deriváty kyseliny hydroxybenzoové a skořicové, jsou flavonoidy a zejména prenylované flavonoidy silnými inhibitory aktivit některých monooxygenas (EC 1.14.14.1), zejména Cyp1A1, Cyp1B1 a Cyp1A2^{30,34}. Podstatný je také fakt, že se tyto vlastnosti projevují už ve velmi nízkých koncentracích (0,02 μM u xanthohumolu a 0,5 μM u isoxanthomolu a 8-prenylnaringenin^{25,35}). Jednotlivé práce se liší v interpretaci pořadí jednotlivých prenylflavonoidů z pohledu jejich účinnosti. Zatímco Miranda a spol.³¹ uvádí pokles účinnosti v pořadí 8-prenylnaringenin > isoxanthohumol > xanthohumol, v jedné z dalších studií³⁵ bylo zjištěno pořadí opačné. Důvodem těchto rozdílů budou pravděpodobně určité odlišnosti v použité metodice a zejména ve spektru enzymů, pro které byly hodnoty sledovány. V každém případě je možné konstatovat, že inhibice exprese a aktivity enzymů cytochromu P450 prenylovanými flavonoidy může být rozhodujícím procesem v ochraně organismu před těmito významnými potravními kancerogeny.

Indukce tvorby kancerogen-detoxifikačních enzymů

Kromě inhibice enzymové aktivity enzymů aktivujících prokancerogeny, která byla zmíněna v předchozí kapitole, může být chemopreventivní účinek zajištěn detoxifikací kancerogenů prostřednictvím tzv. enzymů II. fáze³⁰. Jedním z těchto enzymů je NAD(P)H: chinonreduktasa (EC 1.6.5.2), katalyzující přeměnu chinonů redukcí na hydrochinony, které jsou vhodnějšími substráty pro následnou konjugaci.

Bylo zjištěno, že xanthohumol a nejméně šest dalších prenylchalonů a prenylflavanonů je schopno v koncentracích nad 1 μM několikanásobně zvyšovat aktivitu chinonreduktasy v jaterních buňkách myši (Hepa 1c1c7). Pro jednotlivé látky se koncentrace nezbytné pro dvojnásobné zvýšení aktivity enzymu pohybovaly v rozmezí 1,8 až 10,1 μM , přičemž lepších (nižších) hodnot bylo dosaženo použitím prenylovaných chalonů. Naproti tomu flavonoidy neobsahující prenylový nebo geranylový řetězec byly v tomto směru prakticky neúčinné. Je pravděpodobné, že kromě přítomnosti tohoto řetězce hraje opět roli i počet, druh a poloha jednotlivých substituentů u jednotlivých flavonoidů³⁶.

Inhibice růstu nádoru

V případě, že selžou ochranné mechanismy spojené s metabolismem prokancerogenů a dojde k iniciaci buňky

a vzniku nádoru, existuje celá řada mechanismů schopných tento proces zpomalit nebo zcela zastavit. Z tohoto pohledu byly prenylované flavonoidy zkoumány s ohledem na jejich antiproliferační schopnosti.

Odhaduje se, že přibližně 18 % všech případů rakoviny souvisí s chronickými záněty³⁷. Jedním z důvodů je nadměrná produkce tkáňových hormonů, především prostaglandinů a oxidu dusnatého. Tyto látky se podílejí na vzniku zánětlivých reakcí a iniciují formování krevních a lymfatických cév (angiogenesi), které následně slouží k zásobování nekontrolovatelně rostoucích buněk nádoru. Zvýšená tvorba prozánětlivých faktorů je způsobena aktivací regulačního jaderného faktoru κB . Tento regulační protein následně umožní transkripci genu pro tvorbu enzymů ze skupiny cyklooxygenas (zejména induktivní formy COX-2), katalyzujících vznik prostaglandinů oxidací a cyklizací molekul kyseliny arachidonové. Narušená regulace tohoto děje může mít za následek nadměrnou produkci prostaglandinů, vznik chronických zánětů, nadměrnou proliferaci buněk a rozvoj rakovinného bujení^{38,39}.

Jednou z možných cest, kterou v těchto případech prenylflavonoidy uplatňují své chemopreventivní vlastnosti, je právě inhibice funkce zmíněného jaderného faktoru κB (cit.⁴⁰). Jeho aktivace je závislá na vnitrobuněčném redox potenciálu (často je reakcí na poškození buněk volnými radikály), takže je zřejmé, že flavonoidy mohou, v důsledku svých antioxidačních vlastností, tento děj významným způsobem ovlivnit⁴¹. Významnější je však funkce xanthohumolu jako inhibitoru tvorby enzymů cyklooxygenasy1 (COX-1, konstitutivní enzym, EC 1.14.99.1, IC_{50} pro xanthohumol je 17 μM) a cyklooxygenasy2 (COX-2, induktivní enzym, EC 1.14.99.1, IC_{50} pro xanthohumol je 42 μM)²⁵.

Xanthohumol rovněž působí jako inhibitor vzniku oxidu dusnatého (NO), látky se silnými vasodilatačními účinky, která se významně podílí na rozšiřování cévního řečiště a tím na vzniku a vyživování nádoru⁴². Další nebezpečí oxidu dusnatého spočívá v reakci s volnými radikály za vzniku peroxydusitanových iontů, jejichž silné oxidační účinky mohou způsobit poškození buněčné membrány. V zásadě může být prenylflavonoidy inhibován přímo jeho vychytáváním či potlačením exprese enzymu iNOS (synthasa oxidu dusnatého, EC 1.14.13.39)^{37,42}.

Přirozený ochranný mechanismus organismu proti nadměrné proliferaci buněk je apoptóza (řízená buněčná smrt), využívající bohatý enzymový aparát, do kterého patří zejména rozsáhlá skupina proteolytických enzymů (kaspas). Pro nádorové buňky je charakteristická značná rezistence vůči tomuto ději⁴³. *In vitro* byla prokázána schopnost prenylflavonoidů (jmenovitě xanthohumolu a isoxanthohumolu) urychlovat uvolňování cytochromu c a aktivaci kaspas 3 a 7 u embryonálních fibroblastů myši (3T3-L1)^{44,45}. Tato skutečnost kromě již zmíněných proapoptických vlastností naznačuje určité možnosti využití prenylovaných flavonoidů pro léčbu nebo zmírnění obezity. Experimentálně bylo také prokázáno, že xanthohumol *in vitro* působí antiproliferačně vůči buňkám karcinomu prsu (MCF-7, IC_{50} je 13 μM), tlustého střeva (HT-29)

a vaječnicků (A-2780, IC_{50} je $0,52 \mu M$)⁴⁶.

Prenylflavonoidy mají rovněž schopnost zastavovat buněčný cyklus, a to především v S-fázi, G_1 fázi a na jejich rozhraní³⁸. Xanthohumol dokáže *in vitro* inhibovat aktivitu DNA polymerasy α (EC 2.7.7.7, IC_{50} pro xanthohumol je $23 \pm 3,2 \mu M$)²⁵, tím dochází ke zpomalení replikace DNA, a nádorové buňky se dále nedělí. DNA polymerasa α je jediný eukaryotní enzym, který dokáže zahájit DNA syntézu *de novo*. Prenylflavonoidy rovněž inhibují funkci DNA-topoisomerasy (EC 5.99.1.2), která katalyzuje topologické změny v DNA, které jsou nezbytné pro její replikaci⁴⁷. V pozdějším stádiu kancerogeneze se uplatňuje schopnost navodit ukončení buněčné diferenciaci v transformovaných buňkách.

3.4. Estrogenní vlastnosti

Klimakterium (přechod) je přirozené období v životním cyklu ženy, kdy dochází k postupnému utlumování funkce vaječnicků a tím i k snižování produkce pohlavních hormonů, zejména estrogenů (17- β -estradiol)⁴⁸. Nedostatek hormonů má dopad například na úbytek kostní hmoty (osteoporóza), což vede k častějším zlomeninám. Dále dochází důsledkem tohoto poklesu ke zvýšení hodnot obsahu cholesterolu, což má za následek nárůst rizika kardiovaskulárních onemocnění. Menopauza je doprovázena řadou dalších nepříjemných symptomů, jako jsou návaly horka, pocení, poruchy spánku, časté změny nálad, závratě či deprese⁴⁹.

Jedno z možných řešení těchto problémů by mohlo spočívat v dietě zajišťující dostatečný přísun fytoestrogenů, které vykazují obdobnou biologickou (estrogenní) aktivitu jako samičí pohlavní hormony⁵⁰.

Chmel je považován za velmi bohatý zdroj přírodních fytoestrogenů⁵¹. Dříve byly jeho estrogenní účinky přisuzovány xanthohumolu, ovšem novější studie naznačují, že tato látka, jinak velice biologicky aktivní, nevykazuje významnou estrogenní aktivitu^{8,52}. Stejně je tomu také u ostatních prenylovaných chalconů chmele. Jejich význam spočívá ve skutečnosti, že isomerací prenylchalconů v průběhu trávicího procesu vznikají odpovídající prenylflavanony, což jsou prakticky bez výjimky látky estrogenně aktivní¹⁵. Isomerací chalconu desmethylxanthohu-

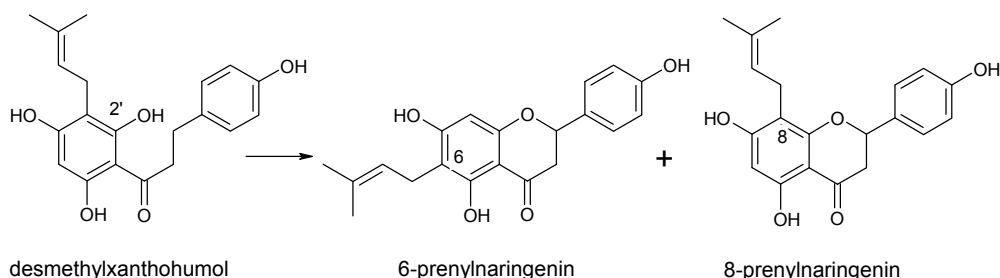
molu (obr. 4) tak vzniká 8-prenylnaringenin, který je považován za jeden z nejučinnějších dosud izolovaných fytoestrogenů. Tato sloučenina, vyskytující se ve chmelu v koncentraci kolem 100 mg kg^{-1} (cit.⁵³), vykazuje přibližně stokrát vyšší aktivitu než fytoestrogen genistein⁵⁴. Koncentrace potřebná k dosažení 50% jejího maximálního estrogenního vlivu (EC_{50}) byla stanovena u 8-prenylnaringenu 4,4 nM, zatímco EC_{50} 17- β -estradiolu je 0,82 nM (cit.⁵⁵). Estrogenní účinky chmelových prenylflavonoidů klesají v řadě 8-prenylnaringenin >> 6-prenylnaringenin >> 8-geranylnaringenin a 6,8-diprenylnaringenin⁵². Slabé estrogenní účinky byly prokázány rovněž u isoxanthohumolu, který navíc během trávení podléhá demethylaci právě na 8-prenylnaringenin¹⁵, což významně zvyšuje estrogenní potenciál chmele a zejména piva, ve kterém se isoxanthohumol vyskytuje v koncentracích až okolo $3,5 \text{ mg l}^{-1}$ (cit.³).

Mechanismus účinku spočívá v aktivaci estradiolových receptorů, jež jsou známy ve dvou subtypech: typ ER α a ER β . 8-Prenylnaringenin má přibližně dvakrát větší afinitu k estrogennímu receptoru ER α a je ve vztahu k tomuto receptoru jen asi 70× méně aktivní než 17- β -estradiol⁵⁴.

Fytoestrogeny vykazují kromě estrogenního účinku také účinky antiestrogenní, a to kompetitivní inhibicí zabraňující navázání estrogenu na receptor. Tento efekt je závislý na mnoha faktorech, například na koncentraci fytoestrogenů a endogenních estrogenů⁵⁰. Vliv má však (antiestrogenní účinky se projevují především před menopausou, kdy je hladina endogenního estrogenu vysoká), zdravotní stav a pohlaví subjektu.

Účinek fytoestrogenů se nemusí projevovat pouze interferencí s těmito estrogenními receptory, ale mohou ovlivňovat aktivitu různých enzymů. Významná je interference s enzymem aromatasou (EC 1.14.14.1), která reguluje hladinu estradiolu v krvi prostřednictvím katalýzy reakce přeměňující androgeny na estrogeny (z androstenedionu a testosteronu)⁴⁰.

Nedostatečná produkce estradiolu je v lékařské praxi často kompenzována náhradní hormonální terapií, spočívající v aplikaci poměrně vysokých dávek hormonů⁵⁵. Tato léčba, která na jednu stranu významně eliminuje negativní příznaky klimakteria a snižuje riziko některých kardiovaskulárních onemocnění, může mít ovšem negativní



Obr. 4. Isomerace desmethylxanthohumolu na estrogenně aktivní prenylnaringeniny

dopady zejména v souvislosti se zvýšeným rizikem výskytu karcinomu prsu a dělohy^{50,56} a zvýšeným rizikem vzniku trombózy v důsledku zvýšení srážlivosti krve⁵⁷. Naproti tomu nebyly prozatím u fytoestrogenů prokázány žádné negativní vedlejší účinky ani v případě poměrně vysokých dávek⁴. I přes výrazně slabší (o tři až čtyři řády) estrogenní vlastnosti by se tak mohly tyto látky stát významným doplňkem konvenční léčby menopauzálních problémů².

3.5. Další pozitivní zdravotní účinky

Antibakteriální a antivirotické vlastnosti

Prenylované flavonoidy působí prokazatelně antiinfekčně proti celé řadě mikroorganismů, zahrnujících bakterie, viry, plísňe i protozoa⁵⁸. Bylo zjištěno, že xanthohumol inhibuje růst grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus*⁵⁹, a *Streptococcus mutans*, která se podílí na infekcích dutiny ústní a vzniku zubního kazu⁶⁰. Nejnižší koncentrace, schopná zabránit viditelnému nárůstu zubního plaku způsobenému bakterií *Streptococcus mutans* byla 35,3 μM (cit.⁶⁰). V souvislosti s případným využitím v hygieně ústní dutiny je ovšem třeba zmínit jen omezenou použitelnost většiny chmelových extraktů, zejména v souvislosti s jejich hořkou chutí.

Antivirotická aktivita xanthohumolu v kombinaci s interferonem α -2b byla testována vůči hovězímu viru způsobujícímu průjem (bovine viral diarrhea virus – BVDV E2), který vykazuje značnou podobnost s virem způsobujícím lidskou hepatitidu typu C. Bylo prokázáno, že přídavek xanthohumolu zesiluje antivirotické účinky interferonu už při koncentraci 3,13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁶¹). Byla také publikována rozsáhlá studie, věnující se sledování antivirotických vlastností nejvýznamnějších chmelových látek (α - a β -hořké kyseliny, silice, iso-hořké kyseliny a prenylované flavonoidy). Ze jmenovaných složek byla prokázána antivirotická aktivita pouze u xanthohumolu, isoxanthohumolu a iso- α -hořkých kyselin, zejména vůči viru oparu (herpes simplex virus – HSV 1 a HSV 2), cytomegaloviru (CMV), rhinoviru a už zmíněnému BVD viru⁶². Práce čínských autorů naznačuje také určitou aktivitu xanthohumolu ve vztahu k inhibici replikace viru HIV-1, i když doposud nebylo upřesněno, jakým mechanismem k tomu dochází⁶³.

Využití vlastností prenylflavonoidů v kosmetice

Zmíněné pozitivní zdravotní účinky prenylovaných flavonoidů i dalších složek chmelové rostliny nalézají v poslední době uplatnění, kromě klasické medicíny, také v kosmetickém průmyslu.

Pozornost je věnována zejména jejich antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem, kterých by bylo možno využít pro ochranu pleti před stárnutím⁶⁴ a baktericidním účinkům, díky kterým by se mohly začít využívat jako složky prostředků pro léčbu akné (acne vulgaris)⁶⁵.

4. Závěr

I přes obrovský rozmach, který zažívá vývoj a výroba nových, zcela syntetických léčiv, si rostliny zachovávají svoji nezastupitelnou roli zdroje řady sekundárních metabolitů se specifickými terapeutickými vlastnostmi. Mezi tyto rostliny patří také chmel, jehož samičí hlávky obsahují unikátní látky ze skupiny prenylovaných flavonoidů. Tyto sloučeniny již byly zkoumány s ohledem na své antioxidační, antikancerogenní, antitrombotické a estrogenní účinky a získané výsledky prokazují jejich jednoznačné pozitivní vlastnosti. Zvláštní pozornost zasluhují prenylflavonoidy pro své antikancerogenní vlastnosti. Jsou schopny pozitivně ovlivňovat řadu dějů v průběhu kancerogeneze, počínaje inhibicí aktivace prokancerogenů, až po schopnost zpomalovat růst již vzniklého nádoru. Velká pozornost je věnována také estrogením vlastnostem jednoho z nejsilnějších doposud známých fytoestrogenů – 8-prenyl-naringenin, který je již součástí některých potravních doplňků pro zmírnění obtíží žen během menopausy. Lze tedy očekávat, že v budoucnu prenylované flavonoidy naleznou uplatnění v celé řadě oborů humánní medicíny.

Tato práce vznikla za finanční podpory MZe ČR (QI111B053).

LITERATURA

1. Blumenthal M.: *The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines*. American Botanical Council, Thieme, Austin 1998.
2. Zanolli P., Zavatti M.: *J. Ethnopharmacol.* 116, 383 (2008).
3. Magalhães P. J., Carvalho D. O., Cruz J. M., Guido L., F., Barros A. A.: *Nat. Prod. Commun.* 4, 591 (2009).
4. Stevens J. F., Page J. E.: *Phytochemistry* 65, 1317 (2004).
5. Velišek J.: *Chemie potravin*. Osis, Tábor 1999.
6. Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens R.: *Brewing: Science and Practise*. Woodhead Publishing, Cambridge 2004.
7. Verzele M., Stockx J., Fontijn F., Anteunis M.: *Bull. Soc. Chim. Belg.* 66, 452 (1957).
8. Hofta P., Dostálek P., Basařová G.: *Chem. Listy* 98, 825 (2004).
9. Possemiers S., Verstraete W., Van De Wiele T., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 74. Elsevier, San Diego 2009.
10. Nikolic D., Yongmei L., Chadwick L. R., Van Breen R. B.: *Pharm. Res.* 23, 864 (2006).
11. Yilmazer M., Stevens J. F., Buhler D. R.: *FEBS Lett.* 491, 252 (2001).
12. Guo J., Nikolic D., Chadwick L. R., Pauli G. F., Van Breen R.: *Drug Metab. Dispos.* 34, 1152 (2006).
13. Nookandeh A., Frank N., Steiner F., Ellinger R., Schneider B., Gerhäuser C., Becker H.: *Phytochemis-*

- try 65, 561 (2004).
14. Possemiers S., Heyerick A., Robbens V., De Keukeleire D., Verstraete W.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 6281 (2005).
 15. Possemiers S., Bolca S., Grootaert C., Heyerick A., Decroos K., Dhooge W., De Keukeleire D., Rabot S., Verstraete W., Van De Wiele T.: *J. Nutr.* 136, 1862 (2006).
 16. Čepička J., Karabín M.: *Chem. Listy* 96, 90 (2002).
 17. Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.: *Přívodství*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2010.
 18. Cook C. N., Samman S.: *J. Nutr. Biochem.* 7, 66 (1996).
 19. Pietta G. P.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
 20. Réblová Z.: *Chem. Listy* 105, 667 (2011).
 21. Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J.: *FASEB J.* 17, 1195 (2003).
 22. Manda G., Nechifor M. T., Neagu T. M.: *Curr. Chem. Biol.* 3, 22 (2009).
 23. Mladěnka P., Zatloukalová L., Filipický T., Hrdina R.: *Free Radical Biol. Med.* 49, 963 (2010).
 24. Aslan M., Özben T.: *Curr. Alzheimer Res.* 1, 111 (2004).
 25. Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H., Frank N., Bartsch H., Becker H.: *Mol. Cancer Ther.* 1, 959 (2002).
 26. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3876 (2000).
 27. Cibíková P., Šturdíková M., Maruna M.: *Chem. Listy* 104, 12 (2010).
 28. Gerhäuser C.: *Eur. J. Cancer* 41, 1941 (2005).
 29. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: *Chem. Listy* 94, 913 (2000).
 30. Moon Y. J., Wang X., Morris M. E.: *Toxicol. In Vitro* 20, 187 (2006).
 31. Miranda C. L., Yang Y. H., Henderson M. C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *Drug Metab. Dispos.* 28, 1297 (2000).
 32. Plazar J., Žegura B., Lah T. T., Filipič M.: *Mutat. Res.* 638, 1 (2007).
 33. Ferik F., Huber W. W., Filipič M., Bichler J., Haslinger E., Mišík M., Nersesyan A., Grasl-Kraupp B., Žegura B., Knasmüller S.: *Mutat. Res.* 691, 17 (2010).
 34. Nozawa H., Kondo K., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 65. Elsevier, San Diego 2009.
 35. Henderson M. C., Miranda C. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *Xenobiotica* 30, 235 (2000).
 36. Miranda C. L., Aponso G. L. M., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R.: *Cancer Lett.* 149, 21 (2000).
 37. Gerhäuser C., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 68. Elsevier, San Diego 2009.
 38. Ramos S.: *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507 (2008).
 39. Araújo J. R., Gonçalves P., Martel F.: *Nutr. Res.* 31, 77 (2011).
 40. Monteiro R., Faria A., Azevedo I., Calhau C.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 105, 124 (2007).
 41. Ramos S.: *J. Nutr. Biochem.* 18, 427 (2007).
 42. Nozawa H., Zhao F., Kondo K., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 77. Elsevier, San Diego 2009.
 43. Ficková M., Nagy M.: *Chem. Listy* 101, 131 (2007).
 44. Yang J., Della-Fera M. A., Rayalam S., Baile C. A.: *Apoptosis* 12, 1953 (2007).
 45. Deeb D., Gao X., Jiang H., Arbab A. S., Dulchavsky S. A., Gautam S. C.: *Anticancer Res.* 30, 3333 (2010).
 46. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Bughler D. R.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 271 (1999).
 47. Ross J. A., Kasum Ch. M.: *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19 (2002).
 48. Lobo R. A., Kelsey J. L., Marcus R.: *Menopause. Biology and Pathobiology*. Academic Press, Orlando 2000.
 49. Lapčík O., Sosvorová L.: *Interní Med.* 13, 38 (2011).
 50. Moravcová J., Kleinová T.: *Chem. Listy* 96, 282 (2002).
 51. Kuřec M., Hofa P., Dostálek P.: *Kvasny Prum.* 10 (51), 342 (2005).
 52. Milligan S. R., Kalita J. C., Pocock V., Kauter V. V., Stevens J. F., Deinzer M. L., Rong H., De Keukeleire D.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4912 (2000).
 53. Milligan S. R., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 72. Elsevier, San Diego 2009.
 54. Schaefer O., Humpel M., Fritzemeier K. H., Bohlmann R., Schleuning W. D.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 359 (2003).
 55. Milligan S., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., De Cooman L., Rong H., De Keukeleire D.: *Reproduction* 123, 235 (2002).
 56. Effenberger K. E., Westendorf J., v knize: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy V. R., ed.), kap. 74. Elsevier, San Diego 2009.
 57. Van Hylckama Vlieg A., Mideldorp S.: *J. Thromb. Haemostasis* 9, 257 (2011).
 58. Gerhäuser C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 827 (2005).
 59. Mizobuchi S., Sato Y.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 2771 (1985).
 60. Bhattacharya S., Virani S., Zavro M., Haas G. J.: *Economic Botany* 57, 118 (2003).
 61. Zhang N., Liu Z., Han Q., Chen J., Lv Y.: *Phytomedicine* 17, 310 (2010).
 62. Buckwold V. E., Wilson R. J. H., Nalca A., Beer B. B., Voss T. G., Turpin J. A., Buckheit R. W., Wei J., Wenzel-mathers M., Walton E. M., Smith R. J., Pallansch M., Ward P., Wells J., Chuvala L., Sloane S., Paulman R., Russel J., Hartman T., Ptak R.: *Antiviral Res.* 61, 57 (2004).
 63. Wang Q., Ding Z., Liu J., Zheng Y.: *Antiviral Res.* 64, 189 (2004).

64. Philips N., Bynum D., Hwang H.: Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents *Med. Chem.* 9, 142 (2010).
65. Yamaguchi N., Satoh-Yamaguchi K., Ono M.: *Phyto-medicine* 16, 369 (2009).

M. Karabín, T. Hudcová, L. Jelínek, and P. Dostálek (*Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Importance of Hop Prenylflavonoids for Human Health**

In recent years, a growing interest in health-promoting effects of hop constituents has been observed. Xanthohumol is a hop prenylated chalcone, which shows a wide range of biological activities such as antioxidant, anticancerogenic, antimicrobial and estrogenic. Most interesting findings obtained with xanthohumol and other prenylated hop flavonoids in preclinical and clinical studies are summarized. The review is primarily focused on the effects on human health. Biosynthesis of prenylated flavonoids in plants and their biotransformations in humans are also mentioned.

**FENOLICKÉ METABOLITY LISTOV
Karwinskia humboldtiana (Schult.) Zucc.****PAVEL MUČAJ^a, MILAN NAGY^a, FRANTIŠEK
ŠERŠEŇ^b, EMIL ŠVAJDLENKA^c, JOSEF
DROZD^c, MICHAL ŠTUBER^d a TIBOR
LIPTAJ^d**^a Katedra farmakognózie a botaniky, Farmaceutická fakulta, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR, ^b Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, SK-842 15 Bratislava, SR, ^c^d Ústav prírodných liečiv, Farmaceutická fakulta VFU, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ČR, ^e Ústav analytickej chémie, Oddelenie NMR a hmotnostnej spektrometrie, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR mucaji@fpharm.uniba.sk

Došlo 17.7.11, prepracované 2.11.11, prijaté 23.11.11.

Kľúčové slová: *Karwinskia humboldtiana*, antioxidačná aktivita, flavonoidy**Úvod**

Rod *Karwinskia* z čeľade Rhamnaceae zahŕňa 15 druhov stromov alebo krov rastúcich v subtropických a tropických oblastiach Severnej Ameriky. *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. je najrozšírenejším a najznámejším druhom tohto rodu. V týchto oblastiach je známa ako jedovatá rastlina, ktorá pri intoxikácii plodmi poškodzuje organizmus niektorých zvierat a ľudí. Po požití plodov rastliny sa rozvíja vzostupná symetrická paralýza končiaci paralýzou dýchacích svalov, čo môže zapríčiniť smrť^{1,2}. Za tento účinok sú zodpovedné toxíny, identifikované ako 9,10-dihydroxyantracenóny a označované na základe ich molekulových hmotností (T-496, T-514, T-516 a T-544). Najvýznamnejším z nich je toxín T-514 (peroxizomicín A1), ktorý poškodzuje peroxizómy. Známý je aj jeho toxický efekt na rakovinové bunky pečeneového a pľúcneho tkaniva a tkanív hrubého čreva. Mechanizmus tohto účinku zatiaľ nebol úplne vysvetlený. Je však známe, že indukuje apoptózu ľudských promyelocytických leukemických buniek (HL-60) a je inhibítorom topoizomérázy II (cit.^{3,4}). Väčšina prác zaoberajúcich sa obsahovými látkami rodu *Karwinskia* sa venuje spomínaným toxínom, ich účinkom resp. stanoveniu v rôznych častiach rastlín^{5,6}.

Cieľom práce bolo stanoviť antioxidačnú účinnosť metanolového extraktu listov *Karwinskia humboldtiana* po jeho rozdelení medzi vzájomne sa nemišajúce rozpúšťadlá a na základe zistenej antioxidačnej aktivity izolovať látky, ktoré by sa nej mohli podieľať. Antioxidačná aktivi-

ta jednotlivých podielov (petroléterový, chloroformový, etylacetátový, *n*-butanolový a vodný) bola vyhodnotená ako schopnosť vychytávať DPPH a hydroxylové radikály.

Experimentálna časť

Chemikálie a prístroje

5,5-Dimetyl-1-pyrolin-*N*-oxid (DMPO) a 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) a acetonitril pre HPLC vyrába Sigma-Aldrich Ltd. (USA). Metanol, 1-butanol (*n*-butanol), petroléter, chloroform, benzén, acetón, dimetyl-sulfoxid (DMSO), octan etylový (etylacetát), izopropanol (*i*-PrOH) a 2-butanón – vždy p.a. kvality, CH₃COOH (98%, p.a.), HCOOH (85%, p.a.), HCl (35%, p.a.) a H₂O₂ (30%) dodáva Centralchem, s.r.o, Slovensko. BSTFA (bis-trimetylsilyltrifluoracetamid), TMCS (trimetylchlorosilán) a CD₃OD vyrába Sigma-Aldrich Ltd. (USA).

Absorpčné spektrá boli snímané prístrojom Tecan Infinite M 200 (Tecan AG, Rakúsko) v metanole ako aj po následnom pridaní špecifických diagnostických skúmadiel⁷. Spektrá elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR) boli zaznamenávané prístrojom ERS 230 (ZWG Akad. Wiss. Berlin, SRN).

Optická otáčavosť bola meraná na prístroji Polamat A (C. Zeiss Jena, SRN) v metanole.

Podmienky HPLC analýzy: prístroj Hewlett-Packard HP 1100 s DAD detektorom. Ako stacionárna fáza bola použitá kolóna Eclipse XDB C18, 50 × 2,1 mm s veľkosťou častíc 1,8 μm. Mobilná fáza: 0 min: 10 % acetonitril + 90 % 0,2% HCOOH, 36 min: 100 % acetonitril. Prietoková rýchlosť 0,3 ml min⁻¹ pri 30 °C.

Na GC-MS analýzu bol použitý GC-MS system Finnigan GCQ Polaris ion trap, so silikagélou kolónou HP -5ms 30 m × 0,25 mm. Teplotný program pre štandardy TMS derivátov sacharidov: 100 °C – 1 min, potom gradient 10 °C min⁻¹ k dosiahnutiu 280 °C, zachovanie počas 2 min. Teplota injektora 270 °C, nástrekový objem 1 μl, nosný plyn hélium, lineárna rýchlosť 30 cm s⁻¹. MS parametre: teplota iónového zdroja 220 °C, ionizačná energia 70 eV, skenovaná oblasť 50–650 *m/z*. Úprava vzorky pre GC-MS analýzu sa uskutočnila podľa literatúry⁸.

MS spektrá boli merané metódami APCI a ESI v negatívnom móde prístroja Agilent 1100 LC/MSD Ion-Trap VL. Separácia za podmienok uvedených pre HPLC-DAD.

NMR spektrá boli zaznamenané prístrojom Varian Inova 600 MHz spektrometer v CD₃OD.

Nosiče pre stĺpcovú chromatografiu: silikagél (typ Silpearl, Kavalier, Votice, ČR), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) a polyamid S 6 (Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover, SRN). Nosiče pre TLC: silikagélové fólie Silufol UV₂₅₄ a celulózové fólie Lucefol (Kavalier, Votice, ČR), polyamidové fólie DC-Alufolien Polyamid 11 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, SRN). Skúmadlá na detekciu TLC (cit.⁹): Naturstoffreagenz A (Fluka, SRN) + polyetylén glykol 4000 (NEUovo skúmad-

lo) v metanole a anilínftalát (Sigma-Aldrich, USA). β -glykozidáza (Fluka, SRN).

Enzymová hydrolýza a kyslá hydrolýza sa uskutočnila podľa postupu v literatúre¹⁰.

Použité štandardy (kvercetin, rutin, kempferol-3-O-rutinozid, hyperozid, izokvercitrín, galaktóza a arabinóza) dodáva C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, SRN.

Extrakcia a izolácia látok

Listy *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. (pestovaného v skleníku Prírodovedeckej fakulte UK v Bratislave) boli zozbierané koncom septembra 2007. Metanolový extrakt získaný maceráciou 220 g suchých listov bol vysušený na rotačnej odparke pri teplote 40 °C. Získalo sa 120 g suchého extraktu.

19,31 g metanolového extraktu (100 %) sa rozpúšťalo v 400 ml vody a vzniknutá suspenzia sa vytrepala postupne petroleterom, chloroformom, etylacetátom a *n*-butanolom, pričom na záver ostal vodný podiel. Po odparení jednotlivých výtrepek sa získalo 5,85 g petroleterového podielu (30,29 %), 0,2 g chloroformového podielu (1,03 %), 1,7 g etylacetátového podielu (8,8 %), 3,2 g *n*-butanolového podielu (16,57 %) a 8,35 g vodného podielu (43,24 %).

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita extraktov bola stanovená dvoma spôsobmi: spektrofotometricky – pomocou vychytávania radikálov DPPH a pomocou EPR-sledovaním vychytávania hydroxylových radikálov¹¹. Výsledky sú priemerom štyroch meraní.

Výsledky a diskusia

Zistili sme, že všetky analyzované extrakty vychytávali DPPH radikály, pričom ich účinnosť bola v poradí: etylacetátový > *n*-butanolový > petroleterový > chloroformový > vodný. Etylacetátový podiel mal účinnosť väčšiu ako známe antioxidačné štandardy, kvercetin a *L*-askorbová kyselina (tab. I).

Pripravené extrakty vychytávali tiež hydroxylové radikály. V tab. II je prezentovaná účinnosť vychytávania hydroxylových radikálov roztokom 1 mg extraktu v 120 μ l

Tabuľka I

SC₅₀ hodnoty vychytávania DPPH radikálov extraktmi zo suchých listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc

Extrakt	SC ₅₀ [μ g odparku/ml]	r ²
Petroléter	8,48	0,936
Chloroform	21,05	0,977
<i>n</i> -Butanol	6,28	0,996
Etylacetát	2,11	0,998
Voda	55,34	0,977
Kyselina <i>L</i> -askorbová	2,21	0,998

vody. Z údajov je zrejmé, že antioxidačná účinnosť klesá v poradí: etylacetátový = chloroformový > *n*-butanolový > petroleterový > vodný extrakt.

Vychádzajúc z antioxidačnej aktivity podľa nameraných hodnôt SC₅₀ metódou DPPH a dostupného množstva podielov sa *n*-butanolový podiel delil na kolóne Sephadexu LH-20. Ako elučná sústava bol zvolený *i*-PrOH. Zachytávané frakcie mali objem približne 100 ml, celkovo sa zachytilo 87 frakcií. Na základe TLC analýzy a detekcie NEUovým skúmadlom boli jednotlivé frakcie spojené do 11 základných frakcií.

Rechromatografiou frakcie č. 3 na silikagéli použitím elučnej sústavy chloroform : metanol (9 : 1, so zvyšujúcim sa podielom polárnej zložky) bola získaná látka č. 1 (2,3 mg).

Frakcia č. 4 bola prečistená rovnakým spôsobom ako predchádzajúca frakcia a získala sa látka č. 2 (3 mg).

Frakcia č. 7 sa delila na stĺpci silikagelu za použitia zmesi chloroform : metanol : voda (8,5 : 1,5 : 0,1) ako elučnej sústavy. Frakcie sa zachytávali v objeme asi 70 ml, celkovo sa ich zachytilo 71. Na základe TLC analýzy boli jednotlivé frakcie spojené do 28 frakcií (I–XXVIII).

Z frakcie č. IV sa po odparení na rotačnej vákuovej odparovačke získala látka č. 3 (3,1 mg), z frakcie č. XIII vykryštalizovala látka č. 4 (8,3 mg) a z frakcie č. XV vykryštalizovaním z elučnej sústavy sa získala látka č. 5 (8,7 mg). Frakcia č. XXI po odparení poskytla látku č. 6 (6,7 mg). Frakcia č. XXIV sa delila na stĺpci polyamidu v sústave benzén : metanol : 2-butanón : *n*-butanol (300 :

Tabuľka II

Účinnosti vychytávania hydroxylových radikálov extraktmi z listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. (1 mg extraktu/120 μ l vody)

Extrakty ^a	Petroléter (nasýtený roztok)	Chloroform (nasýtený roztok)	<i>n</i> -Butanol	Etylacetát	Voda
Účinnosť vychytávania, %	66,5	100	58,8	100	57,6

^a Hodnota SC₅₀ pre *L*-askorbovú kyselinu (kontrola) je 0,01 mg ml⁻¹

100 : 75 : 1,5). Zachytávali sa frakcie s objemom asi 2 ml. Celkovo bolo zachytených 60 frakcií. Na základe TLC analýzy boli jednotlivé frakcie spojené a z nich sa získali látky č. 7 (4,1 mg) a 8 (1,4 mg). Množstvá izolovaných látok nezodpovedajú ich reálnemu zastúpeniu v rastline.

Látka č. 1 bola izolovaná vo forme žltého amorfneho prášku. UF spektrá získanej látky poukazovali na jej flavonolový skelet substituovaný v polohe C-3. Hmotnostné spektrum zaznamenané metódou ESI v negatívnom móde potvrdilo molekulový ión Mr 418 (417+1) s fragmentom 132 amu (pentóza) a aglykónom s Mr 286 (285+1). Kyslá hydrolyza uskutočnená na tenkej vrstve silikagélu s následným porovnaním so štandardom kempferolu potvrdila jeho prítomnosť v hydrolyzovanom izoláte. Sacharidová zložka bola na základe GC-MS identifikovaná ako arabinóza. Na základe uvedených výsledkov bola látka č. 1 identifikovaná ako kempferol-3-*O*-arabinozid.

Látka č. 2 bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá látky v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel poukazovali na flavonolový typ s *orto*-dihydroxy skupinou na kruhu B. Kyslou hydrolyzou uskutočnenou na TLC sa porovnaním so štandardom dokázal kvercetín ako aglykón. Porovnaním TLC po enzymatickej hydrolyze izolovanej látky bola vo vodnej fáze dokázaná prítomnosť glukózy. MS (negatívny mód) poukázalo na molekulový ión s Mr 464 (463+1), fragment 162 (hexóza-H₂O) a aglykón s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu izokvercitrínu (kvercetín-3-*O*-glukozid) TLC chromatografiou na silikagéli bola látka identifikovaná ako izokvercitrín.

Látka č. 3 bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetrínu⁷. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu kvercetrínu TLC chromatografiou na silikagéli bola látka identifikovaná ako kvercetín.

Látka č. 4 bola izolovaná vo forme žltých kryštálikov. MS zaznamenané metódou ESI v negatívnom móde poukázalo na molekulový ión Mr 434 (433+1) s fragmentom 132 amu (pentóza-H₂O) a aglykónom s Mr 302 (301+1). Na základe ¹H a ¹³C NMR spektier bola látka č. 4 identifikovaná ako kvercetín-3-*O*-α-L-arabinozid. NMR spektrá sú dostupné u autorov (T.L., M.Š.).

Látka č. 5 bola získaná vo forme ihlicovitých kryštálov. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 290 (289+1). Na základe ¹H a ¹³C NMR spektier bola látka č. 5 identifikovaná ako katechín s *cis* konfiguráciou na uhlíkoch C-2 resp. C-3 (epikatechín). Izolovaná látka bola opticky aktívna s hodnotou [α]_D²⁰ = + 65°. Na základe otáčavosti roviny polarizovaného svetla bol izolát identifikovaný ako (+)-epikatechín¹². NMR spektrá sú dostupné u autorov (T.L., M.Š.).

Látka č. 6 bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetrín-3-*O*-galaktozidu⁷. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 464 (463+1), fragment 162 (hexóza-H₂O) a aglykón s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu hyperozidu

Tabuľka III

SC₅₀ hodnoty vychytávania DPPH radikálov izolovanými látkami z listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc.^a

Izolovaná látka	SC ₅₀ [μg ml ⁻¹]	r ²
(+)-Epikatechín	2,97	0,958
Kvercetín	2,79	0,997
Kvercetín-3- <i>O</i> -arabinozid	5,08	0,957
Rutín	6,55	0,989
Hyperozid	38,67	0,968
Kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	neúčinný	

^a Antioxidačná aktivita izokvercitrínu a kempferol-3-*O*-arabinozidu nebola stanovená vzhľadom na ich malé množstvo

(kvercetín-3-*O*-galaktozid) bola látka identifikovaná ako hyperozid.

Látka č. 7 bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetrín-3-*O*-rutinozidu (rutínu)⁷. Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu rutínu TLC chromatografiou na silikagéli, polyamidových a celulóзовých fóliách bola látka identifikovaná ako rutín.

Látka č. 8 tvorila po odparení elučnej sústavy nažltlý povlak na stenách banky. Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu pomocou TLC chromatografie na silikagéli bola látka identifikovaná ako kempferol-3-*O*-rutinozid.

Záver

Na základe zistenej antioxidačnej aktivity a dostupnosti jednotlivých podielov získaných rozdeľovaním metanolového extraktu listov *Karwinskia humboldtiana* bolo z butanolového podielu izolovaných 7 flavonolových derivátov (kvercetín, jeho glykozidy a glykozidy kempferolu) a (+)-epikatechín. Izolované látky sa svojou antioxidačnou aktivitou podieľajú na celkovej antioxidačnej aktivite *n*-butanolového podielu (tab. III). Všetky získané látky boli z rastliny *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. izolované po prvý raz.

Autori ďakujú za poskytnutý rastlinný materiál prof. RNDr. A. Luxovi, CSc. z Katedry fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave.

Práca vznikla s podporou grantu agentúry VEGA MŠ SR. č. 1/0145/10 a 2/0081/11.

LITERATÚRA

1. Becerra-Verdin E. M., Bermúdez-Barba M. V., Salazar-Leal M. E., Ancer Rodríguez J., Romero-Díaz V., Soto-Domínguez A., Ballesteros-Elizondo R. G.,

- Saucedo-Cardenas O., Pineyro Lopez A., Sepúlveda-Saavedra J.: *Toxicon* 53, 645 (2009).
2. Jaramillo-Juarez F., Ortiz G.G., Rodriguez-Vazquez M.L., Falcon-Franco M.A., Feria-Velasco A.: *Gen. Pharmacol.* 26, 649 (1995).
3. Salazar M., Piñeyro A., Waksman N.: *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 19, 4985 (1996).
4. Gomez-Silva M., Garza-Ocanas L., Waksman N., Rivas V., Pineyro-López A.: *Toxicol. In Vitro* 19, 47 (2005).
5. Bovanová L., Brandšteterová E., Čaniová A., Argalášová K., Lux A.: *Pharmazie* 54, 941 (1999).
6. Bovanová L., Brandšteterová E., Čaniová A., Argalášová K., Lux A.: *J. Chromatogr., B* 732, 405 (1999).
7. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York 1970.
8. Füzfa Zs., Boldizsár I., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr., A* 1177, 183 (2008).
9. Merck: *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, str. 118. Merck, Darmstadt 1976.
10. Šeršeň F., Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Švajdlenka E.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 53, 253 (2006).
11. Šeršeň F., Mučaji P., Grančai D., Nagy M.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 52, 204 (2005).
12. Devon T. K., Scott A. I.: *Handbook of Naturally Occurring Compounds. Volume I. Acetogenins, Shikimates, and Carbohydrates*, str. 174. Academic Press, Inc., New York 1975.

P. Mučaji^a, M. Nagy^a, F. Šeršeň^b, E. Švajdlenka^c, J. Drozd^c, M. Štujber^d, and T. Liptaj^d (^a Department of Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, ^b Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava, ^c Institute of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, ^d Department of NMR and MS Spectroscopy, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava): **Phenolic Metabolites of *Karwinskia humboldtiana* Leaves**

Methanolic extract from leaves of *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. was subjected to fractionation with a pair of immiscible solvents and subsequently tested for antioxidant activity. Using DPPH the order of scavenging activities of the extracts in comparison with standards of L-ascorbic acid and quercetin was as follows: ethyl acetate fraction > L-ascorbic acid > quercetin > butan-1-ol > light petrol > chloroform > water. The capability of scavenging OH radicals determined by EPR was as follows: ethyl acetate, chloroform > light petrol > butan-1-ol > water fractions. On the basis of availability and antioxidant activity of these fractions, isolation of constituents from butanol fractions was achieved. Separation of this fraction led to the isolation of (+)-epicatechin and flavonol derivatives – quercetin, quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin), quercetin-3-*O*-galactoside (hyperosid), quercetin-3-*O*-arabinoside, quercetin 3-*O*-rutoside (rutin), kaempferol 3-*O*-arabinoside and kaempferol 3-*O*-rutoside. All of them might be responsible for the observed antioxidant effects.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ HUPERZINU A V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY NEMOCI

LUCIE DRTINOVÁ a MIROSLAV POHANKA

Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany
v Brně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
miroslav.pohanka@gmail.com

Došlo 24.11.11, přepracováno 16.7.12, přijato 14.9.12.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, acetylcholinový receptor, alzheimerova nemoc, huperzin A, *N*-methyl-D-aspartátový receptor, lykopodiové alkaloidy, ZT-1, selagin

Obsah

1. Úvod
2. Huperzin A v tradiční čínské medicíně
3. *Huperzia serrata* (vranec pilovitý) – zdroj sekundárních metabolitů
4. Přírodní původ huperzinu A
5. Působení huperzinu A na organismus
6. Příprava huperzinu A pro terapeutické použití
7. Huperzin A v klinických studiích

1. Úvod

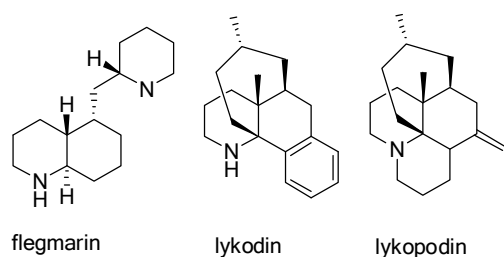
Alzheimerova nemoc (AD) je progresivní onemocnění postihující především starší část populace. Nicméně se jedná o jedno z celosvětově nejrozšířenějších neurodegenerativních onemocnění mozku. Odhaduje se, že v roce 2030 bude na 65,7 milionu lidí s nějakou formou demence, přičemž převažuje AD¹. Do patogeneze AD z hlediska molekulárního rozvoje patří zejména ztráta cholinergního přenosu a ubývání samotného neurotransmiteru acetylcholinu na neurosynapsích, vytváření neurotoxického beta-amyloidu a jeho ukládání ve formě amyloidního plaku². Na intracelulární úrovni dochází k rozvoji excitotoxicity spolu s hyperfosforylací tau-proteinu. Co však způsobuje výše zmíněné patologické změny, není známo. Zvažuje se řada rizikových faktorů, mezi něž patří zánětlivé procesy a genetická porucha na apolipoproteinu apo-ε4 podle Kim a spol.³. Oxidační stres a ztráta antioxidační homeostázy, hraje nejspíš v patogenezi AD svou úlohu, a proto jsou pro potenciální léčivo antioxidační vlastnosti jednoznačnou výhodou⁴. Jednoznačná etiologie nemoci je stále předmětem intenzivního výzkumu.

2. Huperzin A v tradiční čínské medicíně

Tradiční čínská medicína je celosvětově známý pojem a patří mezi tzv. alternativní způsoby léčení, v dnešní době se tato oblast stává stále častěji vyhledávanou oblastí medicíny, díky multifunkčnímu účinku rostlinných výtažků na organismus, a umocňuje tím návrat k přírodnímu způsobu léčení. Četná úskalí se objevují při jejich použití v praxi. Jsou to především legislativní problémy založené na samotném klinickém použití. Málo slibných účinných látek prošlo hlubším klinickým zkoušením, a proto nemohou být předepisovány v běžné lékařské praxi. Tyto látky a jejich kombinace jsou ve formě potravních doplňků v některých východoasijských zemích (např. v Číně) a ve Spojených státech amerických běžně dostupné bez jakýchkoliv omezení. Právě proto v uvedené oblasti léčiv probíhá intenzivní výzkum a u nových látek se zjišťují chemické vlastnosti, biologická a farmakologická aktivita přírodních látek pocházejících z rostlinné i živočišné říše. Mezi tyto látky patří právě i huperzin A, též označovaný selagin.

3. *Huperzia serrata* (vranec pilovitý) – zdroj sekundárních metabolitů

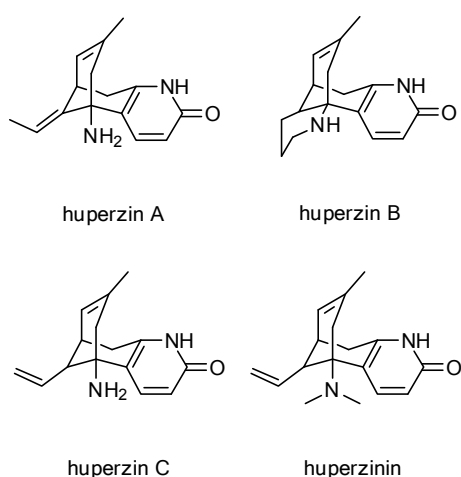
Českým názvem pro rostlinu *Huperzia serrata* (čínský Qian Ceng Ta, Jin Bu Huan) z čeledi *Huperziaceae* je vranec pilovitý. V čínské tradiční medicíně se používá stovky let a jsou zde s touto rostlinou bohaté zkušenosti. Alkaloid huperzin se nachází v rostlinách z řádu *Lycopodiophyta* (plavuně), třídy *Lycopodiopsida* (plavuňotvaré), čeledi *Huperziaceae*, *Lycopodiaceae* a dále pak v malých množstvích v rostlinách rodu *Selaginella*. Jedná se o skupinu plavuní charakterizovanou krátkými, vždyzelenými listy a kyjovitými strobilami (části rostlin podobné šišticím určené k nepohlanému rozmnožování). V čínské oblasti se sušené rostliny čeledi *Huperziaceae* podávají při teplotách, pohmožděninách, otocích, krevních ztrátách a schizofrenii⁵. Skupina *Lycopodia*, do které patří čeleď *Huperziaceae* (rod *Huperzia*, *Phlegmarius*), čeleď *Lycopodiaceae* a rod *Selaginella*, zahrnuje více jak 500 rostlinných druhů. Rostliny z těchto dvou čeledí a rodu *Selaginella* obsahují alkaloidy rostlin rodu *Lycopodium*, jejichž základní strukturní vzorec obsahuje 16 uhlíků a vychází z chinolizinu, pyridinu nebo α-pyridonu. Lykopodiové (rostliny rodu *Lycopodium*) alkaloidy se dělí na 4 hlavní skupiny, a to skupinu lykopodinovou, lykodinovou, fawcettiminovou a smíšenou⁶. Prvním objeveným alkaloidem těchto rostlin je lykopodin. Skupiny lykopodiových alkaloidů jsou patrné z obr. 1.



Obr. 1. Tři hlavní skupiny lykopodiových alkaloidů

4. Přírodní původ huperzinu A

Huperzin A (viz obr. 2) je tedy lykodinový alkaloid nacházející se v rostlinách čeledi *Huperziaceae*, *Lycopodiaceae* a rodu *Selaginella*. Největší zastoupení huperzinu A je ve vrancích *Huperzia serrata*, *H. herteriana* a *H. ovatifolia*, a právě tyto rostliny jsou sbírány pro izolaci účinné látky⁷. Huperzin se vyskytuje v mnoha modifikacích, a to jako huperzin A, huperzin B, C,D-W (cit.⁸). Obsahově převažující formou je huperzin A, méně zastoupeným je pak huperzin B. Obě látky mohou být v rostlině obsaženy současně s typicky převažujícím zastoupením huperzinu A. Zatímco huperzin B má sice širší terapeutický index než huperzin A, je méně selektivní a jeho afinita k AChE je mnohem nižší než pro huperzin A. Samotný huperzin A se vyskytuje ve dvou optických isomerech (–)-huperzin A a (+)-huperzin A. Terapeuticky aktivní, s téměř 7krát větší schopností inhibovat AChE, je enantiomer (–)-huperzin A, který se získává z rostlinného materiálu⁹. Organická synté-



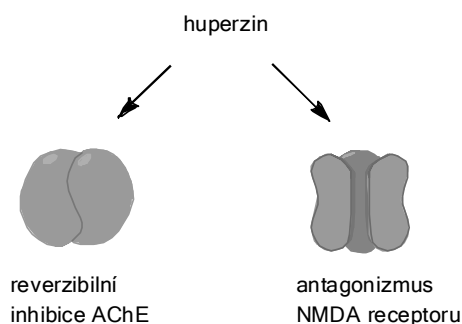
Obr. 2. Huperzin a jeho strukturní modifikace

za (–)-isomeru však není plně zvládnuta. Vzhledem k nižší ceně (jednoduchá organická syntéza) byl v mnohých studiích testován i racemát (±)-huperzin A.

5. Působení huperzinu A na organismus

Na místo účinku se huperzin A dostává pomalým prostupem přes hematoencefalickou bariéru a vykazuje vysokou specifitu k AChE. V těle působí jako stabilní, reverzibilní inhibitor AChE vázající se do periferního anionického místa. V organismu se AChE vyskytuje v několika formách. V mozku savců převládá tetramerní G4 (10S) forma AChE spolu s malým množstvím monomerní G1 (4S) formy AChE. Bylo zjištěno, že huperzin A selektivně inhibuje G4 formu AChE, zatímco ostatní používaná léčiva při léčbě Alzheimerovy choroby inhibují rovněž G1 formu AChE (cit.¹⁰). Inhibitory AChE zmírňují symptomatické projevy Alzheimerovy nemoci a zpomalují progresi onemocnění. V porovnání s ostatními inhibitory acetylcholinesteras (IACH) je huperzin A 2–8krát schopnější zvýšit hladinu acetylcholinu (neurotransmitter metabolizující se pomocí AChE) v cerebrálním kortexu a tento zmíněný efekt je navíc déletrvající, než bylo prokázáno pro současná léčiva AD působící jako IACH: rivastigmin a donepezil¹¹. Působení organismu na organismus je přehledně ukázáno v obr. 3.

Popsány jsou též antioxidační vlastnosti huperzinu A. Experimentálně bylo prokázáno zmírnění apoptických procesů indukované neurotoxickým beta-amyloidem¹². Bylo zjištěno, že mozková tkáň vystavená beta-amyloidu produkuje ve zvýšené míře reaktivní formy kyslíku, dochází v ní k poruše elektronového přenosu v mitochondriích a následné dysfunkci dýchacího řetězce a glukosového metabolismu s opětným negativním efektem na hladinu reaktivních forem kyslíku. Bylo prokázáno, že huperzin A podle dosavadních studií na buněčných liniích NG108-15 PC12 zmírňuje beta-amyloidem způsobenou toxicitu¹³. Mimo jiné byla u huperzinu popsána schopnost působit jako antagonist *N*-methyl-D-aspartátového receptoru, jehož zvýšené dráždění glutamátem při neurodegene-



Obr. 3. Receptory pro vazbu huperzinu A

rativních onemocněních, způsobuje excitotoxicitu a následnou buněčnou smrt¹⁴.

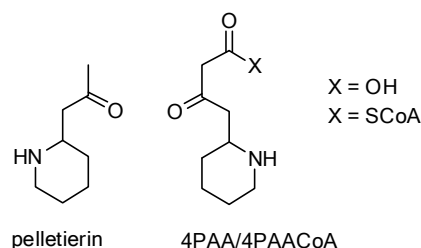
Huperzinu A se připisují i další příznivé účinky na organismus: ochrana před volnými radikály, regenerace a růst mozkových buněk po hypoxii nebo po mozkové ischemii¹⁵. Testy na laboratorních zvířatech rovněž poukazují na prokazatelné zvýšení hladiny nízkomolekulárních antioxidantů po aplikaci huperzinu A (cit.¹⁶). Díky své široké paletě příznivých účinků ovlivňující nervovou soustavu se huperzin A stává vhodným kandidátem pro léčbu AD, schizofrenie a také jako profylaktikum při otravách nervově paralytickými látkami^{17,18}. Poukazuje na to také fakt, že v Číně, odkud *H. serrata* pochází, je huperzin A léčivem první volby v léčbě AD (cit.¹⁹). Na druhou stranu je třeba prokázané terapeutické účinky hodnotit kriticky. V tomto směru bude rozhodující ukončení a vyhodnocení níže zmíněných probíhajících klinických studií.

6. Příprava huperzinu A pro terapeutické použití

Jak už bylo řečeno, přírodním zdrojem lykopodiových alkaloidů včetně huperzinu A, jsou výhradně z rostlin čeledi *Huperziaceae*, *Lycopodiaceae* a rod *Selaginella*. Jedná se o širokou skupinu rostlin vyskytující se téměř po celém světě. Samotná *Huperzia serrata* je rozšířena od Indie po jihovýchodní Asii. Získávání huperzinu A je náročný proces, jelikož rostliny *H. serrata* obsahují jen 0,007 % huperzinu A (cit.²⁰). Další nevýhodou je obtížné vytváření vhodných podmínek pro pěstování v kombinaci s velmi pomalým růstem a pozdní změnou v dospělosti.

Za běžných podmínek rostlina dospívá nejdříve po 12 až 15 letech, a následně žije kolem 20 let. Výtrusy této rostliny potřebují dlouhou dobu klidu. Po 6 letech z výtrusu vznikne prothallium, které roste jen tehdy, spojí-li se s vhodnou houbou a rozvine se endotrofní mykorrhiza²¹. Nejdříve po dvanáctém roce života rostliny se na jejích koncích vytvoří pohlavní orgány a tato rostlina se poprvé rozmnoží. Vyprodukuje gametofyty schopné založení další generace této obtížně pěstované rostliny. Nicméně rostlina se může rozmnožovat i vegetativně pomocí odpadlých pupenů listů, které samovolně ve vhodných podmínkách zakoření. Laboratorní pokusy o vegetativní množení jsou však velmi málo úspěšné a u většiny vědců není v tomto směru ani příliš optimistické očekávání. Kvůli zmíněným nezdarům v pěstování se problematikou kultivace zabývá mnoho biologů, mnozí odborníci věří, že daleko schůdnějším řešením bude cesta biosyntézy huperzinu A za pomoci aplikace izolovaných jednotlivých rostlinných enzymů z matečných rostlin a jejich následná exprese na buněčných liniích.

Ve vrancích byl objeven pouze jeden enzym podílející se nejspíš na biosyntéze huperzinu A, a to lysindekarboxylasa²². Prvním krokem k biologické tvorbě huperzinu A je samotná dekarboxylace lysinu tímto enzymem za vzniku kadaverinu. V rostlinné buňce následuje sled reakcí, kde dochází k připojení malonyl-CoA na Δ^1 -piperidein a dvěma souběžným dekarboxylacím vedoucím přes sloučeniny

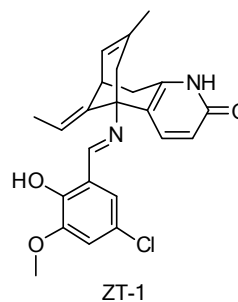


Obr. 4. Nejdůležitější prekurzory pro syntézu huperzinu A

v odborné literatuře označované jako 4PAA/4PAACoA k důležitému meziproductu pelletierinu (obr. 4), který je považován za prekurzor v anabolismu lykopodiových alkaloidů včetně huperzinu A (cit.²³). Z těchto dvou prekurzorů několika oxidacemi, uzavíráním a otevíráním cyklu vznikají chtěné alkaloidy, mimo jiné flegmarin, lykodan, lykodin, huperzin B, huperzin A a huperzinin, který sled reakcí uzavírá.

7. Huperzin A v klinických studiích

V Číně proběhla dvojité zaslepená klinická studie, která prokázala, že huperzin A je účinná a bezpečná látka pro dlouhodobou léčbu AD (cit.²⁴). Dle studie byly účinky zaznamenány při dávkování $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Sloučenina byla podávána jednou až dvakrát denně. Po podání trval prokázaný cholinergní efekt po dobu nejméně 6 hodin (cit.²⁵). Na čínském trhu existuje huperzin A pod obchodní značkou Focus Fast, který obsahuje mimo již zmíněný huperzin A i dalších 38 podpůrných složek. Z tohoto důvodu bude pro další perspektivu důležité vyhodnocení probíhající evropské studie, v rámci které je aplikována jediná účinná látka a lze tedy biologický efekt jednoznačně přisoudit konkrétní látce. Jedná se o klinickou studii s látkou ZT-1 (proléčivo – Schiffova báze huperzinu A; viz obr. 5). Dle preklinického zkoumání lze říci, že sloučenina ZT-1 má stejnou, ne-li vyšší biologickou dostupnost v jednotlivých



Obr. 5. Právě zkoušený prekurzor ZT-1

mechanismech působení jako samotný huperzin A (cit.²⁶). Aktuálně je již uzavřená a vyhodnocená preklinická fáze testování založená na podávání látky ZT-1 opicím, u nichž byl vytvořen deficit acetylcholinu pomocí skopolaminu²⁷. V současnosti probíhá klinická fáze zkoušení perorální cestou s pacienty s lehkou a středně těžkou AD a s nadějnými předběžnými výsledky²⁸. Dále pak první fáze klinického zkoušení látky ZT-1 podávanou ve formě subkutánního implantátu²⁹. Význam huperzinu A jako léčiva AD se pravděpodobně do budoucna zvýší i díky faktu, že některé modelové experimenty poukázaly na zmírnění ukládání amyloidních plaků po aplikaci huperzinu A (cit.³⁰). Zmíněný efekt je způsoben sterickým obsazením periferního anionického místa AChE, které pravděpodobně hraje jistou roli v progresi AD cestou zrychlení ukládání amyloidních plaků³¹.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za projekt P303/11/1907.

LITERATURA

- Weiner M. W., Aisen P. S., Jack C. R. Jr, Jagust W. J., Trojanowski J. Q., Shaw L., Saykin A. J., Morris J. C., Cairns N., Beckett L. A., Toga A., Green R., Walter S., Soares H., Snyder P., Siemers E., Potter W., Cole P. E., Schmidt M.: *Alzheimers Dement.* 6, 202 (2010).
- Wollen K. A.: *Altern. Med. Rev.* 15, 223 (2010).
- Kim J., Basak J. M., Holtzman D. M.: *Neuron* 63, 287 (2009).
- Guglielmotto M., Giliberto L., Tamagno E., Tabaton M.: *Front. Aging Neurosci.* 2, 1 (2010).
- Ma X., Tan C., Zhu D., Gang D. R.: *J. Ethnopharmacol.* 8, 54 (2006).
- Ayer W. A., Trifonov L. S.: *Lycopodium Alkaloids*. Academic Press, San Diego 1994.
- Bai D. L.: *Pure Appl. Chem.* 79, 469 (2007).
- Tan Ch., Ma X., Chen G., Zhu D.: *Can. J. Chem.* 81, 315 (2003).
- Tang X. C., Kindel G. H., Kozikowski A. P., Hanin I.: *J. Ethnopharmacol.* 44, 147 (1994).
- Bon S., Vigny M., Massoulie J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2540 (1979).
- Wang R., Tang X. C.: *Neurosignals* 14, 71 (2005).
- Zhang H. Y., Yan H., Tang X. C.: *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 173 (2008).
- Zhang H. Y., Liang Y. Q., Tang X. C., He X. C. Bai D. L.: *Neurosci. Lett.* 317, 143 (2002).
- Xiao X. Q., Zhang H. Y., Tang X. C.: *J. Neurosci. Res.* 67, 30 (2002).
- Zhang H. Y., Zheng C. Y., Yan H.: *Chem. Biol. Interact.* 175, 396 (2008).
- Pohanka M., Hrabínova M., Zemek F., Drtinová L., Bandouchova H., Pikula J.: *Neuroendocrinol. Lett.* 32, 101 (2011).
- Bajgar J., Fusek J., Kassa J.: *Curr. Med. Chem.* 16, 2977 (2009).
- Ha G. T., Wong R. K., Zhang Y.: *Chem. Biodiversity* 8, 1189 (2011).
- Wu T. Y., Chen C. P., Jinn T. R.: *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 50, 131 (2011).
- Ma X., Gang D. R.: *J. Ethnopharmacol.* 113, 15 (2007).
- Freeberg J. A., Wetmore R. H.: *Phytomorphology* 7, 204 (1957).
- Ma X., Gang D. R.: *Nat. Prod. Rep.* 21, 752 (2004).
- Heathcock C. H., Kleinman E. F., Binkley E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 1054 (1982).
- Zhang R. W., Tang X. C., Han Y. Y., Sang G. W., Zhang Y. D., Ma X. Y.: *Acta Pharmacol. Sin.* 12, 250 (1991).
- Xu S. S., Cai Z. Y., Qu Z. W., Yang R. M., Cai Y. L., Wang Q. G.: *Acta Pharmacol. Sin.* 16, 391 (1995).
- Li Y. L., Gross M. L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 65 (2004).
- Zhu D. Y., Tan C. H., Li Y. M.: *Medical Chemistry of Bioactive Natural Products*. Wiley-Interscience, Hoboken 2006.
- Singh H. B., Singh M. K.: *Neurobiol.* 1, 27 (2010).
- Orgogozo J. M., Tamech E., Wilkinson D., Yancheva S. T., Gagliano C., Groscurin P., Porcher H., Scalfaro P.: *Neurobiol. Aging* 27, S16 (2006).
- Pohanka M.: *Biomed. Pap.* 155, 219 (2011).
- Gao X., Zheng C. Y., Yang L., Tang X. C., Zhang H. Y.: *Free Radical Biol. Med.* 46, 1454 (2009).

L. Drtinová and M. Pohanka (*Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Hradec Králové*): **Potentials of Huperzine A Use in Alzheimer Disease Treatment**

Huperzine A, a mixture of compounds suitable for pharmaceutical purposes, has been used as an active substance in traditional Chinese medicine. The compounds mainly rank among lycopodin alkaloids from the plant *Huperzia serrata* and other plants from the families *Huperziaceae* and *Lycopodiaceae* and the *Selaginella* genus. In these families huperzine A prevails. The compounds are suitable for treatment of the Alzheimer disease (AD) by inhibition of acetylcholinesterase and antagonizing NMDA *N*-methyl-D-aspartate receptors. Currently clinical tests of huperzine A in the AD treatment are performed. The aim of the present review is to summarize basic facts about huperzine A compounds and discuss their suitability for the therapy.

XANTHOTHUMOL: MOŽNOSTI IZOLACE A OBOHACOVÁNÍ PIVA

LUKÁŠ JELÍNEK, MARCEL KARABÍN,
TOMÁŠ KINČL, TEREZA HUDCOVÁ, BLANKA
KOTLÍKOVÁ a PAVEL DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28
Praha 6

Lukas.Jelinek@vscht.cz

Došlo 18.4.12, přijato 18.6.12.

Klíčová slova: chmel; prenylované flavonoidy;
xanthohumol; pivo

Obsah

1. Úvod
2. Xanthohumol – charakteristika
3. Izolace xanthohumolu
4. Zvyšování obsahu xanthohumolu v pivu
5. Závěr

1. Úvod

Xanthohumol (X) je biologicky aktivní látka vyskytující se téměř výhradně ve chmelu, odkud částečně přechází i do piva. Z fyzikálně-chemického hlediska může být považován za přechodné stádium mezi chmelovými pryskyřicemi a polyfenoly¹. V posledních deseti letech se X dostává do popředí zájmu mnoha vědců díky svým antioxidačním^{2,3}, antiinfekčním⁴ a především antikancerogenním^{5–7} účinkům. Ty se však začínají projevovat až při dávce 0,32 mg X /kg hmotnosti člověka⁸, která je konzumací piva, kde se obsah X většinou pohybuje pod hranicí 0,1 mg l⁻¹ (cit. ^{9,10}), téměř nedosažitelná. V uplynulých deseti letech byla tedy pozornost mnoha odborníků soustředěna nejen na studium těchto zajímavých biologických aktivit, ale také na vývoj nových postupů pro izolaci xanthohumolu z chmelových hlávek a jeho následnou purifikaci.

Z tohoto hlediska je nyní stále větší pozornost věnována vedlejším produktům, které vznikají při výrobě chmelových pelet a extraktů. Tyto produkty obecně obsahují velké množství prenylovaných flavonoidů a doposud nenalezly žádné širší technologické využití.

Během výroby piva dochází ke značným ztrátám xanthohumolu zejména při výrobě mladiny, kvašení a stabilizaci pomocí polyamidových sorbentů. Mnoho odborných prací se tedy v současnosti zabývá otázkou, jak těmto ztrátám zamezit, případně jak obsah této látky v pivu zvý-

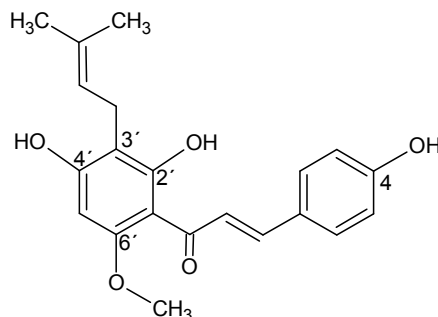
šit. Sledováním celého výrobního procesu byly největší ztráty zaznamenány během chmelovaru⁹. Při pokusech obohacovat pivo o tuto látku se vyskytla celá řada problémů plynoucích především z molekulární struktury X. Jedná se zejména o velmi nízkou rozpustnost ve vodě, která se při 8 °C pohybuje kolem 1,1 mg l⁻¹ (cit. ¹¹) a termolabilitu¹². Postupem času bylo navrženo mnoho metod a postupů, s jejichž pomocí lze zmíněné nedostatky buď částečně eliminovat či obejít. Univerzální řešení však dodnes neexistuje a ztráty musí být kompenzovány přidávkou X, což v mnoha zemích naráží na problémy s legislativou.

Cílem této práce je popsat fyzikálně-chemické vlastnosti xanthohumolu, které úzce souvisí s pivovarskou technologií a představit současné trendy v izolaci a obohacování piva touto látkou.

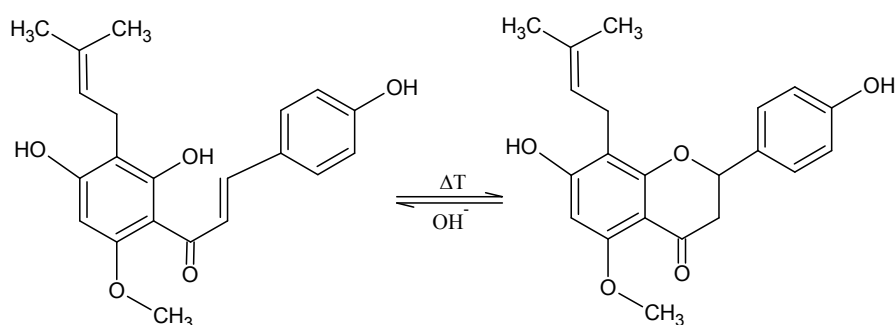
2. Xanthohumol – charakteristika

Xanthohumol (3'-[3,3-dimethylallyl]-2'4'-trihydroxy-6'-methoxychalkon, viz obr. 1) je žlutooranžová krystalická látka, mající molární hmotnost 354,4 g mol⁻¹. Jeho absorpční maximum bylo zaznamenáno v UV oblasti při vlnové délce 368 nm (měřeno v methanolem roztoku). Z chemického hlediska jde o chalkonový skelet, mající na uhlících 2', 4' a 4 hydroxyskupinu a na uhlíku 6' methoxyskupinu. Tyto substituenty obecně přispívají ke zlepšení rozpustnosti látek v polárních rozpouštědlech. Zcela opačný účinek má isoprenylová skupina na uhlíku 3', která je hlavní příčinou nízké rozpustnosti X ve vodě a pivu.

Jako většina prenylovaných chalkonů je i X, prostřednictvím své hydroxyskupiny na uhlíku 2', schopen isomerace na příslušnou flavanovou formu, tzv. isoxanthohumol (IX) (viz obr. 2). Tato nepatrná strukturní změna zapříčiňuje ztrátu velkého množství pozitivních zdravotních účinků X^{2,13,14}. Rozsah isomerační reakce se zvyšuje se vzrůstající teplotou a hodnotou pH. Vzniklý isoxanthohumol je



Obr. 1. Struktura xanthohumolu



Obr. 2. Isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol

Tabulka I

Rozpuštěnost xanthohumolu a isoxanthohumolu při teplotách 8 a 23 °C v různých médiích

Médium	Teplota [°C]	Xanthohumol [mg l ⁻¹]	Isoxanthohumol [mg l ⁻¹]
Voda	23	1,3	5,0
	8	1,1	3,9
Ethanol 5 % obj.	23	3,5	5,5
	8	1,8	4,4
Pivo	23	5,3	27,2
	8	4,0	23,8
Mladina 8,5 °	23	8,7	39,6
	8	7,0	37,6
Mladina 13 °	23	9,5	43,3
	8	8,9	37,3

bílá až světle žlutá krystalická látka s absorpčním maximum zaznamenaným při vlnové délce 287 nm (měřeno v methanolemém roztoku), která dosahuje několikanásobně vyšší rozpustnosti ve vodě a pivu než X, jak je patrné z tabulky I (cit.¹⁰).

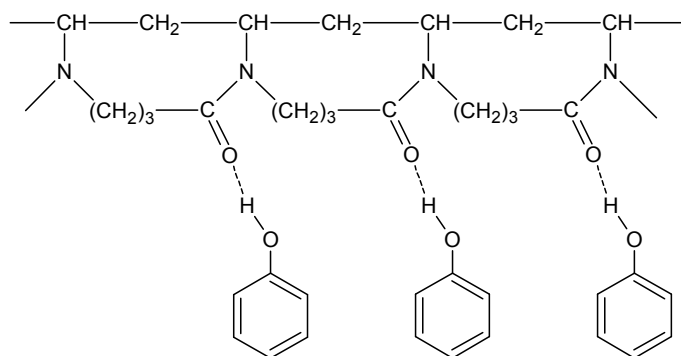
3. Izolace xanthohumolu

Xanthohumol je majoritním prenylflavonoidem chmelových hlávek, kde se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,2–1,1 hm.% v sušině¹⁵. Jelikož je X svou molekulovou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi vysoce podobný chmelovým pryskyřicím, je zřejmé, že i izolační metody pro tyto dvě skupiny látek budou víceméně analogické. Pro izolaci v laboratorním měřítku lze s úspěchem využít například standardní metodu ASBC pro α - a β -hořké kyseliny¹⁶, kdy jsou chmelové hlávky extrahovány směsí diethyletheru a methanolu (v poměru 5:1). Hořké látky je následně možné z extraktu separovat odpařením diethyletheru a vytřepáním zbytku do hexanu. Dalším hojně využívaným extrakčním činidlem je směs methanolu

a kyseliny mravenčí v poměru 99:1 (cit.^{17,18}), která se kromě xanthohumolu používá i k extrakci ostatních chmelových polyfenolů.

V průmyslu je nejčastějším extrakčním činidlem 90% ethanol. Z výsledného extraktu je nejprve odpařeno rozpouštědlo a zbytek je rozdělen centrifugací na tříslovinou (polyfenolovou) složku obsahující zejména ve vodě rozpustné sole, cukry, bílkoviny a polyfenoly a pryskyřičnou složku sestávající převážně z prenylovaných flavonoidů, pryskyřic a ostatních ve vodě nerozpustných látek. Jelikož je ethanol rozpouštědlo s nízkou selektivitou, obsahuje výsledný extrakt řadu nečistot, má tmavě zelenou barvu, lepka-vou konzistenci a je nutné jeho další přečištění¹⁹.

Jinou možnost průmyslové izolace X představuje využití chmelového zbytku po extrakci oxidem uhličitým. Ten se na chmelový materiál aplikuje buď v kapalném stavu při tlaku 60–65 bar a teplotě 10–15 °C, nebo v superkritickém stavu při tlaku 250–320 bar a teplotě 50–80 °C (cit.²⁰). Obě tyto formy oxidu uhličitého působí jako vysoce nepolární rozpouštědla, s jejichž pomocí jsou z chmelu odstraňovány v první řadě α - a β -hořké kyseliny a silice. Xanthohumol společně s ostatními polyfenoly zůstává ve



Obr. 3. Vazba fenolových sloučenin na PVPP prostřednictvím vodíkových můstků

chmelovém zbytku, odkud může být extrahován např. ethanolom pomocí výše zmíněného postupu²¹. Při extrémních podmínkách (600–1000 bar a 60–90 °C) může být i oxid uhličitý použit k extrakci prenylovaných flavonoidů. Výsledným produktem je v tomto případě tmavě zelený prášek s obsahem xanthohumolu 10–30 hm.% a isoxanthohumolu 1–3 hm.%. Zbytek je tvořen převážně tvrdými pryskyřicemi²².

Poslední dobou se stále častěji objevují postupy, využívající k izolaci fenolových látek pevné sorbenty. Polyvinylpyrrolidon (PVPP) je polymerní látka, která je schopna selektivně vázat polyfenoly z roztoku prostřednictvím vodíkových můstků²³ (obr. 3). Jedním z možných postupů je extrakce chmelových hlávek 90% ethanolom a následná aplikace PVPP do tohoto extraktu. Xanthohumol je poté desorbován pomocí 70% acetonu²⁴. Další možné využití PVPP při izolaci X představil v roce 2007 Biendl¹⁹. Celý postup vychází z již zmíněného ethanolového extraktu. Ten je v prvním kroku reextrahován superkritickým oxidem uhličitým, čímž je zbaven α - a β -hořkých kyselin. Po odpaření ethanolu pak vzniká tzv. XANTHO-EXTRACT, ve kterém jsou zakoncertovány převážně nespecifické tvrdé pryskyřice a prenylované flavonoidy. Ty

jsou z tohoto extraktu izolovány pomocí PVPP a následně desorbovány ethylacetátem. Po odpaření rozpouštědla je získán žlutý prášek – tzv. XANTHO-FLAV, který obsahuje kolem 80 % X. Tento extrakt může být dále překrystalizován za vzniku tzv. XANTHO-PURE extraktu ve kterém je garantovaný obsah X vyšší než 95 %. Složení jednotlivých extraktů je znázorněno v tabulce II.

4. Zvyšování obsahu xanthohumolu v pivu

Xanthohumol se při použití klasického výrobního procesu dostává do piva výhradně z chmele během chmelovaru. Tento proces trvá zhruba 90 min a chmel je obvykle dodáván ve třech dávkách. V časech 0 a 30 min je dávkován chmel či chmelový preparát, který má pivu dodat potřebnou hořkost a 10 min před koncem chmelovaru jsou přidávány aromatické chmelové odrůdy vnášející do piva charakteristické aroma. Jak již bylo zmíněno, xanthohumol podléhá za zvýšené teploty isomerační reakci, díky které dochází k nejvyšším ztrátám této látky během celého procesu výroby. Kinčl ve své práci demonstroval, že tato reakce začíná probíhat již při teplotách převyšujících 60 °C

Tabulka II

Složení extraktů XANTHO-EXTRACT, XANTHO-FLAV a XANTHO-PURE (% hm.)

Složka	XANTHO-EXTRACT	XANTHO-FLAV	XANTHO-PURE
Silice	–	–	–
Celkové pryskyřice	cca 85	–	–
Alfa kyseliny	1	–	–
Iso-alfa kyseliny	5	–	–
Beta kyseliny	< 0,5	–	–
Prenylflavonoidy	cca 12	> 90	> 98
Xanthohumol	10	80	95
8-Prenylnaringenin	0,06	0,2	< 0,02

(cit.²⁵). Wunderlich a spol. zkoumali chování xanthohumolu a isoxanthohumolu během chmelovaru podrobněji a zjistili, že při teplotě 80 °C se v prvních 5 minutách obsah X i IX nejprve lineárně zvyšuje a po 10. minutě se již výrazně nemění. Při aplikaci teploty 100 °C byl pozorován od 10. minuty chmelovaru dramatický úbytek X a rovněž odpovídající nárůst IX (cit.²⁶). Zbylý xanthohumol, který nepodlehł isomerační reakci a zároveň nebyl rozpuštěn v horké mladině, většinou ulpívá na povrchu chmelového mláta a společně s ním je odstraněn ve vířivé kádi¹¹.

Zmírnění ztrát obsahu X během chmelovaru je tedy zásadním krokem k obohacení piva touto látkou. Významnou roli v řešení zmíněné problematiky hraje bezesporu výběr vhodných surovin. Bylo zjištěno, že většina chmelových odrůd s vysokým podílem pryskyřic v hlávkách obsahuje rovněž vyšší množství xanthohumolu²⁷. Jejich využití jakožto zdroje xanthohumolu je však omezené, a to zejména díky přebytku hořkosti vnášené těmito chmely do piva. Výběr vhodné odrůdy je tedy podmíněn nejen absolutním množstvím X, ale také obsahem α -hořkých kyselin. Lze tedy konstatovat, že odrůdy vnášející do piva nejvíce X, při minimálním ovlivnění plánovaného obsahu hořkosti, jsou jemné-aromatické či aromatické²⁸, u nichž se obsah α -hořkých kyselin (α -HK) pohybuje nejčastěji v rozmezí 3,5–6,5 hm.% v sušině a poměr X : α -HK kolem hodnoty 0,1.

Jako výhodné se ukázalo využití zbytků chmelových granulí po extrakci oxidem uhličitým, kde poměr X : α -HK často převyšuje hodnotu 1. Z českých chmelů zmíněným kritériím nejlépe vyhovují odrůdy Žatecký poloraný červenák a Sládek.

Pro lepší přestup X do mladiny lze tuto látku aplikovat zachycenou na inertním nosiči s velkým povrchem, jakým je např. křemelina²⁶.

Výrazného zamezení ztrát během chmelovaru bylo docíleno použitím tzv. XAN technologie, jejímž základem je výroba vysoce koncentrované mladiny a dávkováním chmelových preparátů se zvýšeným obsahem X zhruba 5 min před koncem chmelovaru. Horká mladina je pak rychle zchlazena na 80 °C přidávkou studené varní vody. XAN technologie byla v praxi využita například bavorským pivovarem Weihenstephan, který v roce 2004 představil pšeničné pivo XAN Hefeweissbier s obsahem xanthohumolu 1,4 mg l⁻¹ a nealkoholický sladový nápoj XAN Wellness s obsahem xanthohumolu 4 mg l⁻¹.

Zajímavý objev byl učiněn při pokusech obohacovat xanthohumolem piva tmavá. Bylo zjištěno, že X interaguje s molekulami barevných látek tmavých sladů (pravděpodobně melanoidiny) za vzniku komplexů, které jsou mnohem lépe rozpustné ve vodě než samotný xanthohumol a zároveň působí jako ochrana před isomercí a stabilizací pevnými sorbenty (PVPP)¹². Podle Wunderlicha a Backa hrají při tomto procesu roli především barevné látky s vysokou molekulovou hmotností, a to konkrétně v rozmezí 300–600 kDa (cit.²⁹). Lze tedy konstatovat, že tmavá piva mohou být obohacována xanthohumolem mnohem snadněji a zároveň v nich lze dosáhnout i mnohem vyšších koncentrací této látky v porovnání s pivy světlými.

Krom chmelovaru dochází k výrazným ztrátám xanthohumolu i v některých fázích studeného úseku výroby piva. Jedná se konkrétně o proces kvašení a dokvašování a o stabilizaci. Během kvašení se xanthohumol podobně jako hořké látky sorbuje na povrch kvasničných buněk. Takto mohou jeho ztráty klesnout až na 20 % množství původně přítomného v mladině¹¹. Jako účinná eliminace těchto ztrát se ukázalo použití kvasinek uchovávaných ve vodném roztoku xanthohumolu či kvasinek s povrchem částečně zaneseným hořkými látkami. Tohoto jevu využil Forster a spol.³⁰, kteří v roce 2003 ve své práci představili velmi elegantní metodu přípravy nefiltrovaných piv bohatých na xanthohumol. Nápoje byly v tomto případě obohaceny přidávkou suspenze mladiny a kvasinek, které měly na své buněčné stěně nasorbované velké množství X. Tímto způsobem bylo možné obohatit různé druhy piv (světlá, tmavá a pšeničná), přičemž koncentrace X se vždy pohybovala kolem 2,5 mg l⁻¹.

Přímá fortifikace piva xanthohumolem je možná po skončení hlavního kvašení či dokvašení (v závislosti na národní legislativě), kdy je tato látka vnášena do piva formou ethanolového roztoku či uchycena na křemelině. Takto připravené pivo je možné filtrovat klasickou křemelínovou filtrací, avšak následná stabilizace pomocí sorbentů odstraňujících z piva polyfenoly se z pochopitelných důvodů zásadně nedoporučuje.

5. Závěr

Xanthohumol je prenylovaný flavonoid chmele s prokazatelně pozitivními účinky na lidské zdraví. Postupem času byla vypracována celá řada metod, díky kterým lze tuto látku extrahovat z chmelových hlávek. V současné době je využívána převážně ethanolová extrakce X ze zbytků chmelového materiálu po odstranění pryskyřic oxidem uhličitým. Výsledný extrakt obsahuje velké množství prenylovaných flavonoidů a je možné jej dále purifikovat, zejména pomocí pevných sorbentů selektivních pro fenolové látky.

Obohacování piva xanthohumolem naráží hned na několik úskalí, díky kterým je velké množství X během výrobního procesu nenávratně ztraceno. V první řadě se jedná o nízkou rozpustnost této látky, dále pak o její termolabilitu a v neposlední řadě fakt, že často ulpívá na povrchu kvasničných buněk. Pro snížení či zamezení těchto ztrát bylo navrženo několik modifikací technologického postupu, které byly v tomto článku představeny. Pro výrobu piva se zvýšeným obsahem X je nutné využití chmele či chmelových preparátů s co nejvyšším poměrem X : α -HK. Jednou z možností je využití zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým, který je aplikován 5 min před koncem chmelovaru. Ztráty během hlavního kvašení a dokvašení mohou být částečně eliminovány nasazením kvasinek s částečně zaneseným povrchem buď samotným xanthohumolem, či hořkými látkami. Fortifikaci je doporučováno provádět ve studeném úseku výroby, většinou po skončení hlavního kvašení či dokvašení. Takto připravené pivo však nesmí být filtrováno.

Tato práce vznikla za finanční podpory MZe ČR (QI111B053).

LITERATURA

1. Hofta P., Dostálek P., Basařová G.: Chem. Listy 98, 825 (2004).
2. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R.: J. Agric. Food Chem. 48, 3876 (2000).
3. Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahliková L.: Chem. Listy 106, 113 (2012).
4. Gerhauser C.: Mol. Nutr. Food Res. 49, 827 (2005).
5. Gerhauser C., Alt A. P., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauf J., Neumann I., Scherf H. R., Frank N., Bartsch H., Becker H.: Mol. Cancer Ther. 1, 959 (2002).
6. Dorn Ch., Weiss T. S., Heilmann J., Hellerbrand C.: Int. J. Oncol. 36, 435 (2010).
7. Gerhauser C., Alt A. P., Klimo K., Knauf J., Frank N., Becker H.: Phytochem. Rev. 1, 369 (2003).
8. Miranda C. L., Yang Y.-H., Henderson M. C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L., Buhler D. R.: Drug Metab. Dispos. 28, 1297 (2000).
9. Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: J. Chromatogr., A 832, 97 (1999).
10. Krofta K.: Kvasný Prům. 56, 2 (2010).
11. Stevens J. F., Taylor A. W., Clawson J. E., Deinzer M. L.: J. Agric. Food Chem. 47, 2421 (1999).
12. Magalhaes P. J., Dostálek P., Cruz J. M., Guido L. F., Barros A. A.: J. Inst. Brew. 114, 246 (2008).
13. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barners D. W.: Food Chem. Toxicol. 37, 271 (1999).
14. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R.: Phyto-medicine 13, 119 (2006).
15. Stevens J. F., Taylor A. W., Nickerson G. B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M. L.: Phytochemistry 53, 759 (2000).
16. The American Society of Brewing Chemists: ASBC Methods of Analysis, Hops 14, α -acids and β -acids in hops and hop extracts by HPLC (ASBC 2009).
17. De Keukeleire J., Janssens I., Heyerick A., Ghekiere G., Cambie J., Roldán-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D.: J. Agric. Food Chem. 55, 61 (2007).
18. Magalhaes P. J., Guido L. F., Cruz J. M., Barros A. A.: J. Chromatogr., A 1150, 295 (2007).
19. Biendl M.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 110 (2007).
20. Fergus G. P., Stewart G. G.: *Handbook of Brewing*, 2. vyd. CRC Press Taylor & Francis Group, New York 2006.
21. Brunner G.: J. Food. Eng. 67, 21 (2005).
22. http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/10585/xanthohumul-enriched-hop_extracts.pdf (staženo 6. 2. 2012).
23. Magalhaes P. J., Vieira J. S., Goncalves L. M., Pacheco J. G., Guido L. F., Barros A. A.: J. Chromatogr., A 1217, 3258 (2010).
24. Hudcová T.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2011.
25. Kinčl T.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2011.
26. Wunderlich S., Zürcher A., Back W.: Mol. Nutr. Food Res. 49, 874 (2005).
27. Krofta K., Poustka J., Nováková K., Hajšlová J.: Acta Hort. 668, 201 (2004).
28. Krofta K., Poustka J., Hajšlová J.: *International Hop Growers Convention: 50th Congress, Lanzhou 25.-30. July 2005*, Book of Abstract (Pavlovič M., ed.), str. 24.
29. Wunderlich S., Back W.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 111 (2007).
30. Forster A., Ketterer M., Gahr A.: Hopfenrudschau International. 2003/2004, 65.

L. Jelínek, M. Karabín, T. Kinčl, T. Hudcová, B. Kotlíková, and P. Dostálek (Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Xanthohumul: Possible Isolation and Beer Enrichment**

Xanthohumul is the main prenylated flavonoid from hop plants with proven positive effects on human health. Currently, the only source of this substance in human diet is beer, where the content of xanthohumul rarely exceeds 0.1 mg l^{-1} . The present article gives a comprehensive overview of current trends in the isolation of xanthohumul from hop cones and of production of beer with an increased content of this substance.

LUTEIN – VÝZNAMNÝ KAROTENOID VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA

MIROSLAV ŠIVEL^a, BOŘIVOJ KLEJDUS^b,
STANISLAV KRÁČMAR^a a VLASTIMIL
KUBÁŇ^c

^a Ústav analýzy a chemie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, ^b Ústav chemie a biochemie, Fakulta agronomická, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^c Ústav technologie a mikrobiologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Mirek.Sivel@seznam.cz

Došlo 20.2.12, přepracováno 8.10.12, přijato 10.10.12.

Klíčová slova: lutein, karotenoidy, aksamitník vzpřímený, doplňky stravy, výživa člověka

Obsah

1. Úvod
2. Přehled karotenoidů
 - 2.1. Karoteny
 - 2.2. Xanthofyly
 - 2.3. Apokarotenoidy
 - 2.4. Výskyt karotenoidů
 - 2.5. Použití karotenoidů
 - 2.6. Antioxidační aktivita karotenoidů
 - 2.7. Význam karotenoidů ve výživě člověka
3. Lutein
 - 3.1. Chemická struktura, syntéza a formy luteinu
 - 3.2. Přírodní zdroje luteinu
 - 3.3. Komerční zdroje luteinu
 - 3.4. Lutein ve výživě člověka
4. Závěr

1. Úvod

Příroda kolem nás nabízí velmi širokou paletu oslňujících barev. Od listů, květů a plodů jako barev rostlin až k ptákům a rybám, všude tam, kde se jen podíváme. Jsme doslova ohromeni sytými a pronikavými barvami přírody. Tyto barvy získané historickým vývojem flóry a fauny z každodenní zkušenosti přírody jsou rovněž významné i pro člověka. Výzkumy z posledních let ukazují, že v přírodních barvách spočívají nám doposud nepoznané a skryté možnosti jejich využití pro lidské zdraví.

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Struktura každého

karotenoidu určuje jeho barvu i fotochemické vlastnosti jeho molekuly. Z této struktury dále vyplývá i chemická reaktivita karotenoidů vzhledem k oxidačním agens nebo volným radikálům, která v organismu živočichů konzumujících karotenoidy v potravě hraje významnou roli¹.

Molekuly většiny karotenoidů jsou tvořeny 40 uhlíkovými atomy a sestávají obecně z nenasyceného řetězce o 22 atomech uhlíku s methylovým větvením, typickým pro isoprenoidy. Na oba konce řetězce je připojena devítičlenná jednotka, která může být cyklická nebo acyklická. Polyenová struktura karotenoidů jim dodává barevnost. Většinou mají konfiguraci „all-trans“, to znamená, že všechny dvojné vazby mají konfiguraci *trans*. Karotenoidy jsou jedny z nejdůležitějších přírodních pigmentů, velmi rozšířených v rostlinách i v živočišné říši.

O rozšířenosti karotenoidů svědčí odhad jejich roční tvorby v biosféře 10⁸ tun, přesto, že jejich koncentrace v přírodním materiálu bývá řádově 0,02 až 0,1 % sušiny. Pro praktická použití se karotenoidy získávají extrakcí a chromatografií z rostlinného materiálu, v průmyslovém měřítku se provádí jejich částečná i totální syntéza. Karotenoidy se používají jako potravinářská barviva a ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu².

2. Přehled karotenoidů

Karotenoidy jsou značně rozšířené žluté a oranžové, výjimečně také žlutozelené a červené, převážně lipofilní pigmenty rostlin, hub, řas, mikroorganismů a *de novo* také pigmenty živočichů (korýšů, ryb, ptáků a savců).

V rostlinách jsou karotenoidy principiálně asociovány s chlorofyly v chromoplastech, resp. v chloroplastech. Dnes je známo asi 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů. Z tohoto množství vykazuje asi 50 sloučenin aktivitu vitamínu A, které se nazývají provitaminy A a řadí se mezi retinoidy.

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenoidních jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích.

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny:

1. uhlovodíky nazývané karoteny,
2. kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, epoxidy aj.) odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly^{3–6}.

Podle uhlovodíkové struktury molekuly můžeme karotenoidy rozdělit na:

- karotenoidy s acyklickou strukturou (např. lykopen),
- karotenoidy s monocyklickou strukturou (např. γ-karoten, δ-karoten),

- karotenoidy s bicyckou strukturou (α -karoten, β -karoten, lutein)⁶.

Biosyntéza karotenoidů v přírodě vychází z aktivní formy kyseliny octové, tzv. acetylkoenzymu A. Postupně vzniká acetoacetylkoenzym A, kyselina mevalonová a isopentenyl-difosfát, který představuje tzv. „aktivní isoprenoidní jednotku“. Ze dvou isoprenoidních jednotek spojených způsobem „hlava-pata“ vzniká geranyl-difosfát. Ten kondenzuje s další molekulou isopentenyl-difosfátu za vzniku farnesyl-difosfátu. Prodloužením molekuly farnesyl-difosfátu kondenzací s další molekulou isopentenyl-difosfátu vzniká geranylgeranyl-difosfát s 20 atomy uhlíku v molekule. Redukční kondenzací dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu způsobem „pata-pata“ vzniká nejjednodušší karotenoid, resp. karoten, fytoen, který jako prekurzor tetra-terpenů (karotenoidů) podléhá postupně dehydrogenaci za vzniku „*all-trans*“ konfigurace karotenoidů^{2,5–8}.

Lidský organismus není schopen biosyntézy karotenoidů, a proto je odkázán na jejich příjem potravou, zejména v zelenině a ovoci, popř. v doplňcích stravy⁹.

2.1. Karoteny

Nejjednodušším prototypem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovlík fytoen, který je syntetizován ze dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu. Isomerací z něj vzniká *trans*-isomer fytofluenu, jeho oxidací postupně ζ -karoten, neurosporen a lykopen, systematickým názvem ψ , ψ -karoten, jako finální produkt biosyntézy.

Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo na obou koncích acyklických ψ -karotenů, kdy se tvoří β -jononové struktury v β -karotenech nebo α -jononové struktury v ϵ -karotenech.

Příkladem karotenu s β -jononovým cyklem pouze na jednom konci molekuly je γ -karoten, systematickým názvem β , ψ -karoten a karotenu s α -jononovým cyklem pouze na jednom konci molekuly je δ -karoten, systematickým názvem ϵ , ψ -karoten.

Cyklizací na obou koncích molekuly vznikají struktury přítomné například v β -karotenu, v α -karotenu nebo v ϵ -karotenu. Sloučenina β -karoten se dvěma β -jononovými cykly se tedy systematicky nazývá β , β -karoten, α -karoten je potom β , ϵ -karoten, neboť má jeden β -jononový cyklus a jeden α -jononový cyklus. Karoten se dvěma α -jononovými cykly je ϵ -karoten neboli ϵ , ϵ -karoten.

Karoteny s β -jononovým cyklem, jako je α -karoten, β -karoten a γ -karoten, jsou prekurzory retinolu. Řadí se proto mezi provitaminy A (cit.^{3–5}).

2.2. Xanthofyly

Xanthofyly jsou hlavními karotenoidy rostlin. Primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace (hydroxylace, epoxidace) karotenů.

Xanthofyly odvozené od acyklických karotenů se v potravinách vyskytují v malém množství.

Mnohem běžnější jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů nazývané kryptoxanthiny. Většina rostlinných pletiv obsahuje malá množství α -kryptoxanthinu (odvozen je od α -karotenu) a β -kryptoxanthinu (odvozen je od β -karotenu), které jsou prekurzory xanthofylů obsahujících dvě hydroxylové skupiny v molekule. Xanthofyl β -kryptoxanthin se řadí mezi provitaminy A.

Příkladem dihydroxysubstituovaných pigmentů je lutein (jeho prekurzorem je α -karoten, resp. α -kryptoxanthin), zeaxanthin (prekurzorem je β -karoten, resp. β -kryptoxanthin) a luteoxanthin (prekurzorem je ϵ -karoten).

Oxidací těchto sloučenin vznikají následně 5,6-epoxydy, jakými jsou např. antheraxanthin odvozený od β -karotenu a taraxanthin neboli luteinepoxid odvozený od α -karotenu. Oxidací na obou koncích molekuly vznikají 5,6,5',6'-diepoxidy, jako je violaxanthin^{3–5}.

2.3. Apokarotenoidy

Poměrně malou, avšak velmi významnou, skupinou xanthofylů jsou sloučeniny obsahující v molekule méně než 40 atomů uhlíku. Tyto sloučeniny vzniklé štěpením molekuly karotenoidů se nazývají degradované karotenoidy nebo apokarotenoidy. Apokarotenoidy vykazují různé biologické funkce. Základním a nejvýznamnějším biologicky aktivním apokarotenoidem živočišných tkání je vitamin A₁ (*all-trans*-retinol)^{3,4,8}.

Mezi významné produkty katabolismu karotenoidů se dále řadí dosti rozšířený β -citraurin (30 atomů uhlíku), bixin neboli *cis*-bixin ze semen annatto (22 atomů uhlíku) a krocetin vyskytující se v šafránu (20 atomů uhlíku)^{3–5}.

Hlavní přirozenou barevnou složkou extraktu z vnějších částí semen zvaných annatto, keře orelníku barvířského (*Bixa orellana* L.) rostoucího v tropech (v zemích Střední a Jižní Ameriky) je apokarotenoid bixin neboli 9'-*cis*-bixin, který vzniká jako produkt katabolismu luteinu. Sušené blizny šafránu setého (*Crocus sativus* L.) obsahují apokarotenoid krocetin neboli α -krocetin vzniklý štěpením zeaxanthinu^{3,4}.

2.4. Výskyt karotenoidů

V zrníkových útvech cytoplasmy mnoha rostlinných buněk jsou obsaženy ve vodě rozpustné konjugáty karotenoidů s bílkovinami. V potravinách, kde jsou již původní buněčné struktury rozrušeny, nalézáme však odštěpené karotenoidy jako látky ve vodě nerozpustné, ale dobře rozpustné v tucích a v nepolárních rozpouštědlech. Více než 90 % rostlinných karotenoidů je obsaženo v buňkách listů, obvykle jako směs 20–40 % karotenů (více než 70 % z nich tvoří β -karoten) a 60–80 % jejich oxidačních produktů².

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy mnoha druhů ovoce a zeleniny. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletvech,

kde jsou přítomny jako fotochemicky aktivní složky plastidů (rostlinných organel) nazývaných chromoplasty. Často je doprovázejí další barviva, u broskví a meruněk např. anthokyany. Přítomnost karotenoidů v zelených částech rostlin bývá maskována chlorofylem.

Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů závisí na mnoha faktorech, jako je druh a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. V některých druzích ovoce a také v bramborách se karotenoidy vyskytují v jednotkách mg kg^{-1} , ve většině druhů ovoce a zeleniny jsou přítomny v desítkách mg kg^{-1} , v mrkvi, rajčatech a paprikách se nacházejí stovky mg kg^{-1} karotenoidů.

Určitá část karotenoidů vytváří vazbu s bílkovinami, podobně jako je tomu u chlorofylů. Tyto konjugáty se obecně nazývají karotenoproteiny. Xanthofyly se navíc vyskytují jako volné látky a také jako estery s mastnými kyselinami (hlavním pigmentem květů slunečnice roční, *Helianthus annuus L.*, je diester luteinu s palmitovou kyselinou) nebo jako glykosidy.

All-trans-isomery karotenoidů jsou v čerstvých i tepelně zpracovaných materiálech doprovázeny malým množstvím *cis*-isomerů, které se nazývají neokarotenoidy. β -Karoten doprovází hlavně geometrické isomery 9-*cis*-, 13-*cis*- a 15,15'-*cis*- β -karotenu. Lutein doprovází hlavně 9-*cis*- a 9'-*cis*-, 13-*cis*- a 13'-*cis*-isomery a méně 15-*cis*- a 15'-*cis*-isomerů.

V ovoci jednoho druhu se běžně nalézá větší počet karotenoidů. Vzácněji (např. v meruňkách a mangu) se jako hlavní pigment vyskytuje β -karoten. Dalšími pigmenty meruněk jsou různé jiné karoteny, xanthofyly jsou přítomny ve velmi malém množství. V broskvích je ve srovnání s meruňkami přítomno větší množství xanthofylů, část se vyskytuje ve formě monoesterů a diesterů mastných kyselin (převážně myristové a palmitové). Pomeranče obsahují značně proměnná množství kryptoxanthinu, luteinu, antheraxanthinu a violaxanthinu jako hlavní pigmenty a řadu dalších xanthofylů, avšak poměrně malé množství karotenů^{3,4}.

V listových zeleninách tvoří zpravidla 10–20 % přítomných karotenoidů β -karoten. Ve velkém množství bývají přítomny lutein, violaxanthin a neoxanthin. Hlávkový salát obsahuje větší množství laktukaxanthinu. Zeaxanthin je hlavní karotenoid kukuřice. V mrkvi je převládajícím pigmentem β -karoten. V rajčatech je hlavním pigmentem lykopen (běžně 85 % všech karotenoidů). V zelených paprikách jsou kromě chlorofylů hlavními pigmenty karotenoidní pigmenty lutein, violaxanthin, neoxanthin a β -karoten. Větší část pigmentů zralých paprik je plně nebo částečně esterifikována mastnými kyselinami (asi z 80 %). Ve žlutých xanthofylech je hlavní mastnou kyselinou linolová, myristová a palmitová kyselina, v červených xanthofylech je vázána především laurová, myristová a palmitová kyselina. Relativně vysoký obsah karotenoidů (až 0,2 %) má palmový olej, jeho hlavními složkami jsou α - a β -karoten^{3,4}.

U živočichů jsou karotenoidy přítomné hlavně v povrchových tkáních (kůže, krovky, šupiny, peří, zobá-

ky), ale též ve žloutku ptačích vajec a jako zrakové pigmenty². Karotenoidy živočišných tkání jsou ovšem rostlinného původu, protože živočichové nejsou schopni syntetizovat karotenoidy *de novo*, pouze přeměňují potravou získané rostlinné pigmenty na látky odlišné struktury nebo je skladují jako takové^{3,4}.

Hlavními pigmenty depotních tuků ptáků (drůbeže) a savců jsou xanthofyly lutein a zeaxanthin, přítomno je také malé množství β -karotenu a dalších pigmentů. Ve vaječném žloutku jsou hlavními pigmenty stejné xanthofyly a karoteny jako v depotním tuku slepic. Červeným pigmentem lososovitých ryb a také mnoha koryšů (krevet, krabů, raků) je xanthofyl astaxanthin. U koryšů je astaxanthin vázán na bílkoviny v tmavých modročervených a zelenočervených karotenoproteinech. Červený kanthaxanthin je pigmentem některých druhů brouků^{3,4}.

2.5. Použití karotenoidů

Některé karotenoidní pigmenty se jako čerstvé nebo sušené části rostlin nebo extrakty používají k barvení potravin od nepaměti (např. mrkev, slupky pomerančů, rajčat, šafrán, annatto, paprika). Ke stejnému účelu se používá také palmový olej obsahující karotenoidní pigmenty.

Syntetické karotenoidy našly použití jako lipofilní i hydrofilní potravinářská barviva a také jako antioxidanty poměrně nedávno.

V množství zpravidla 1–10 mg kg^{-1} se karotenoidy používají k barvení mnoha potravin, např. margarínů, sýrů, jogurtů, zmrzlin, ovocných džusů, dresingů, mouky, těstovin, cukrářských výrobků a dalších.

Nejznámějším a technologicky nejdůležitějším barvivem je β -karoten². Dalšími karotenoidy, které se používají v potravinářském průmyslu, jsou annatto (E160b), paprikový extrakt (E160c), lykopen (E160d), lutein (E161b) a kanthaxanthin (E161g)^{3,4}.

Karotenoidy se rovněž přidávají do krmiva dojníc a drůbeže pro zajištění žádoucí pigmentace mléka, mléčných výrobků, vajec a masa^{3,4}.

Karotenoidy jsou prekurzory mnoha důležitých sloučenin, které vznikají jako produkty jejich katabolismu nebo oxidace, např. při zrání ovoce nebo jeho zpracování. Degradační produkty karotenoidů zodpovědné za vůni a chuť potravin (hlavně ovoce a zeleniny) a vůni mnoha květin jsou především C_{13} , C_{11} , C_{10} a C_9 sloučeniny. Nejvýznamnějšími apokarotenoidy jsou C_{13} sloučeniny⁴.

Štěpení molekuly karotenoidů *in vivo* při zrání a také během některých způsobů zpracování rostlinných materiálů probíhá za katalýzy regioselektivních dioxygenasových enzymů ze skupiny oxidoreduktas. Některé z těchto primárních degradačních produktů karotenoidů jsou již samy důležitými vonnými látkami, např. α - a β -jonon vznikají z α -karotenu a 3-hydroxy- α - a 3-hydroxy- β -jonon vznikají z luteinu. Vyskytují se jako složky vonných látek malin, borůvek, ostružin, meruněk, manga, banánů, višní, švestek, rajčat, papriky, mrkve, petržele a mnoha jiných druhů ovoce a zeleniny, ale také zeleného a černého čaje a tabáku^{3,4}.

2.6. Antioxidační aktivita karotenoidů

Hlavní příznivý účinek karotenoidů spočívá v jejich antioxidačních schopnostech. Karotenoidy jsou přírodní antioxidanty, které pomáhají člověku v boji s některými nemocemi. Ačkoli se karotenoidy vzájemně podobají, každý z nich účinkuje specificky na určitou tkáň¹⁰.

Karotenoidy reagují s reaktivními formami kyslíku, a proto působí jako antioxidanty. Mechanismus antioxidačního působení karotenoidů se liší od mechanismu působení vitaminu E nebo syntetických fenolových antioxidantů. V heterogenních systémech, jako jsou emulze, nejsou výrazné rozdíly mezi jednotlivými karotenoidy. V homogenních systémech, např. v bezvodých tucích a olejích, se však jednotlivé látky svými antioxidačními vlastnostmi poněkud liší. Za anaerobních podmínek, resp. v přítomnosti malého množství kyslíku, vykazují karotenoidy vyšší antioxidační účinky^{8,11}.

Karotenoidy jako antioxidanty jsou účinné při nízkých koncentracích kyslíku, a tím doplňují antioxidační působení vitaminu E, který je účinný při vyšších koncentracích kyslíku¹².

Běžný atmosferický kyslík O₂ existuje ve stavu tripletovém (³O₂). Excitací tripletového kyslíku vzniká reaktivní singletový kyslík (¹O₂), který reaguje s dvojnou vazbou nenasycených lipidů (minimálně 1450krát rychleji než tripletový kyslík) a dalšími nenasycenými sloučeninami. Ze složek potravin jsou to hlavně karotenoidy, které jsou schopny zhaset singletový kyslík^{13,14}. Karotenoidy vykazovaly o tři řády vyšší schopnost inaktivovat singletový kyslík ve srovnání s flavonoidy¹⁵. Určité karotenoidy, jako např. lykopen, astaxanthin a kanthaxanthin, jsou účinnější při zhašení singletového kyslíku než β-karoten⁴.

Za nejvýznamnější faktor způsobující rozpor mezi antioxidační aktivitou *in vitro* a účinkem antioxidantů v lidské organismu se přitom považuje jejich biologická dostupnost, zahrnující tři základní fáze (kroky), a to uvolnění daných látek z potravinové matrice, jejich vstřebání v trávicím traktu a přestup do buněk¹⁵.

Dokonce ani po více než 25 letech intenzivních studií ještě není zřejmé, jestli karotenoidy mají důležité místo v hierarchii přírodních antioxidantů *in vivo*. Jednou z nejvíce obecně diskutovanou vlastností karotenoidů je jejich schopnost reagovat jako antioxidant nebo prooxidant v závislosti na reakčních podmínkách daného biologického systému⁹.

Hlavní význam karotenoidů spočívá v jejich příspěvku k přenosu energie ve fotosyntéze (fungují jako doplňkové fotoaktivní pigmenty) a v ochraně prokaryot proti zhoubným účinkům světla. Vedle molekul chlorofylů obsahují chloroplasty i některé jiné pigmenty, např. karotenoidy, které se podílejí na absorpci světla v zelené oblasti a zvyšují tak účinnost jeho zachycování. Jinak však jejich funkce ve fotosyntéze není jasná².

2.7. Význam karotenoidů ve výživě člověka

K nejdůležitějším karotenoidům, vedle β-karotenu a lykopenu, patří α-karoten, γ-karoten, β-kryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, neoxanthin, violaxanthin, kanthaxanthin a citranaxanthin, které působí jako provitaminy a antioxidanty. Údaje o jejich koncentracích v potravinách jsou dosud značně omezené, ale díky rozvíjející se analytické technice jsou stále upřesňovány¹.

V lidském organismu je podíl na celkové koncentraci cirkulujících karotenoidů značný (lykopen 20–40 %, β-karoten 15–30 % a lutein 10–20 %). Lykopen a β-karoten převládají v krevním séru a lutein v erytrocytech. Průměrná koncentrace luteinu v krevním séru člověka je 0,36 μmol l⁻¹ (0,20 mg l⁻¹)¹.

Vstřebatelnost uvolněných karotenoidů (přirozeně vázaných v chloroplastech nebo chromoplastech) z potravinové matrice je v trávicím traktu člověka obecně relativně nízká. Míra a rychlost vstřebávání karotenoidů může být ovlivněna (obvykle zvýšena) předchozím kulinárním zpracováním potravin. Například lykopen je lépe využitelný z rajčatových výrobků než ze syrových rajčat a podobně β-karoten z tepelně opracované mrkve či špenátu je lépe využitelný než ze syrové zeleniny¹⁵.

Isomerické formy (*cis/trans*) karotenoidů mohou být důležitým faktorem v biologické aktivitě karotenoidů, především ve vztahu k jejich biologické dostupnosti, přenosu a ukládání v tekutinách a tkáních lidského těla⁹.

Za antioxidačně vysoce účinný karotenoidový mix, jehož složky se ve svých účincích vzájemně podporují (tzv. synergismus) se považuje: β-karoten, α-karoten, γ-karoten, lutein, zeaxanthin a lykopen¹⁶.

Doporučené denní dávky karotenoidů jsou následující:

- β-karoten 1–6 mg, lutein 1–5 mg a zeaxanthin 1 mg,
- karotenoidy (celkově) 6–10 mg (cit.¹⁷).

Vyšší denní dávky karotenoidů než doporučené, získané ať už z potravy nebo z doplňků stravy, mohou oranžově zbarvit kůži, zvláště na dlaních a chodidlech. Tento příznak je neškodný a postupně vymizí, snížíme-li denní dávky karotenoidů¹⁰.

Pro antioxidační vlastnosti se karotenoidy uplatňují v prevenci degenerativních procesů a jako antikarcinogenní látky^{3,4}. V případě β-karotenu se pozitivní účinek na lidský organismus zvyšuje jen do určité dávky. Vysoké dávky β-karotenu mohou totiž působit negativně, tj. zvyšovat riziko nádorových onemocnění a/nebo urychlovat jejich rozvoj, což za těchto podmínek souvisí s jeho možnou konverzí na prooxidant¹⁵.

Karotenoidy (především β-karoten) chrání lidskou kůži před vysokou intenzitou slunečního záření a UV zářením, které může vést k poškození kůže, popř. být příčinou rakoviny kůže. Karotenoidy mají také pozitivní vliv na imunitní systém člověka⁹.

Karotenoidy jsou nejdůležitějším zdrojem provitaminů A pro lidskou populaci. Aktivitu vitaminu A (antixerofthalmický vitamin, vitamin proti xeroftalmii, šerošlepotě) vykazuje asi 50 přirozeně se vyskytujících slouče-

nin ze skupiny karotenoidů, které se nazývají provitaminy A. Nejznámějším a nejvýznamnějším provitaminem A je β -karoten. V potravinách je často doprovázen α -karotenem, γ -karotenem a xanthofyly (β -kryptoxanthinem, echinenonem) a dalšími provitaminy A. Další karotenoidy, jako jsou α -kryptoxanthin, lutein a zeaxanthin, vykazují naproti tomu asi poloviční aktivitu jako provitamin A (cit.^{4,8,9}).

U živočichů, ale i u ptáků a ryb, jsou provitaminy A (karotenoidy obsahující alespoň jeden β -jononový cyklus) transformovány na *all-trans*-retinal neboli retinaldehyd. Z β -karotenu (symetrickým štěpením molekuly β -karoten 15,15'-dioxygenasou) vznikají dvě molekuly retinalu, ostatní provitaminy A poskytují pouze jednu molekulu retinalu. Retinal je reverzibilně redukován retinaldehydrogenasou na *all-trans*-retinol (axerofol či vitamin A₁), který je nejvýznamnějším biologicky aktivním apokarotenoidem živočišných tkání⁸. Retinol je významný především v biochemii zrakového vjemu. Biochemie vidění je složitý proces. V tomto procesu isomeruje *all-trans*-retinol na 11-*cis*-retinol a ten je enzymově oxidován na příslušný aldehyd, 11-*cis*-retinal, který se specificky váže na zrakový protein opsin, čímž dojde k vytvoření rhodopsinu. Vzniklý komplex je vizuálním pigmentem (fotoreceptorem), který zahajuje kaskádu, jež světlo (fotony) dopadající na sítnici oka převádí na elektrický impuls čili nervový signál. Pohlcením fotonu ze světla se rhodopsin štěpí na opsin a *all-trans*-retinal, který je nezbytný pro udržování této cyklické reakce^{8,11,12,18}.

Přestože až dosud bylo v potravě identifikováno přes šest set karotenoidových barviv, lidský organismus jich umí využít pouze šest. Sem patří kromě β -karotenu, který je z nich nejznámější, také α -karoten, lutein, lykopen, kryptoxanthin a zeaxanthin¹⁰.

V tomto století se očekává plné využití pěti nejúčinnějších karotenoidů, a to α -karotenu, β -karotenu, lykopenu, luteinu a zeaxanthinu¹⁹.

3. Lutein

Lutein (z lat. *luteus* znamená „žlutý“) je žlutý rostlinný pigment patřící do „chemické rodiny“ karotenoidů, resp. xanthofylů. Je přítomen v mnoha druzích ovoce a zeleniny, zejména v listové zelenině, ale také ve vaječném žloutku a v očních tkáních^{20–24}.

Lutein se v těle člověka nemění ve vitamin A, ale je účinným antioxidantem. Vyniká ochranou očí, protože

neutralizuje volné radikály, které vznikají působením ultrafialových paprsků na oční sítnici. Zastavuje také degenerativní změny na žluté skvrně, jež bývají příčinou slepoty¹⁹.

Člověk není schopen syntetizovat lutein, a proto jeho příjem zcela závisí na přírodních zdrojích jako je ovoce a zelenina nebo na doplňcích stravy^{20,23}.

Biologická dostupnost a využitelnost luteinu z potravy závisí na jeho zdrojích a je velmi různorodá. Vysoká využitelnost luteinu je z vaječného žloutku a velmi nízká z listové zeleniny²³.

Sladkovodní ryby přeměňují lutein na anhydrolutein, který se štěpí na příslušné aldehydy. Z nich vznikají redukci *all-trans*-3,4-didehydroretinol (vitamin A₂) a *all-trans*-3-hydroxyretinol, který se může dehydratovat za vzniku další molekuly vitaminu A₂. U mořských ryb, ptáků a savců se tento vitamin netvoří^{5,8}.

3.1. Chemická struktura, syntéza a formy luteinu

Lutein, systematickým názvem (3*R*,3'*R*,6'*R*)- β , ϵ -karoten-3,3'-diol nebo také 3,3'-dihydroxy- α -karoten, má chemický vzorec C₄₀H₅₆O₂, strukturní vzorec je na obr. 1. Jako potravinářské barvivo má lutein označení E161b, molární hmotnost 568,88 g mol⁻¹, teplotu tání 190 °C a symbol CAS 127-40-2. V čisté formě je lutein červeno-oranžová krystalická látka, nerozpustná ve vodě, rozpustná v tucích a v polárních organických rozpouštědlech^{4,5,24,25}.

Biosyntéza *all-trans*-luteinu v rostlinách se stává středem zájmu výzkumníků z důvodu zvýšení produkce luteinu rostlinami pomocí genových manipulací rostlin²³.

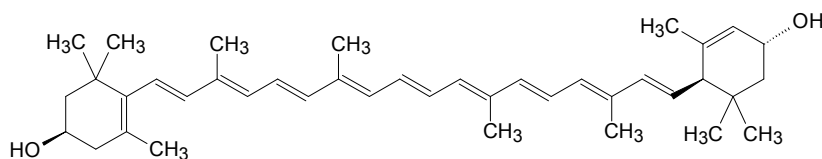
Chemická syntéza *all-trans*-luteinu neboli (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteinu je velmi obtížná a časově náročná. Molekula luteinu obsahuje tři centra chiralit (C3, C3' a C6'), a proto může vzniknout osm stereoisomerů luteinu²⁶.

Rostlinné materiály obsahují *all-trans*-isomer luteinu, ale byly detegovány i *cis*-isomery luteinu, které vznikají i působením světla, teploty a dalších faktorů během extrakce a analýzy vzorků^{6,23,27,28}.

3.2. Přírodní zdroje luteinu

V rostlinných materiálech je lutein přítomen ve dvou formách:

- ve formě volného luteinu – např. v listové zelenině (špenát, kapusta a brokolice),
- ve formě esteru luteinu s mastnými kyselinami – např.



Obr. 1. Strukturní vzorec luteinu

v ovoci (mango, pomeranč, papája a jiné) a v zelenině (zelená a červená paprika, žlutá kukuřice a jiné)^{23,29,30}.

Koncentrace luteinu v požitelných přírodních zdrojích, jako je zelenina a ovoce, závisí na druhu, odrůdě, stupni zralosti, části plodu, ale také na jejich tepelné úpravě či způsobu konzervace nebo skladování²³. Obsah luteinu v některých druzích čerstvé zeleniny a ovoce je znázorněn na obr. 2.

3.3. Komerční zdroje luteinu

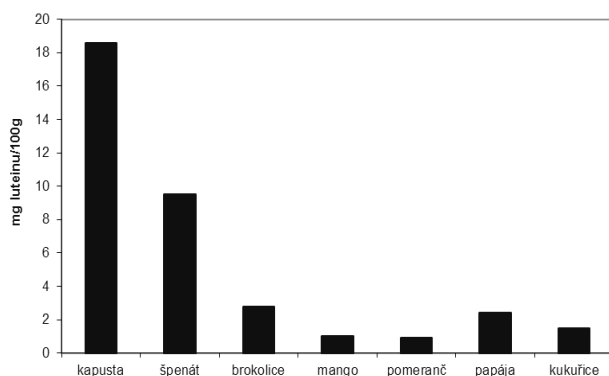
Bohatým zdrojem luteinu je aksamitník vzpřímený (*Tagetes erecta* L.), který se pro komerční účely pěstuje v Mexiku, Peru, Ekvádoru, Španělsku, Indii a Číně^{20,23,31}.

Sušené květy aksamitníku vzpřímeného obsahují 0,10–0,16 % karotenoidů, z toho 90 % tvoří estery luteinu. Extrakcí sušených a rozemletých květů aksamitníku vzpřímeného se získává nepolární extrakt (tzv. oleoresin), který je důležitým komerčním zdrojem luteinu. Během technologického procesu se vlivem tepla, světla, vzdušného kyslíku a kyselin katalyzuje isomerace *trans*-luteinu na *cis*-lutein. Složení nepolárního extraktu z aksamitníku vzpřímeného je na obr. 3. Purifikací nepolárního extraktu se získává lutein ester nebo jeho následnou saponifikací se získává volný lutein. Obě formy luteinu, jak lutein ester, tak volný lutein, se komerčně používají jako suroviny pro výrobu doplňků stravy. Výrobci luteinu pro komerční účely nabízí lutein nebo lutein ester v práškové formě, v olejové formě nebo v enkapsulované formě (z ang. „beadlets“)²⁰.

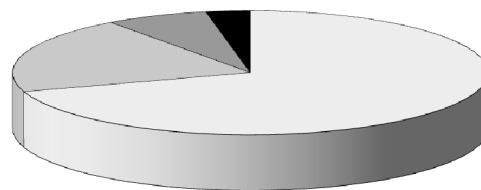
3.4. Lutein ve výživě člověka

Lutein je velmi důležitý pro zrak. Hromadí se ve dvou oblastech očí – v tzv. žluté skvrně (lat. *macula lutea*) na sítnici a v oční čočce. Lidé s degenerací žluté skvrny mají často celotělový nedostatek luteinu a malé, neefektivní zásoby tohoto karotenoidu v oku. Vzhledem k roli žluté skvrny v „jemném“ i „centrálním“ vidění může její degenerace vést k vážnému zhoršení zraku a slepotě^{10,32}.

Lutein je životně důležitou součástí oční sítnice a chrání oči před poškozením ultrafialovým zářením



Obr. 2. Obsah luteinu ve vybrané čerstvé zelenině a ovoci



Obr. 3. Složení nepolárního extraktu z aksamitníku vzpřímeného; □ *trans*-lutein 70 %, ■ *cis*-lutein 20 %, ■ zeaxanthin 7 %, ■ ostatní 3 %

a následnou ztrátou zraku. Tento karotenoid snižuje riziko makulární degenerace a šedého zákalu.

Věkem podmíněná makulární degenerace (z ang. Age-related Macular Degeneration – AMD nebo ARMD) je zdravotní stav, který vede ke ztrátě zraku ve středu zorného pole v důsledku poškození oční sítnice.

Makulární degenerace, v rozvinutých zemích hlavní příčina oslepnutí osob nad 55 let, u nás postihuje každého dvacátého seniora. Toto onemocnění poškozuje makulu, což je centrální část oční sítnice, která je důležitá pro jasné a ostré vidění. Jak nemoc postupuje, v centrálním poli vidění se postupně objevují slepé skvrny. Studie ukazují, že strava bohatá na lutein snižuje riziko vzniku makulární degenerace.

Hlavní příčinou zhoršeného zraku v rozvinutých zemích je šedý zákal (katarakta, z ang. cataract). S postupujícím věkem oční čočka ztrácí průhlednost a tím dochází ke zhoršení zraku (zastřené vidění a ztráta vnímání podrobností). Ačkoli se spojitost mezi luteinem a šedým zákalem ještě stále zkoumá, studie nasvědčují tomu, že tento karotenoid může působit jako vnitřní sluneční brýle filtrující škodlivé ultrafialové paprsky^{9,33}.

Lutein hraje důležitou roli v percepčním jevu, nazvaném Haidingerův snop, umožňující člověku spatřit a určit rovinu polarizovaného světla či směr rotace kruhově polarizovaného světla⁹.

Nedávno dokončený výzkum naznačuje, že lutein rovněž chrání proti nemocem srdce a rakovině. Je rozpustný v tucích, a proto jej přenáší jedna z forem tzv. „cholesterolu“ – lipoprotein o nízké hustotě (LDL). Nejméně jedna studie ukazuje, že lutein chrání vitamin E před oxidací LDL. Také pravděpodobně přispívá k funkčnosti imunitního systému³².

Lutein je velmi důležitým antioxidantem. Má silné antioxidační vlastnosti a preventivně chrání oči před silným slunečním zářením, před nečistotou v ovzduší, zplodinami kouření a UV zářením. Lutein zabraňuje peroxidaci tuků, která je značná jak v krevním séru, tak i v očích. Vysoké dávky luteinu snižují riziko vzniku rakoviny děložního hrdla¹⁰.

Mnoho vědeckých studií se zabývalo antioxidačním aktivitou luteinu v modelových systémech, ale většina z nich nemůže být použita k porovnání antioxidačního účinku luteinu získaného z přírodních zdrojů (z potravy) na lidské zdraví²³.

4. Závěr

Na celém světě vzrůstá zájem o zdravý životní styl a nikdo už nepochybuje o tom, že největší důraz je třeba klást na prevenci zdravotních potíží a nemocí. Jednou z cest je kondiční sport a cvičení, ale existuje celá řada vědeckých důkazů o tom, že volné radikály, které při fyzických aktivitách vznikají, hrají klíčovou roli jako jedna z příčin snížené regenerace a zdravotních problémů. Volné radikály však mohou pocházet i z jídel, která konzumujeme, z vody, kterou pijeme, ze vzduchu, který dýcháme, stejně jako z výrobků a obalů, které každodenně používáme. Proti nim je namířen účinek antioxidantů. To jsou jednak přírodní látky, které získáváme v omezené míře z potravin (vitamin C, karotenoidy, koenzym Q10 aj.), jednak z doplňků stravy, v nichž je obsah antioxidantů přesně definován¹⁶.

Kvůli relativně nízké biologické využitelnosti luteinu z přírodních zdrojů je doporučována konzumace potravin obohacených o lutein nebo užívání doplňků stravy s obsahem luteinu²³. Denní doporučená dávka luteinu je 6 až 10 mg. Některé studie dokonce doporučují denní dávku 20 mg luteinu^{21,22}.

Doplňky stravy obsahující lutein se postupně stávají nedílnou součástí našeho běžného života. Jejich dostupnost na českém trhu, ať už v lékárnách, v supermarketech či v internetových obchodech, je velmi široká. Řada těchto doplňků stravy budí podezření poměrně vysokým obsahem účinných látek na straně jedné a nízkou cenou na straně druhé.

Výrobci doplňků stravy s obsahem luteinu musí pečlivě vybírat suroviny pro jejich výrobu. Prvním a možná nejdůležitějším předpokladem výroby kvalitních doplňků stravy je spolehlivý a důvěryhodný obchodní partner, který dbá nejen na kvalitu nabízené suroviny, ale také na spolehlivou metodu analýzy této suroviny. Tím je zaručen deklarovaný obsah účinné látky, v našem případě luteinu v daném extraktu z aksamitníku vzpřímeného.

Povinnost výrobců provádět vstupní analýzu používaných surovin a výstupní analýzu jimi vyráběných doplňků stravy by měla být samozřejmostí. Výrobci doplňků stravy by také měli zvážit případné negativní následky při používání levných surovin (extraktů) obsahujících lutein, kterých je na trhu mnoho.

LITERATURA

- Hlúbik P., Opltová L.: *Vitaminy*. Grada Publishing, Praha 2004.
- Vodrážka Z.: *Biochemie (1., 2. a 3. díl)*. Academia, Praha 1999.
- Velíšek J.: *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor 1999.
- Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II*. OSSIS, Tábor 2009.
- Velíšek J., Cejpek K.: *Biosynthesis of Food Components*. OSSIS, Tábor 2008.
- Masák J., Pelechová J., Plachý J.: *Speciální mikrobiální technologie*. VŠCHT, Praha 1992.
- Šícho V.: *Potravinářská biochemie*. SNTL, Praha 1969.
- Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor 2009.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health*. Birkhäuser Verlag, Basel 2009.
- Jordán V., Hemzalová M.: *Antioxidanty zázračné zbraně*. JOTA, Brno 2001.
- Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. OSSIS, Tábor 1999.
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova Biochemie*. H&H, Praha 1998.
- Velíšek J.: *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor 1999.
- Eastwood M.: *Principles of Human Nutrition*. Blackwell Publishing, Edinburgh 2003.
- Rěblová Z.: *Chem. Listy 105*, 667 (2011).
- Mach I.: *Doplňky stravy*. Svoboda Servis, Praha 2004.
- Mach I.: *Doplňky stravy na našem trhu*. Svoboda Servis, Praha 2006.
- Hořejší J., Pahl R.: *Lidské tělo*. CESTY, Praha 1996.
- Máček M.: *Vitaminová bible pro 21. století*. Knižní klub, Praha 2000.
- Antony J. I. X., Shankaranarayana M. L.: *The World of Food Ingredients*. 64 (2001).
- Food & Drink Technology*, July/August, 28 (2007).
- Food & Drink Technology*, November, 15 (2007).
- Calvo M. M.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 671 (2005).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy 99*, 802 (2005).
- Cieslarová Z., Matějka P.: *Chem. Listy 105*, s10 (2011).
- Khachik F., Chang A.: *J. Org. Chem.* 74, 3875 (2009).
- Humphries J. M., Khachik F.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1322 (2003).
- Updike A. A., Schwartz S. J.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 6184 (2003).
- Khachik F., Beecher G. R., Whittaker N. F.: *J. Agric. Food Chem.* 34, 603 (1986).
- Breithaupt D. E., Bamedi A.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2064 (2001).
- Breithaupt D. E., Wirt U., Bamedi A.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 66 (2002).
- Novotná J.: *O antioxidantech*. Pragma, Praha 2002.
- Kadleček J., Mayer J., Kanta J.: *Braňte se jídlem*. Reader's Digest Výběr, Praha 2007.

M. Šivel^a, B. Klejdus^b, S. Kráčmar^a, and V. Kubáň^c (^a *Department of Food Analysis and Chemistry, Faculty of Technology, Tomáš Bata University, Zlín, Czech Republic,* ^b *Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, Czech Republic,* ^c *Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomáš Bata University, Zlín, Czech Republic*): **Lutein – An Important Carotenoid in Human Nutrition**

Carotenoids are one of the most used natural colorants due to their non-toxic nature and wide occurrence. Carotenoids are commonly found in orange, yellow and green fruits and vegetables. Lutein is a yellow pigment ranking among carotenoids. Lutein occurs in green vegetables, fruits like mango and papaya, red paprika, alfalfa, algae, yellow corn, and marigold flower. In animals it occurs in egg yolks and also in the macular region of the eye retina. Humans are not able to synthesize lutein depending entirely on natural sources or dietary supplements.

SIRTUINY – HISTONOVÉ DEACETYLASY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSKRIPCI GENŮ

MARCELA DVOŘÁKOVÁ^{a,b}, MARIE
PŘIBYLOVÁ^a a TOMÁŠ VANĚK^a^a Laboratoř rostlinných biotechnologií, Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ^b Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2

vanek@ueb.cas.cz

Došlo 12.9.12, přepracováno 29.10.12, přijato 9.11.12.

Klíčová slova: sirtuiny, deacetylasy, histony, post-translační modifikace, transkripce

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Chromatin
 - 1.2. Histony
 - 1.3. Proteiny nehistonové povahy ovlivňující transkripci genů
2. Post-translační modifikace proteinů
 - 2.1. Acetylace
 - 2.1.2. Histonové deacetylasy
3. Sirtuiny (SIR)
 - 3.1. Deacetylační aktivita SIR
 - 3.2. Další reakce katalyzované SIR
 - 3.3. SIR v buněčných procesech
 - 3.3.1. Omezení příjmu kalorií (CR)
 - 3.3.2. Volné kyslíkaté radikály (ROS)
 - 3.4. Jednotlivé lidské homology SIR a jejich funkce
 - 3.5. Regulace SIR aktivity
 - 3.5.1. Post-translační modifikace
 - 3.5.2. Aktivátory SIR
 - 3.5.3. Inhibitory SIR
4. Závěr

1. Úvod

Sirtuiny jsou enzymy řadící se mezi histonové deacetylasy (HDAC), které deacetylují lysinové zbytky na amino-koncích histonů, proteinů vázajících DNA¹. Histony tvoří společně s DNA a nehistonovými proteiny strukturu chromatinu a jejich deacetylase vede k transkripčnímu umlčování genů vlivem vzniku těsně uspořádané formy chromatinu, tzv. heterochromatinu.

1.1. Chromatin

Chromatin, základní stavební jednotka chromosomů, nositelů genetické informace, se nachází v jádru eukaryotických buněk. Základem chromatinu je jádro nukleosomu, které se skládá z úseku DNA o délce 146 párů bází obtočeného kolem oktameru tvořeného čtyřmi histony (H2A, H2B, H3 a H4)^{2,3}. Jádra nukleosomů jsou navzájem propojena pomocí spojnicových částí DNA do nukleosomového řetězce, který s pomocí spojovacího histonu H1 tvoří chromosom, chromatinové vlákno o průměru 30 nm. Histon H1 chrání spojnicové části DNA mezi nukleosomy proti působení nukleas a zároveň umožňuje kondenzaci chromatinu tím, že k sobě těsně přitáhne jednotlivé nukleosomy³. Na toto 30 nm chromatinové vlákno se váží proteiny nehistonové povahy, jako jsou topoisomerasa II, HMG proteiny (*high mobility group proteins*, proteiny s vysokou pohyblivostí v elektroforetickém poli), či transkripční faktory, které společně s histony tvoří chromatin².

Dle stupně kondenzace chromatinových vláken můžeme rozlišit dva různé stavy chromatinu. V prvním stavu je vlákno rozvolněné (euchromatin), ve druhém je těsně uspořádané (heterochromatin). Heterochromatin je transkripčně neaktivní forma chromatinu, která byla poprvé popsána v roce 1928 (cit.⁴).

1.2. Histony

Histony jsou relativně malé bazické proteiny o 102 až 135 aminokyselinách, ve kterých jsou bohatě zastoupeny aminokyseliny lysin a arginin². Kladný náboj na postranních řetězcích těchto aminokyselin interaguje se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA, čímž ovlivňuje strukturu chromatinu².

Postranní řetězce aminokyselin na amino-koncích histonů jsou přístupné různým kovalentním post-translačním modifikacím, jako jsou acetylace, methylace či fosforylace⁵. Tyto modifikace mohou mít vliv na distribuci náboje v chromosomu a tím ovlivňovat stupeň jeho kondenzace. Zároveň ovlivňují vazbu proteinů nehistonové povahy na chromatin².

1.3. Proteiny nehistonové povahy ovlivňující transkripci genů

Proteiny nehistonové povahy tvořící chromatin také podléhají post-translačním modifikacím, které modulují jejich aktivitu i funkci a ovlivňují tak transkripci genů^{1,6}.

Prvním nehistonovým proteinem, u něhož bylo prokázáno, že jeho aktivita je ovlivněna post-translačními modifikacemi, byl transkripční faktor p53. Protein p53 ovlivňuje zejména apoptózu a stárnutí buněk. Látky, které p53 aktivují, jsou schopné léčit rakovinu v podmínkách

*in vivo*⁶. Do skupiny p53 transkripčních faktorů patří také protein p73. Ten je schopen vazby na p53 a tím aktivace apoptózy buněk⁶.

Dalšími důležitými transkripčními faktory jsou Forkhead box O (FOXO) proteiny, které přímo ovlivňují zastavení buněčného cyklu v G1/S a G2/M fázi, detoxikují volné kyslíkaté radikály (reactive oxygen species, ROS), a indukují transkripci genů spojených s opravami poškozené DNA či metabolismem glukosy¹.

Kromě transkripčních faktorů mají na transkripci genů a buněčné procesy vliv i další proteiny podléhající post-translačním modifikacím, jako je nukleární faktor kappa B (NF-κB) modulující protizánětlivé procesy, nukleární protein Ku-70 zajišťující opravu poškozených DNA zlomů, poly-(ADP-ribosyl) polymerasa 1 (PARP1) vážící se na poškozené části DNA, které ADP-ribosyluje, AMP-aktivovaná protein kinasa (AMPK), stimulující produkci energie z glukosy a mastných kyselin, nukleární receptory zvané peroxisomální proliferaci-aktivované receptory α-γ (PPARα-γ) modulující ukládání tuků, PPAR-gamma koaktivátor-1α (PGC-1α), ovlivňující buněčný metabolismus a biogenezi mitochondrií, či endoteliální NO syntasa (eNOS) produkující NO a tím způsobující vasodilataci⁷.

2. Post-translační modifikace proteinů

Proteiny mohou být post-translačně modifikovány acetylací, methylací a ubiquitinací lysinů, methylací argininů, fosforylací či *N*-acetylglukosaminací serinů, threoninů a tyrosinů, ADP-ribosylací argininů, lysinů a glutamových kyselin či isomerizací prolinů⁵. Post-translační modifikace mají vliv na expresi a stabilitu proteinů a slouží jako signál v případě poškození DNA či jako signál pro další post-translační modifikace⁸.

2.1. Acetylace

Acetylace a deacetylace proteinů je velmi dynamický proces, který dokáže rychle reagovat na nastalé změny v organismu, a proto má tato modifikace zásadní vliv na okamžité transkripční umlčování genů a tím expresi proteinů⁸. Vliv acetylace na transkripci genů byl poprvé popsán již v roce 1964 Vincentem Allfreyem⁹.

K acetylaci dochází pomocí histonových acetyltransferas (HAT), které přenášejí acetyl z acetylkoenzymu A na ε-amino skupinu lysinu, a k deacetylaci pomocí histonových deacetylase (HDAC). Původně se za substráty HAT a HDAC považovaly pouze histony, ale dnes je známo, že tyto enzymy katalyzují acetylačně-deacetylační reakce i u celé řady proteinů nehistonové povahy¹.

Vliv acetylace ε-lysinových konců proteinů na transkripční umlčování genů se u histonů zpočátku vysvětloval neutralizací kladného náboje těchto lysinových konců a tím zamezením interakce se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA vedoucí k rozvolnění struktury chromatinu, vzniku euchromatinu a zpřístupnění jeho DNA

transkripci^{2,8}. Nedávno byla vytvořena nová teorie, podle které má na umlčování genů vliv spíše dynamika celého procesu acetylace a následné deacetylace, a že HAT a HDAC fungují v tomto procesu současně⁸.

2.1.2. Histonové deacetylasy

HDAC jsou enzymy, evolučně zakonzervované v genomu řady organismů od bakterií až po člověka¹⁰. Lidské HDAC se dělí do čtyř skupin v závislosti na podobnosti jejich sekvence a typu kofaktoru. První 3 skupiny jsou klasifikovány dle podobnosti deacetylase s určitými typy histonových deacetylase izolovaných z kvasinek, s Rpd3 proteinem (třída I), Hda1 proteinem (třída II) a Sir2 proteinem (třída III, sirtuiny)¹. Nedávno objevený HDAC11 enzym je jediným zástupcem HDAC třídy IV, neboť podobnost jeho sekvence se sekvencemi ostatních HDAC třídy I a II není dostatečná¹¹. Funkce HDAC třídy I, II a IV je závislá na přítomnosti zinku jako kofaktoru, na rozdíl od funkce sirtuinů, která je závislá na přítomnosti NAD⁺ (cit.¹¹). HDAC třídy I, II a IV deacetyluje převážně histonové proteiny, na rozdíl od sirtuinů, jejichž substráty jsou především proteiny nehistonové povahy⁶.

3. Sirtuiny (SIR)

3.1. Deacetylační aktivita SIR

Sirtuiny (Silent information regulators, SIR) jsou specifickou skupinou HDAC, neboť vyžadují k hydrolýze přítomnost NAD⁺. Deacetylaci ε-acetyllysinových zbytků proteinů pomocí SIR vzniká z NAD⁺ nikotinamid (NAM) a nový metabolit, acetylovaná adenosin difosforibosa (OAADPR)^{10,12,13}.

Během deacetylace dochází na NAD⁺ k nukleofilnímu útoku uhlíku C1' ribosy kyslíkem acetylové skupiny proteinu za vzniku α-1'-*O*-alkylamidátového meziproductu a uvolnění NAM (Schéma 1). Tento mechanismus byl potvrzen pomocí CH₃C¹⁸O značených proteinů, díky nimž bylo prokázáno, že ¹⁸O tvoří u produktu 1'-¹⁸OH skupinu¹³. Zda tento nukleofilní útok probíhá S_N1 nebo S_N2 mechanismem není zatím zcela jasné¹⁰. Následně po vzniku α-1'-*O*-alkylamidátového meziproductu je 2'-hydroxylová skupina ribosy tohoto meziproductu aktivována přes 3'-OH blízkým histidinem a atakuje uhlík alkylamidátu za vzniku 1',2'-cyklického intermediátu. Z něho pak po adici vody (poskytuje kyslík CO skupiny acetylu produktu) a eliminaci deacetylovaného proteinu vzniká 2'-*O*-acetyl-adenosin difosforibosa (2'-OAADPR), která okamžitě prochází neenzymovou konverzí na ekvimolární směs 2'-OAADPR (1) a 3'-OAADPR (2)^{10,13}.

3.2. Další reakce katalyzované SIR

Některé SIR katalyzují kromě deacetylace i další post-translační modifikace, a to ADP-ribosylace a deacetylační reakce.

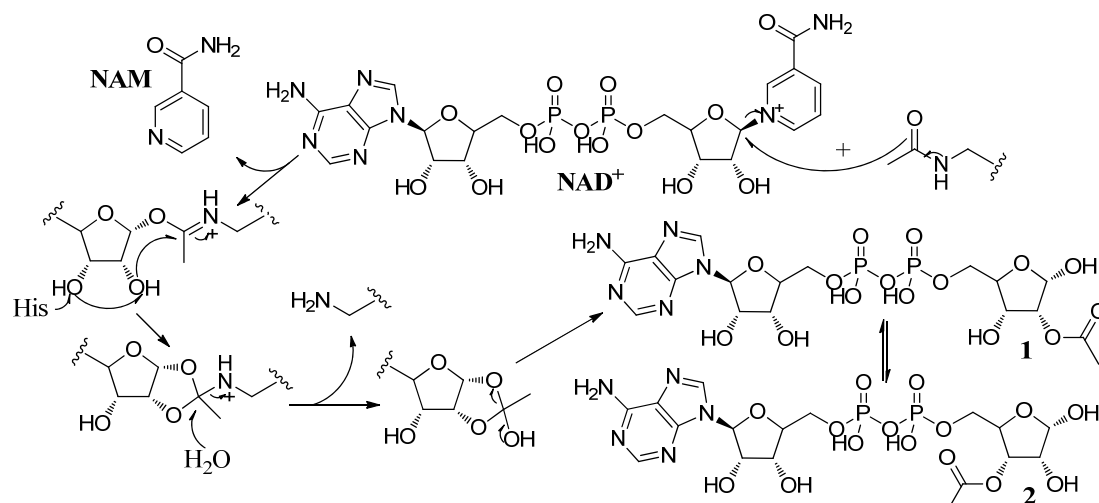


Schéma 1. Mechanismus deacetylace proteinů sirtuiny

ADP-ribosylační aktivita byla objevena u lidských homologů SIR, SIRT4 a SIRT6. Tato reakce je spojena s přenosem ADP-ribosy z NAD^+ na molekulu proteinu. ADP-ribosylací se zvyšuje negativní náboj proteinu, čímž může být ovlivněna jeho enzymová aktivita nebo schopnost interagovat s jinými proteiny¹⁰.

Deacylační reakce probíhají stejným mechanismem jako deacetylační. Bylo prokázáno, že z deacylačních reakcí probíhají u lidských homologů SIRT1-3 depropionylace a debutrylace, u homologue SIRT5 demalonylace a desukcinylace a u PfSir2, homologue parazita *Plasmodium falciparum* způsobujícího malárii, demyristoylace¹⁴.

Je možné, že další, zatím neznámé, specifické acylační modifikace by mohly být deacylovány konkrétními homology SIR enzymů, pro něž acetylované substráty dosud nebyly identifikovány, jako například pro SIRT4.

3.3. SIR v buněčných procesech

3.3.1. Omezení příjmu kalorií (CR)

Vzhledem k tomu, že aktivita SIR přímo závisí na dostupném množství NAD^+ , které hraje klíčovou roli v buněčném metabolismu a produkci energie, je i funkce SIR spojena s těmito procesy. Pozornost se na SIR obrátila zejména díky zjištění, že SIR jsou odpovědné za prodloužení života buněk vyvolaného omezením příjmu kalorií (calorie restriction, CR)^{15,16}. CR je charakterizována sníženým příjmem glukosy, čímž dochází ke zpomalení metabolismu a snížení produkce ROS¹⁷. Při metabolismu glukosy dochází k její glykolýze na pyruvát, přičemž se NAD^+ redukuje na NADH ¹⁴. Protože během CR se příjem glukosy snižuje, snižuje se buněčná koncentrace NADH , zvyšuje se poměr NAD^+/NADH a aktivují se SIR¹⁵. CR je tak pomocí SIR spouštěčem buněčných procesů vedoucích ke zvýšení odolnosti buněk vůči stresu a poškození DNA

a tím zpomalení stárnutí a vzniku chorob spojených se stářím, jako jsou diabetes typu II, obezita, neurodegenerativní poruchy, srdeční selhání nebo rakovina.

3.3.2. Volné kyslíkaté radikály (ROS)

Akumulace ROS ($\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$), vedlejších produktů buněčného dýchání, během let je považována za hlavní příčinu stárnutí. Proti ROS působí celá řada enzymů, jako jsou dismutasy, katalasy, peroxidasy, i celá řada antioxidantů, jako jsou vitaminy C a E. Přesto ROS mohou způsobit poškození buňky, oxidativním poškozením makromolekul včetně DNA, a to zejména v mitochondriích, které jsou hlavním producentem ROS a vyprodukují až 90 % všech ROS organismu¹⁷. Z orgánů produkuje nejvíce ROS mozek, kde tyto reaktivní molekuly způsobují vznik neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova choroba nebo roztroušená skleróza¹⁷.

Během zvýšené produkce nebo kumulace ROS se aktivují SIR, které jsou schopné ROS detoxikovat a snižovat tak oxidativní stres aktivací enzymů, jako je superoxid dismutasa MnSOD nebo antioxidantů jako je redukovaný glutathion¹⁷.

3.4. Jednotlivé lidské homology SIR a jejich funkce

Sirtuinů existuje u kvasinek pět homologů (ySir2, HST1-4) a u lidí sedm homologů (SIRT1-7). První objevený SIR enzym byl právě ySir2 u kvasinek¹⁸. Jednotlivé homology SIR se nacházejí v různých částech buňky a deacetylují různé substráty, čímž ovlivňují řadu buněčných funkcí (tab. I). Zároveň je ale aktivita jednotlivých SIR často závislá na aktivitě ostatních SIR, jak plyne z následujícího textu.

SIRT1 je 110kDa proteinem a nejvíce studovaným lidským homologem. SIRT1 se nachází v jádře nebo cyto-

Tabulka I
Substráty jednotlivých SIR homologů a důsledky jejich deacetylace

Sirtuin	Substrát	Aktivita ^a	Funkce	Vliv na nemoci	Lit.
SIRT1	p53/p73	↓	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	27
	Ku-70	↑	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	28
	FOXO	↑↓	indukce inhibice p53/Ku-70	pro-rakovinné účinky	1
	AcCS1	↑	regul. synt. mastných kys. a lipidů	snižuje riziko obezity	20
	HMGCS1	↑	regulace syntézy cholesterolu	snižuje riziko obezity	20
	LXR	↑	regulace syntézy cholesterolu	snižuje riziko obezity	21
	FXR	↓	zvýšení vylučování žlučových kys.	snižuje riziko obezity	22
	PPAR γ	↓	regulace ukládání tuků	snižuje riziko obezity	23
	UCP2	↓	zvýšení sekrece inzulinu	snižuje riziko obezity	24
	α -sekretasa	↑	snížení prod. a oligomerizace A β	snižuje riziko AD	17
	PGC-1 α	↑	udržování stálé hladiny glukosy	snižuje riziko srdečních chorob	25
	MnSOD	↑	aktivace detoxikace ROS	snižuje riziko srdečních chorob	19
	eNOS	↑	zvýšení produkce NO	snižuje riziko srdečních chorob	26
	H3K9, H4K16	–	regulace umlčování genů	–	18
SIRT2	α -tubulin	–	inhibice migrace gliomů v mozku	protirakovinné účinky	29
	FOXO3a	↑	aktivace MnSOD a detoxikace ROS	protirakovinné účinky	31
	H4K16	–	stabilizace chromatinu	protirakovinné účinky	30
SIRT3	CypD	↓	inh. metab. glukosy u nádor. buněk	protirakovinné účinky	40
	HIF1 α	↓	inh. vývoje rakoviny tlustého střeva	protirakovinné účinky	41
	SOD2/MnSOD	↑	aktivace detoxikace ROS	snižuje riziko chorob spoj. se stářím	34
	IDH2	↑	prod. red. glutathionu a detox. ROS	snižuje riziko chorob spoj. se stářím	35
	Komplex I	↑	regulace oxidativní fosforylace	snižuje riziko obezity	36
	SDH	↑	regulace oxidativní fosforylace	snižuje riziko obezity	38
	AcCS2	↑	zvýšení produkce AcCoA a ATP	snižuje riziko obezity	20
	HMGCS2	↑	regulace syntézy ketonů	snižuje riziko obezity	20
	LCAD	↑	zvýšení produkce AcCoA a ATP	snižuje riziko obezity	37
SIRT4	GDH	↑	zvýšení sekrece inzulinu	snižuje riziko diabetu	35
	GDH	↓	snížení sekrece inzulinu	zvyšuje riziko diabetu	39
SIRT5	CPS1	↑	zvýšení detoxikace amoniaku	snižuje riziko neurodegen. poruch	43
SIRT6	p53/p73	↑	stimulace apoptózy nádor. buněk	protirakovinné účinky	45
	H3K9	–	aktiv. oprav DNA, stab.chromatinu	protirakovinné účinky	44
	NF- κ B	↓	aktivace protizánětlivých faktorů	protirakovinné účinky	44
SIRT7	H3K18	–	zvýšení proliferace nádor. buněk	pro-rakovinné účinky	47
	RNAPol I	↓	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	46

^a ↑ substrát je deacetylací aktivován, ↓ substrát je deacetylací inhibován

plasmě v závislosti na typu buňky a přesunuje se mezi těmito dvěma buněčnými prostory v závislosti na stresu, kterému je buňka vystavena. Fosforylace SIRT1 pomocí JNK1 kinasy (c-Jun N-terminal kinase 1) zajišťuje jeho přemístění do jádra¹⁹.

SIRT1 deacetyluje celou řadu nehistonových proteinů, jako jsou p53, FOXO, NF- κ B, Ku-70, eNOS a jiné^{7,15}. Seznam proteinů, které jsou substrátem pro SIRT1, se

neustále rozšiřuje. Tyto proteiny ovlivňují celou řadu buněčných funkcí, jako je odolnost vůči stresu, protizánětlivé účinky, biogeneze mitochondrií, metabolismus glukosy a lipidů apod.¹².

SIRT1 ovlivňuje transkripční umlčování genů deacetylací lysinů 9 a 14 histonu H3 (H3K9, H3K14) a lysinu 16 histonu H4 (H4K16)¹⁸.

Zvýšená exprese SIRT1 snižuje riziko obezity, neboť

v játrech moduluje aktivitu AceCS1 (acetyl-CoA syntetasa 1), enzymu produkujícího acetyl-CoA pro syntézu mastných kyselin a lipidů²⁰, aktivitu enzymu HMGCS1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa 1) regulujícího syntézu cholesterolu²⁰, aktivitu nukleárních faktorů LXR (liver-X-receptor) a FXR (farnesol-X-receptor), které jsou důležitými senzory koncentrace cholesterolu a žlučových kyselin^{21,22}, či aktivitu nukleárního receptoru PPAR γ , hlavního modulatoru ukládání tuků²³. SIRT1 brání i vzniku diabetu typu II inhibicí transkripce proteinu UCP2 (*uncoupling protein 2*), čímž zvyšuje toleranci glukosy β -buňkami slinivky a pozitivně tak reguluje sekreci inzulínu²⁴.

Zvýšená exprese SIRT1 v mozku zase chrání neurony a neurity (axony), které zajišťují komunikaci neuronů, před ischemickým poškozením⁷. Správná funkce SIRT1 je tak důležitá pro správné fungování mozku, schopnosti učení, a paměti.

Zvýšená exprese SIRT1 má vliv i na vznik a vývoj neurodegenerativních poruch. U Huntingtonovy choroby je zvýšená exprese SIRT1 nežádoucí, a proto v současné době prochází selektivní inhibitor SIRT1, EX-527, první fázi klinického testování⁷. U Alzheimerovy choroby naopak zvýšená exprese SIRT1 brání produkci a oligomerizaci Amyloidu- β (A β , oligomerizovaný A β je toxický pro neurony) tím, že zvyšuje expresi α -sekretasy, která zajišťuje správné štěpení prekursoru amyloid proteinu¹⁷.

Proti srdečním chorobám působí SIRT1 aktivací enzymů detoxikujících ROS a udržováním stálé hladiny glukosy. Zvýšená exprese SIRT1 vyvolává zvýšenou funkci dismutasu (MnSOD)¹⁹ a aktivaci transkripčního koaktivátoru PGC-1 α indukujícího glukoneogenezi a zvyšujícího oxidaci mastných kyselin²⁵. SIRT1 je důležitý také pro zachování rovnováhy endoteliálních buněk, které produkují NO pomocí eNOS a podněcují vasodilataci. ROS oxidují NO na toxický peroxynitrit (ONO₂⁻), který eNOS inhibuje. SIRT1 aktivuje eNOS jeho deacetylací na lysinu 496 a 506, čímž zvyšuje produkci NO, rozšiřuje cévy a snižuje riziko kornatění tepen a infarktu²⁶.

Úloha SIRT1 v prevenci rakoviny není zcela jasná. Je známo, že CR, která aktivuje SIR, vede u organismů ke snížení výskytu rakoviny. Na druhou stranu, zvýšená exprese SIRT1 je spojena se zvýšeným výskytem rakoviny vlivem inhibice transkripčních faktorů p53 či Ku-70, které vyvolávají apoptózu nádorových buněk^{27,28}. SIRT1 inhibuje proapoptotické faktory p53, p73, Ku-70, Bim nebo Puma buď přímou deacetylací nebo deacetylací FOXO proteinů^{1,6}. Se zvýšenou expresí SIRT1 se lze setkat u celé řady typů rakoviny, jako je např. rakovina prostaty, stěv, plic, kůže nebo leukémie⁶. Z tohoto důvodu byla velká pozornost zaměřena na výzkum inhibitorů SIRT1 jako potenciálních protirakovinných látek.

SIRT2 se nachází v cytoplasmě i jádře a jeho hlavním substrátem je α -tubulin, který SIRT2 deacetyluje na Lys-40 (cit.²⁹). SIRT2 má vliv na buněčný cyklus, během jehož G2/M fáze se přemísťuje z cytoplasmy do jádra, kde se váže na chromatin a deacetyluje H4K16, čímž chromatin stabilizuje³⁰. Stabilizaci chromatinu zabraňuje SIRT2

vzniku nádorů, jako jsou gliomy, které jsou charakteristické destabilizací chromatinu⁶. Na druhou stranu, schopnost SIRT2 deacetylovat α -tubulin vyvolává u některých typů nádorů rezistenci vůči chemoterapeutikům, zejména paklitaxelu, který je inhibitorem mikrotubulů⁶.

Mezi substráty SIRT2 patří i některé transkripční faktory, které jsou zároveň substrátem i pro SIRT1, mezi ně patří p53, NF- κ B a FOXO skupina proteinů. Například deacetylací FOXO3a aktivuje SIRT2 dismutasu MnSOD a působí tak proti genotoxickému a oxidativnímu stresu a snižuje množství ROS v buňkách³¹.

Zvýšenou expresi SIRT2 lze pozorovat především v mozku, v oligodendrocytech, gliových buňkách produkujících myelin, kde SIRT2 hraje klíčovou roli při vzniku myelinové pochvy, obalu neuronů, který zodpovídá za správnou funkci nervové soustavy³². Schopnost SIRT2 deacetylovat α -tubulin ovlivňuje také diferenciaci oligodendrocytů, hybnost neuronů, prodlužování neuritů a migraci buněk gliomů, čímž zabraňuje jejich šíření v mozku³².

SIRT3 je lokalizován v mitochondriích, buněčných organelách ovlivňujících energetický metabolismus buněk, apoptózu a stárnutí buněk³³, kde SIRT3 ovlivňuje detoxikaci ROS a snižuje tak riziko poškození makromolekul oxidativním stresem. SIRT3 aktivuje SOD2 gen, který aktivuje dismutasu MnSOD, jeho deacetylací na lysinech 53 a 89 (cit.³⁴). SIRT3 zvyšuje produkci redukovaného glutathionu, přirozeného antioxidantu, deacetylací a aktivací isocitrát dehydrogenasy 2 (IDH2)³⁵. SIRT3 také zabraňuje produkci ROS deacetylací částí komplexu I, který se účastní přenosu elektronů v dýchacím řetězci³⁶.

SIRT3 snižuje riziko obezity, neboť ovlivňuje acetylaci enzymů Krebsova cyklu nebo enzymů, které Krebsův cyklus nepřímou ovlivňují, jako je acetyl-CoA syntetasa 2 (AceCS2)²⁰, dehydrogenasa dlouhých acyl-CoA (LCAD) (cit.³⁷), sukcinát dehydrogenasa (SDH)³⁸, či 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa 2 (HMGCS2)²⁰, které regulují buněčné dýchání, tedy oxidativní fosforylaci a produkci ATP³³.

SIRT3 také působí proti vzniku diabetu typu II deacetylací a aktivací glutamát dehydrogenasy (GDH), čímž zvyšuje sekreci inzulínu³⁵. SIRT3 tak funguje opačně než SIRT4, který GDH inhibuje ADP-ribosylací³⁹. To také odpovídá tomu, že exprese SIRT3 při CR stoupá, kdežto exprese SIRT4 klesá.

SIRT3 také ovlivňuje metabolismus nádorových buněk. Nádorové buňky vykazují specifický metabolismus, kdy je u nich aktivována hexokinasa II, která zvyšuje glykolýzu a snižuje oxidativní fosforylaci (Warburg effect). SIRT3 deacetyluje cyklofilin D (cypD), který zabraňuje interakci hexokinasy II s aniontovým kanálem a tím zamezuje její schopnosti využívat ATP pro glykolýzu⁴⁰. Zvýšená exprese SIRT3 také inhibuje vznik rakoviny tlustého střeva nebo osteosarkomu inhibicí exprese HIF1 α (cit.⁴¹). HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) je kódován onkogénem a aktivuje transkripci genů spojených se vznikem nádorů a metastáz³³.

SIRT4 je také mitochondriální sirtuin. SIRT4 je scho-

pen ADP-ribosylace, ale jeho deacetylační aktivita nebyla prokázána. SIRT4 ADP-ribosyluje GDH a tato ADP-ribosylace vede k inhibici GDH, snížení sekrece inzulinu v β -buňkách slinivky a zvýšení rizika vzniku diabetu typu II (cit.³⁹).

SIRT4 je také negativním regulátorem oxidace mastných kyselin a tím metabolismu tuků v hepatocytech. Aktivita SIRT1 je důležitá pro schopnost SIRT4 regulovat oxidaci mastných kyselin, neboť aktivací SIRT4 se snižuje aktivita SIRT1 a tím i oxidace mastných kyselin⁴².

SIRT5 je také mitochondriální protein, který upřednostňuje záporně nabitě acyllysinové zbytky (malonyl či sukcinyl) jako své substráty¹⁴. SIRT5 např. desukcinyluje lysin 1291 enzymu karbamoyl fosfát syntetasy (CPS1), který katalyzuje úvodní krok močovinného cyklu, v němž se v organismu detoxikuje amoniak⁴³. Z toho, že SIRT5 je enzymem specificky regulujícím sukcinylaci a malonylaci proteinů vyplývá, že tyto modifikace mohou mít důležitý vliv na regulaci buněčných procesů.

Deacetylační aktivita SIRT5 byla prokázána pouze u cytochromu c, přenašeče elektronů při buněčném dýchání, ale přesný důsledek této deacetylce není znám³⁵.

SIRT6 je 36kDa protein lokalizovaný v jádře, kde je převážně vázán na chromatin¹⁵. Kromě auto-ADP-ribosylace je schopen také deacetylce. Deacetyluje například H3K9, a to po navázání se na nukleární faktor NF- κ B, a zabráňuje tak vazbě tohoto faktoru na chromatin⁴⁴. SIRT6 tak ovlivňuje expresi cílových genů tohoto faktoru, které jsou důležité pro apoptózu buněk vlivem genotoxického a oxidativního stresu⁶.

Zvýšená exprese SIRT6 v nádorových buňkách působí protirakovinně, neboť aktivuje pro-apoptotické faktory p53 a p73 a stimuluje tak apoptózu nádorových buněk, přičemž u normálních buněk k tomuto jevu nedochází⁴⁵. Bylo prokázáno, že na tento jev má vliv ADP-ribosylační

aktivita SIRT6 a nikoliv jeho deacetylační aktivita.

SIRT7 se nachází v jádru a ovlivňuje transkripci ribosomálních DNA genů vazbou na RNA Polymerasu I (cit.⁴⁶).

SIRT7 ovlivňuje také vývoj rakoviny, a to tím, že specificky deacetyluje lysin 18 histonu H3 (H3K18). Tato jeho funkce podněcuje proliferaci nádorových buněk. Volný H3K18 se totiž vyskytuje u agresivních typů rakoviny se špatnou prognózou pro pacienty a je spojen s epigenetickou změnou buněk způsobenou virovými onkogeny⁴⁷.

3.5. Regulace SIR aktivity

3.5.1. Post-translační modifikace

V rámci post-translační modifikace je aktivita SIR enzymů ovlivňována fosforylací jejich serinových a tyrosinových zbytků a sumoylací (small ubiquitin-like modifiers) lysinových zbytků. Například SIRT2 je fosforylován na Ser-368 a Ser-331, a tato fosforylace vede k inhibici jeho deacetylasové aktivity¹³. Naopak, fosforylace SIRT1 na Ser-27, Ser-47 a Thr-530 JNK1 kinasou vede k aktivaci jeho deacetylasové aktivity stejně jako jeho sumoylace na Lys-734 (cit.^{7,13}).

3.5.2. Aktivátory SIR

Aktivitu SIR může ovlivňovat řada sloučenin. Ze všech homologů SIR enzymů byly ale pouze u SIRT1 identifikovány jeho aktivátory (Schéma 2). Nejprostudovanějším aktivátorem SIRT1 je polyfenol resveratrol⁴⁸. Aktivací SIRT1 pomocí resveratrolu bylo například dosaženo prodloužení života u myši s vysokým příjmem kalorií. Resveratrol může ovlivňovat funkci SIRT1 buď přímo vazbou na SIRT1 nebo nepřímo aktivací AMPK (cit.^{12,48}).

Mezi aktivátory SIRT1 se řadí také syntetické molekuly SRT2183, SRT1460 a SRT1720, vyvinuté společnos-

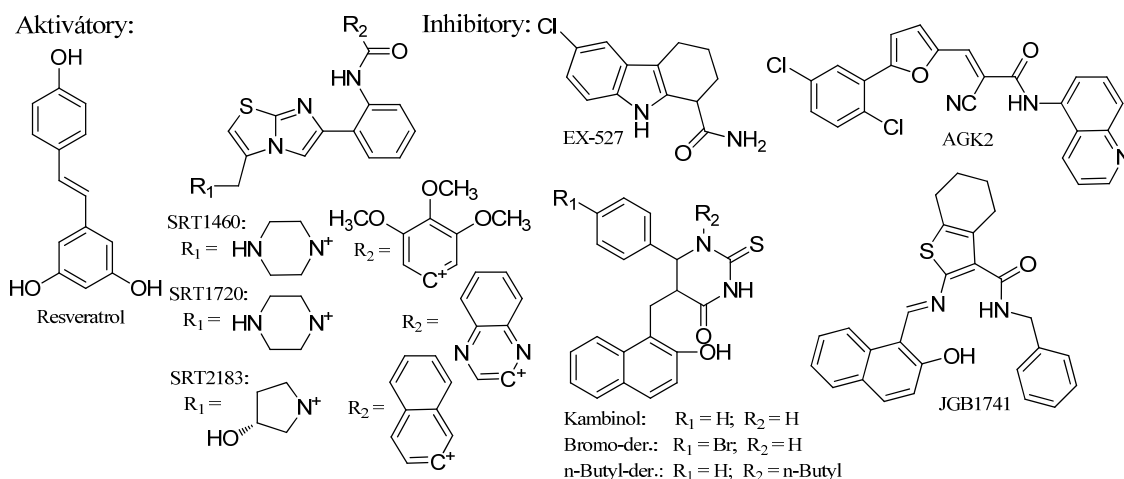


Schéma 2. Aktivátory a inhibitory SIR enzymů

tí Sirtris Pharmaceuticals, které aktivují SIRT1 zvýšením jeho schopnosti vázat acetylovaný substrát^{12,48}. Tyto látky jsou asi 1000× účinnější při aktivaci SIRT1 než resveratrol. Zároveň jsou tyto látky selektivní vůči SIRT1.

3.5.3. Inhibitory SIR

Hlavním inhibitorem SIR aktivity je produkt jejich deacetylační reakce, nikotinamid. Syntetické inhibitory SIR (Schéma 2) jsou zpravidla testovány pouze na aktivitu vůči SIRT1 a SIRT2, proto pro ostatní SIR není mnoho inhibitorů známo⁴⁹.

U inhibitorů je důležitá jejich selektivita. Selektivním inhibitorem SIRT1 je například derivát sirtinolu, JGB1741, který je schopen inhibovat proliferaci a indukovat apoptózu buněk rakoviny prsu, MDA-MB231 (cit.⁵⁰). Modifikacemi základní struktury neselektivního inhibitoru kambinolu byly připraveny bromo-derivát selektivní vůči SIRT1 a *N*-butyl-derivát selektivní vůči SIRT2 (cit.⁴⁹). Mezi selektivní inhibitory SIRT2 patří také inhibitor AGK2, který byl účinný proti Parkinsonově chorobě⁴⁹. Deriváty přirozených substrátů SIRT5, thiosukcinylované peptidy, jsou selektivními inhibitory SIRT5, neboť tvoří stabilní 1'-*S*-sukcinylimidáty nepodléhající dalšímu nukleofilnímu ataku⁵¹. Selektivní inhibitory dalších SIR nejsou známy.

4. Závěr

Sirtuiny jsou velice důležité enzymy regulující transkripci genů a zásadní buněčné funkce, jako je vývoj, stárnutí a apoptóza buněk a schopnost buněk odolávat stresu a poškození DNA. Spojení funkce sirtuinů se stechiometrickou spotřebou NAD⁺, molekuly, která je klíčovým kofaktorem v energetických metabolických pochodech a prekurzorem řady signálních molekul, připisuje sirtuinům jedinečnou pozici v buněčných procesech. Produkt reakce sirtuinů, OAADPR, může být také důležitou signální molekulou, přestože její přesná biologická funkce není doposud známa. Sirtuiny jsou důležité modulatory výskytu a vývoje metabolických a neurodegenerativních poruch a nádorových onemocnění. Selektivní ovlivnění aktivity jednotlivých sirtuinů jejich aktivátory či inhibitory tak může vést k léčbě těchto nemocí.

Autoři děkují za podporu projektu ME08070 od MŠMT České republiky.

Seznam symbolů

Aβ	amyloid-β
AceCS	acetyl-CoA syntetasa
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
CPS1	karbamoyl fosfát syntetasa 1
CR	omezení příjmu kalorií (calorie restriction)
cypD	cyklofilin D
eNOS	endoteliální NO syntasa
FOXO	forkhead box O proteiny
FXR	farnesol-X-receptor

GDH	glutamát dehydrogenasa
HAT	histonové acetyltransferasy
HDAC	histonové deacetylasy
HIF1α	hypoxií indukovaný faktor 1α
HMGCS	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa
IDH2	isocitrát dehydrogenasa 2
JNK1	c-Jun <i>N</i> -terminální kinasa 1
LCAD	dehydrogenasa dlouhých acyl-CoA (long-chain acyl-CoA dehydrogenase)
LXR	liver-X-receptor
MnSOD	manganová superoxid dismutasa
NAM	nikotinamid
NF-κB	nukleární faktor kappa B
OAADPR	acetylovaná adenosin difosforibosa
PARP1	poly-(ADP-ribosyl) polymerasa 1
PGC-1α	PPAR-gamma koaktivátor-1α
PPARα-γ	peroxisomální proliferací-aktivované receptory
ROS	volné kyslíkaté radikály (reactive oxygen species)
SIR	sirtuiny
SDH	sukcinát dehydrogenasa
UCP2	uncoupling protein 2

LITERATURA

- Rajendran R., Garva R., Krstic-Demonacos M., Demonacos C.: *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 368276.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4. vyd. Garland Science, New York 2002.
- Zlatanova J., Leuba S. H., van Holde K.: *Biophys. J.* 74, 2554 (1998).
- Heitz E.: *Jahrb. Wiss. Bot.* 69, 762 (1928).
- Bannister A. J., Kouzarides T.: *Cell Res.* 21, 381 (2011).
- Olmos Y., Brosens J. J., Lam E. W. F.: *Drug Resist. Updates* 14, 35 (2011).
- Zhang F., Wang S., Gan L., Vosler P. S., Gao Y., Zigmond M. J., Chen J.: *Prog. Neurobiol.* 95, 373 (2011).
- Clayton A. L., Hazzalin C. A., Mahadevan L. C.: *Mol. Cell* 23, 289 (2006).
- Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 51, 786 (1964).
- Sauve A. A.: *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1804, 1591 (2010).
- de Ruijter A. J. M., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S., van Kuilenburg A. B. P.: *Biochem. J.* 370, 737 (2003).
- Dittenhafer-Reed K. E., Feldman J. L., Denu J. M.: *ChemBioChem* 12, 281 (2011).
- Smith B. C., Hallows W. C., Denu J. M.: *Chem. Biol.* 15, 1002 (2008).
- Lin H., Su X., He B.: *ACS Chem. Biol.* 7, 947 (2012).
- Li X., Kazkan N.: *Int. J. Biol. Sci.* 7, 575 (2011).
- Qiu X., Brown K. V., Moran Y., Chen D.: *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1804, 1576 (2010).

17. Braidy N., Jayasena T., Poljak A., Sachdev P. S.: *Curr. Opin. Psychiatr.* 25, 226 (2012).
18. Imai S., Guarente L.: *Nature* 403, 795 (2000).
19. Tanno M., Kuno A., Horio Y., Miura T.: *Basic Res. Cardiol.* 107, 273 (2012).
20. Hirschey M. D., Shimazu T., Capra J. A., Pollard K. S., Verdin E.: *Aging* 3, 635 (2011).
21. Li X., Zhang S., Blander G., Tse J. G., Krieger M., Guarente L.: *Mol. Cell* 28, 91 (2007).
22. Kemper J. K., Xiao Z., Ponugoti B., Miao J., Fang S., Kanamalluru D., Tsang S., Wu S. Y., Chiang C. M., Veenstra T. D.: *Cell Metab.* 10, 392 (2009).
23. Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., de Oliveira R. M., Leid M., McBurney M. W., Guarente L.: *Nature* 429, 771 (2004).
24. Bordone L., Motta M. C., Picard F., Robinson A., Jhala U. S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlon E. J., Lin S. J., Guarente L.: *PLoS Biol.* 4, e31 (2006).
25. Nemoto S., Fergusson M. M., Finkel T.: *J. Biol. Chem.* 280, 16456 (2005).
26. Mattagajasingh I., Kim C. S., Naqvi A., Yamamori T., Hoffman T. A., Jung S. B., de Ricco J., Kasuno K., Irani K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 148555 (2007).
27. Luo J., Nicolaev A. Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W.: *Cell* 107, 137 (2001).
28. Jeong J., Juhn K., Lee H., Kim S. H., Min B. H., Lee K. M., Cho M. H., Park G. H., Lee K. H.: *Exp. Mol. Med.* 39, 8 (2007).
29. North B., Marshall B., Borra M., Denu J. M., Verdin E.: *Mol. Cell* 11, 437 (2003).
30. Vaquero A., Scher M. B., Lee D. H., Sutton A., Cheng H. L., Alt F. W., Serrano L., Sternglanz R., Reinberg D.: *Genes Dev.* 20, 1256 (2006).
31. Wang F., Nguyen M., Qin F. X., Tong Q.: *Aging Cell* 6, 505 (2007).
32. Harting K., Knoll B.: *Eur. J. Cell Biol.* 89, 262 (2010).
33. Giral A., Villarroya F.: *Biochem. J.* 444, 1 (2012).
34. Qiu X., Brown K., Hirschey M. D., Verdin E., Chen D.: *Cell Metab.* 12, 662 (2010).
35. Schlicker C., Gertz M., Papatheodorou P., Kachholz B., Becker C. F. W., Steegborn C.: *J. Mol. Biol.* 382, 790 (2008).
36. Ahn B. H., Kim H. S., Song S., Lee I. H., Liu J., Vasilopoulos A., Deng C. X., Finkel T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14447 (2008).
37. Hirschey M. D., Shimazu T., Goetzman E., Jing E., Schwer B., Lombard D. B., Grueter C. A., Harris C., Biddinger S., Ilkayeva O. R., Stevens R. D., Li Y., Saha A. K., Ruderman N. B., Bain J. R., Newgard C. B., Farese Jr. R. V., Alt F. W., Kahn C. R., Verdin E.: *Nature* 464, 121 (2010).
38. Cimen H., Han M. J., Yang Y., Tong Q., Koc H., Koc E. C.: *Biochemistry* 49, 304 (2010).
39. Haigis M. C., Mostoslavsky R., Haigis K. M., Fahie K., Christodoulou D. C., Murphy A. J., Valenzuela D. M., Yancopoulos G. D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T. A., Weindruch R., Alt F. W., Guarente L.: *Cell* 126, 941 (2006).
40. Shulga N., Wilson-Smith R., Pastorino J. G.: *J. Cell Sci.* 123, 894 (2010).
41. Bell E. L., Emerling B. M., Ricoult S. J., Guarente L.: *Oncogene* 30, 2986 (2011).
42. Nasrin N., Wu X., Fortier E., Feng Y., Bare O. C., Chen S., Ren X., Wu Z., Streeper R. S., Bordone L.: *J. Biol. Chem.* 285, 31995 (2010).
43. Nakagawa T., Lomb D. J., Haigis M. C., Guarente L.: *Cell* 137, 560 (2009).
44. Kawahara T. L. A., Michishita E., Adler A. S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R. A., Ongai-gui K. C. L., Boxer L. D., Chang H. Y., Chua K. F.: *Cell*, 136, 62 (2009).
45. van Meter M., Mao Z., Gorbunova V., Seluanov A.: *Cell Cycle* 10, 3153 (2011).
46. Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., Guarente L.: *Genes Dev.* 20, 1075 (2006).
47. Barber M. F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasseli L., Kioi M., Moqtaderi Z., Tennen R. I., Paredes S., Young N. L., Chen K., Struhl K., Garcia B. A., Gozani O., Li W., Chua K. F.: *Nature* 487, 114 (2012).
48. Camins A., Sureda F. X., Junyent F., Verdager E., Folch J., Pelegri C., Vilaplana J., Beas-Zarate C., Pallas M.: *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* 1799, 740 (2010).
49. Cen Y.: *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1804, 1635 (2010).
50. Kalle A. M., Mallika A., Badiger J., Alinakhi, Talukdar P., Sachchidanand: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 13 (2010).
51. He B., Du J., Lin H.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1922 (2012).

M. Dvořáková^{a,b}, M. Příbylová^a, and T. Vaněk^a

^(a) *Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^(b) *Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): Sirtuins – Histone Deacetylases Influencing Gene Transcription*

Sirtuins rank among class III histone deacetylases which deacetylate *N*^ε-acetyllysine residues in an unusual chemical reaction that consumes NAD⁺ and releases nicotinamide, the deacetylated substrate and a novel product, 2'-*O*-acetyladenosine diphosphoribose. Sirtuins influence a wide range of biological functions and are required for gene silencing. They are also responsible for lifespan extension by calorie restriction. Their mechanism of action, means of modulating their activity and enzymatic targets, with the focus on age-related diseases, are discussed.

ALKALOIDY ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

MARKÉTA DALECKÁ^a, RADIM HAVELEK^a,
KAREL KRÁLOVEC^a, LENKA BRŮČKOVÁ^a
a LUCIE CAHLÍKOVÁ^b

^a Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, ^b Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

dalecka.marketa@seznam.cz, radim.havelek@upce.cz,
karel.kralovec@upce.cz, lenka.bruckova@upce.cz,
cahlikova@faf.cuni.cz

Došlo 19.7.13, přijato 9.8.13.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, protinádorová aktivita, indukce apoptózy

Obsah

1. Úvod
2. Biologická a protinádorová aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae
 - 2.1. Lykorinový typ
 - 2.2. Homolykorinový typ
 - 2.3. Haemanthaminový a krinanový typ
 - 2.4. Tazettinový typ
 - 2.5. Pankratistatinový typ
 - 2.6. Galanthaminový typ
3. Závěr

1. Úvod

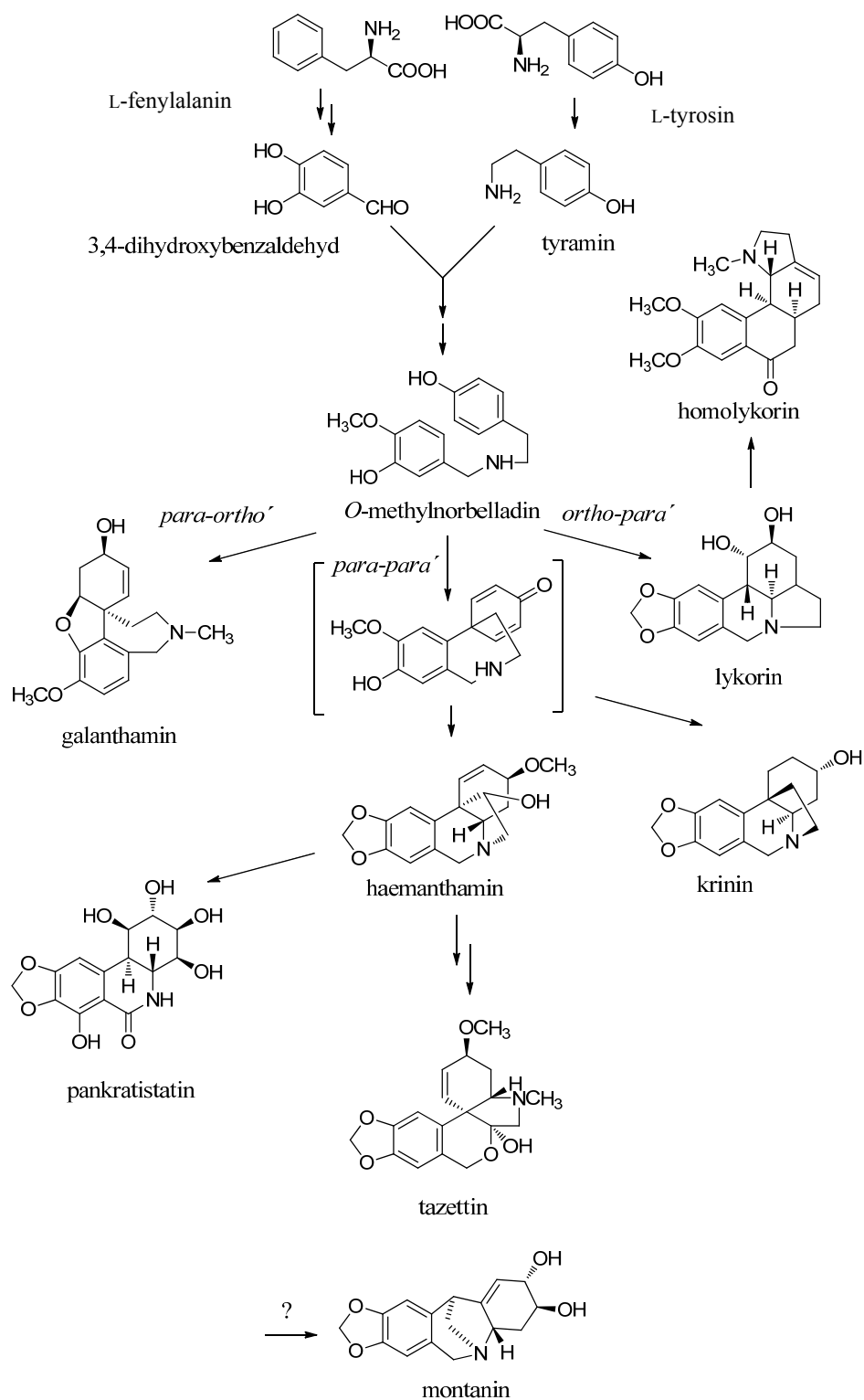
Rostliny čeledi Amaryllidaceae (Amarylkovité) jsou cibulovité krytosemenné rostliny, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky a zároveň jsou hojně pěstovány k okrasným účelům. Zástupce v podobě narcisů (*Narcissus*), bledulí (*Leucojum*) a sněženek (*Galanthus*) je možno nalézt i v České republice. Čeleď zahrnuje více než 1000 druhů rostlin klasifikovaných do 65 rodů¹. V poslední době je této čeledi věnována vědeckou komunitou pozornost díky obsahu biologicky cenných alkaloidů rozmanité chemické struktury a biologického účinku. První dokumentované lékařské využití rostlin z čeledi Amaryllidaceae se datuje do doby působení Hippokrata z Kóu, který již ve 4. století před Kristem použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus*

na bázi olejové emulze k léčbě nádorů v oblasti dělohy². Do dnešní doby bylo izolováno a strukturně popsáno na 500 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě, nebo ve skupinách napříč celou čeledí Amaryllidaceae. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak v nejvyšším množství je najdeme v cibuli. Řada z izolovaných alkaloidů má výrazné účinky na aktivitu fyziologicky významných enzymů, byla rovněž prokázána aktivita antibakteriální a antivirotická. V čeledi najdeme také mnoho zástupců s účinkem cytotoxickým k eukaryotickým buňkám a to nejen k buňkám zdravým, ale především nádorově transformovaným. Kromě rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo mnoho biologicky významných alkaloidů nalezeno také u řady druhů čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Mezi nevýznamnější patří benzofenanthridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin, které vykazují široké spektrum biologických aktivit, včetně významných proapoptotických a protinádorových účinků³.

Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. L-Tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-O-methylnorbelladin. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány dle svého hlavního reprezentanta. Jmenovitě se jedná o lykorinový (lykorin), galantaminový (galantamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin) a krinanový (krinin) typ^{4,5}. Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému (montanin) strukturnímu typu nebyla doposud spolehlivě vysvětlena⁶. K hlavním typům je také řazen belladinový typ (O-methylbelladin), ze kterého vychází vlastní biosyntéza amarylkovitých alkaloidů (obr. 1, cit.^{4,7}). Dle strukturních odlišností se alkaloidy řadí do devíti základních skupin. Na základě této klasifikace má každá skupina svého reprezentanta, kterými jsou: lykorin, krinin, haemanthamin, pankratistatin, galanthamin, tazettin, homolykorin, montanin a norbelladin⁴. Dle těchto základních struktur je pojmenována celá skupina alkaloidů.

2. Biologická a protinádorová aktivita alkaloidů Amaryllidaceae

Mezi jeden z nejvýznamnějších účinků alkaloidů čeledi Amaryllidaceae patří jejich protinádorová aktivita indukci apoptózy^{2,8,9}. Výraznou výhodou je navíc jejich vysoká selektivita pro nádorové buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům buněk zdravých nebo buněk klidových^{10,11}. Účinek jednotlivých alkaloidů je závislý především na jejich struktuře. Velmi prospěšnou vlastností je



Obr. 1. Biosyntetická cesta hlavních strukturních typů amaryllidových alkaloidů

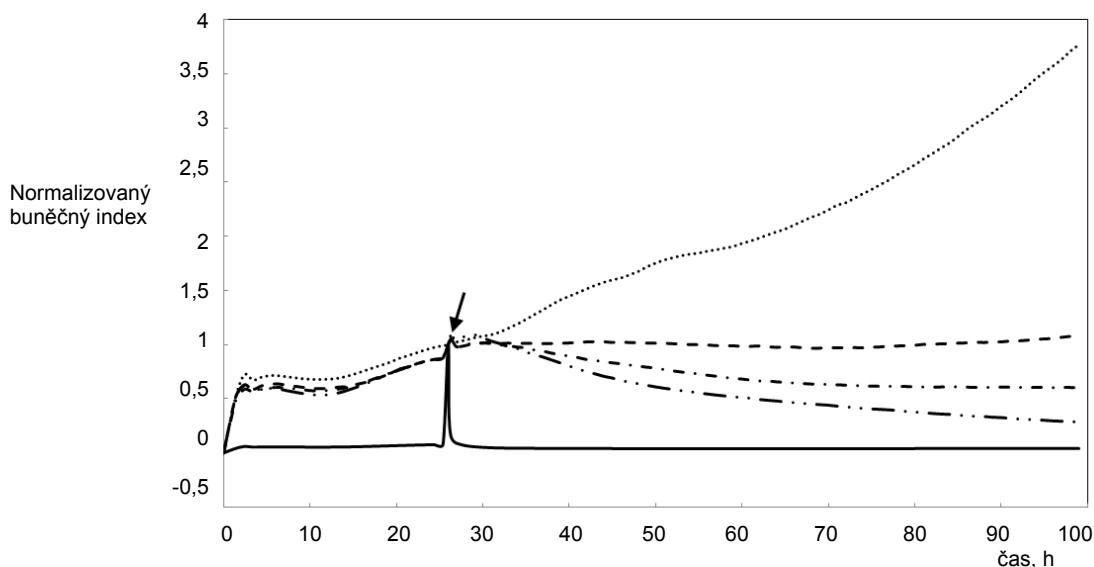
schopnost inhibovat činnost enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy^{12–14}. Aplikace inhibitorů cholinesteras je dnes nejužívanější postup v terapii Alzheimerovy choroby (AD). Hledání nových účinnějších inhibitorů je proto v centru pozornosti mnoha výzkumných skupin. Jednou z těchto výzkumných skupin je také pracovní skupina ADINACO, vedená prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Pracovní skupina ADINACO se věnuje hledání potenciálních látek využitelných v terapii AD. Intenzivně jsou studovány zejména alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae¹⁵. Řada alkaloidů má další medicínsky významné vlastnosti, především zde zmíníme účinky antivirové, antimykotické, antibakteriální a analgetické¹⁶. V současnosti byla připravena syntetická analoga některých amaryllidových alkaloidů, což umožňuje výrazně rozšířit možnosti studia těchto látek¹⁷. Tato práce si klade za cíl přehledně shrnout biologicky významné alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae potenciálně využitelné při terapii nádorových onemocnění. Budou diskutovány i další farmaceuticky významné vlastnosti, které mohou vhodně přispět k celkové terapii i k terapii lokálně se vyskytujících zhoubných nádorů.

2.1. Lykorinový typ

Prvním izolovaným alkaloidem čeledi Amaryllidaceae byl v roce 1877 lykorin získaný z *Narcissus pseudonarcissus*⁴. Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin (obr. 1). Jedná se o pyrrollofenanthridinový cyklický alkaloid, jehož strukturu poprvé detailně popsal Nagakawa a spol. v roce 1956 (cit.¹⁸).

Lykorin má rozmanité biologické vlastnosti. U rostlin se jeho působení vyznačuje schopností inhibovat syntézu kyseliny askorbové prostřednictvím potlačení aktivity terminálního enzymu galaktodehydrogenasy, který přeměňuje L-galaktono- γ -lakton na kyselinu askorbovou¹⁹. Lykorin je účinný proti celé řadě virů, jako je poliovirus²⁰, vaccinia virus pravých neštovic²¹ a SARS-asociovaný coronavirus²². Navíc vykazuje antimykotickou aktivitu proti *Saccharomyces cerevisiae*²³ a má fatální vliv na životní cyklus parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*²⁴.

Nejdůležitější vlastností z našeho pohledu je jeho protinádorová aktivita, která byla prokázána *in vivo* u myšího melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu²⁵ a také *in vitro* na HeLa buňkách a mnoha dalších typech nádorových buněk jako jsou CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ (cit.¹). Během studia lykorin vykazoval vysokou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám rezistentním k apoptóze již v mikromolárních koncentracích². Při testování lykorinu na p53-negativní linii lidských leukemických promyelocytů HL-60 *in vitro* byla pozorována jeho aktivita vyvolávající zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a následná indukce apoptózy doprovázená zvýšenou aktivitou kaspas -3, -8, -9 (cit.²⁶). Rozsáhlejší testování lykorinu bylo provedeno na myších s těžkým imunodeficiem SCID, kterým byly po utlumení krvetvorby expozicí ionizujícímu záření implantovány buňky HL-60. Během experimentů byla prokázána inhibice růstu buněk promyelotické leukémie *in vivo* po podávání lykorinu (5 mg/kg/den i. p) s minimem závažných vedlejších účinků na zdravé buňky organismu²⁵. Další experimenty prokazující protinádorovou aktivitu lykorinu byly uskutečněny na buňkách lidského mnohočetného myelomu (KM-3), kde expozice lykorinu nao-



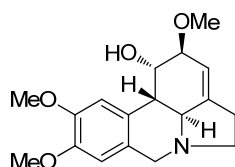
Obr. 2. Analýza buněčné proliferace v reálném čase. Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací lykorinu. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO (*dimethylsulfoxid*) a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplikátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací lykorinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; 0,1% DMSO, — 5 μ M lykorin, — · 10 μ M lykorin, — · · 50 μ M lykorin, — 5% DMSO

pak vedla k akumulaci buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Zástava buněčného cyklu u buněk KM-3 nevedla k úspěšné reparaci poškození DNA a buňky následně aktivovaly apoptózu²⁷. Rovněž v našem experimentu s použitím adherentních buněk adenokarcinomu prsu SK-BR-3 a systému xCELLigence byl pozorován cytotoxický a antiproliferační mechanismus působení lykorinu (obr. 2).

Jaké jsou současné poznatky o apoptotickém působení lykorinu na molekulární úrovni? Lykorin indukuje apoptózu vnitřní mitochondriální cestou, kdy dochází k „down“ regulaci proteinu Mcl-1 u nádorových buněk K562, U937 a HL-60 (cit.²⁸). Tento protein patří do rodiny proteinů Bcl-2, které mají rozhodující vliv na regulaci apoptózy. Protein Mcl-1 inhibuje apoptózu interakcí s proapoptickými proteiny Bim, Bak a Bid. Nadměrnou expresi proteinu Mcl-1 můžeme pozorovat u myeloidních progenitorových buněk. Zvýšenou expresí Mcl-1 je zde zajištěna odolnost nádorových buněk vůči apoptóze vyvolané běžnými chemoterapeutiky, tudíž lze předpokládat dobrou odpověď tohoto typu buněk k působení lykorinu²⁹. Při studiu působení lykorinu v různých koncentracích na buněčnou linii HL-60 došlo k dávkově závislému zvýšení exprese inhibitoru cyklin-dependentní kinasy p21 a TNF- α . Zároveň došlo k „down“ regulaci molekulárních cílů p21 regulujících buněčný cyklus, komplexu proteinu Cdk1 a Cyclinu B, Cdk2 a Cyclinu E. Buněčná smrt následně vyvolána lykorinem vedla k masivnímu uvolnění cytochromu c, čímž nelze vyloučit programovanou buněčnou smrt mitochondriální cestou³⁰.

Do skupiny alkaloidů lykorinového typu spadají i další látky podobné struktury. Z biologicky nejzajímavějších uvedme karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbellisin a galanthin (obr. 3).

Všechny výše uvedené vykazují protinádorovou aktivitu, avšak podle pilotních experimentů je nejúčinnější amarbellisin a pseudolykorin s hodnotou IC₅₀ méně než 10 μ M během 72 hodin dlouhého působení na nádorové buněčné linie². Pseudolykorin inhibuje proteosyntézu ve stadiu formace peptidové vazby a jeho cytotoxický účinek je zprostředkován apoptózou. Apoptóza linie leukemických buněk Jurkat byla potvrzena i působením kongenerů 1-*O*-acetyllykorinu, lykorin-2-onu (cit.⁸). Amarbellisin zatím podrobněji prozkoumán není. Naopak více prozkoumaný alkaloid ze skupiny lykorinu ungeremin působí cytotoxicky vazbou na lidskou topoisomerasu I, II α (cit.³¹). Zajímavostí však je, že z pohledu cytotoxické aktivity na nádorové linie se nevyrovná protějšek lykorinu,



Obr. 3. Strukturální vzorec galanthinu

pseudolykorinu a amarbellisinu². V našem experimentu byl pozorován pokles viability buněk SK-BR-3 po delším časovém působení galanthinu ve vyšších koncentracích (obr. 4).

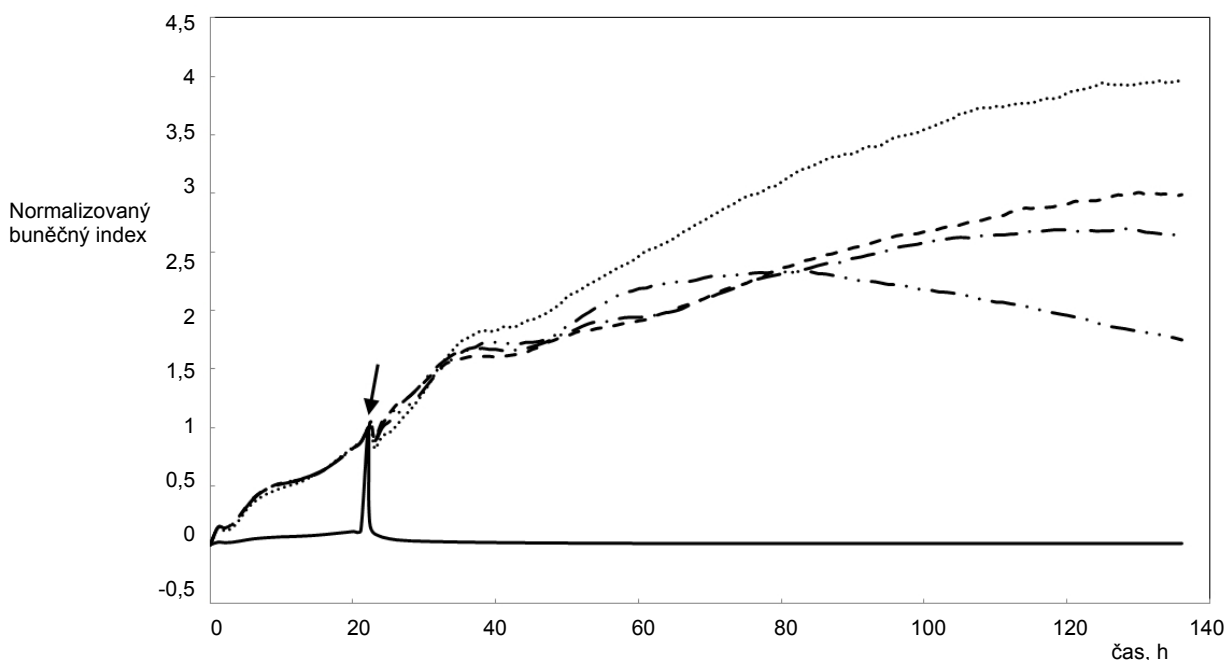
2.2. Homolykorinový typ

Do této strukturální skupiny se řadí celá řada alkaloidů, ale jen některé mají výraznou biologickou aktivitu. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin bohužel vykazují cytotoxický efekt i k nenádorovým primárním buňkám myších fibroblastů LMTK. Na druhou stranu inhibují růst některých nádorových buněk, lidského jaterního karcinomu HepG2 a leukemických buněk MOLT-4 (cit.³²). K dalším biologickým účinkům patří aktivita hippeastrinu proti *Herpes simplex*³³ a jeho antimykotický účinek zejména vůči *Candida albicans*⁴.

2.3. Haemanthaminový a krinanový typ

Do této skupiny se řadí haemanthamin, haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin. Všechny zmíněné alkaloidy mají rozdílnou schopnost inhibovat růst různých typů nádorových buněk^{1,2,32,34–36}. Zmíněné látky jsou odvozené od ethanofenanthridinu³⁷.

Mezi vůbec nejúčinnější alkaloidy této skupiny patří haemanthamin (obr. 1), haemathidin a krinamin, které působí cytotoxicky na nádorové buňky^{2,9}. Ze studie osmi přírodních a dvou syntetických alkaloidů krinanového typu vyplývá schopnost pouze krinaminu a haemanthaminu selektivně iniciovat apoptózu u nádorových buněk potkaního hepatocelulární karcinomu 5123tc a zároveň nepůsobit cytotoxicky vůči linii lidských embryonálních buněk ledvin HEK 293T ve stejných koncentracích. Na základě této studie byla stanovena účinná dávka k indukci apoptózy u 50 % nádorových buněk na 12,5 μ M pro krinamin a 15 μ M pro haemanthamin⁹. Mechanismus apoptotického účinku u těchto alkaloidů byl dosud prostudován jen minimálně. Haemanthamin pravděpodobně inhibuje proteosyntézu tím, že blokuje vznik peptidové vazby v kroku, kdy se peptidyltransferasa váže na 60S podjednotku ribosomu³⁸. Později byla prokázána inhibice růstu buněk myšího lymfomu L5178 prostřednictvím tvorby komplexu haemanthaminu s RNA (cit.³⁶). V nedávné době byla prokázána indukce apoptózy u p53-negativní T-lymfoblastové leukémie Jurkat. Expozice haemanthaminu po dobu 24 hodin vyvolala pozdní apoptózu (buňky Annexin V a propidium jodid dvojité pozitivní) u 4 $\pm$ 1 % po působení v koncentraci 1 μ M, resp. 22 $\pm$ 1 % po působení v koncentraci 25 μ M (cit.⁷). Bližší informace o molekulární podstatě účinku haemanthaminu nejsou dosud známy. Nově studovaný, avšak méně známý krinanový alkaloid, distichamin se ukázal jako toxický k nádorovým buňkám MCF-7, HeLa, G-361, K562, BJ a CEM. U lidských buněk akutní T-lymfoblastické leukémie CEM dávkově závisle indukoval zvýšenou aktivitu kaspasy -3 a -7. V dávkovém rozmezí 1–20 μ M vždy v závislosti na apli-



Obr. 4. **Analýza buněčné proliferace v reálném čase.** Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací galanthinu. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplicátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací galanthinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; 0,1% DMSO, --- 10 μ M galanthin, - - - 50 μ M galanthin, - · - 200 μ M galanthin, — 5% DMSO

kované dávce vedl k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu a indukoval expresi proteinu p53 (cit.¹). Haemanthamin a haemathidin jsou zajímavé alkaloidy i z pohledu biologických účinků. Hydroxyderivát haemanthaminu haemathidin má antiparazitické, protizánětlivé a analgetické účinky s aktivitou vyšší než kyselina acetylsalicylová^{39–42}.

2.4. Tazettinový typ

V této strukturální skupině se nacházejí deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Tazettin (obr. 1) vykazuje jen mírnou cytotoxickou aktivitu proti primárním buňkám fibroblastické linie LMTK a bohužel taky velice slabou aktivitu na leukemické buňky Rauscher⁴³. Tyto výsledky jsou ve shodě s našimi daty analýzy cytotoxicity pomocí měření hodnoty elektrické impedance u buněk SK-BR-3 přístrojem xCELLigence (obr. 5).

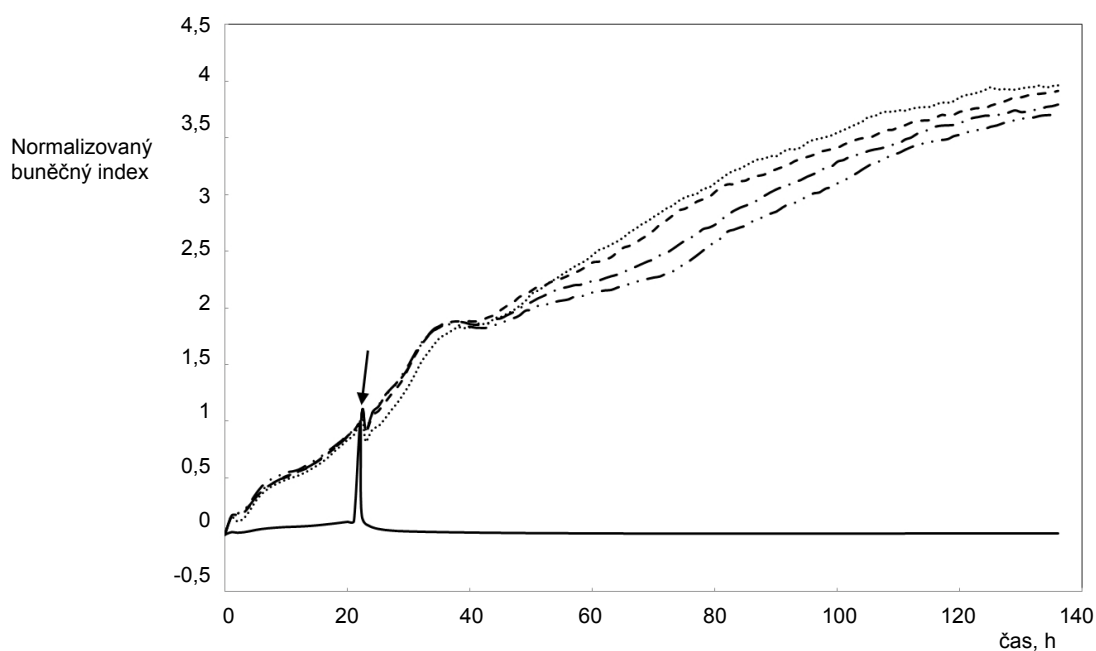
Naopak mnohem účinnější než tazettin je jeho biosyntetický prekurzor pretazettin. Tato látka patří mezi nejaktivnější alkaloidy účinné proti T-lymfoidním buňkám MOLT-4. Během *in vitro* experimentů vykazoval vysokou aktivitu na buňky Rauscher leukemie, Lewisova karcinomu a spontánní AKR lymfocytární leukemie³⁴. Byla prokázána inhibice růstu HeLa buněk po expozici pretazettinem³⁷. Pretazettin inhibuje aktivitu P-glykoproteinu, produktu MDR1 genu a dále zvyšuje aktivitu doxorubicinu u rezistentních forem myších leukemií⁴⁴. Pretazettin inhi-

buje vazbou enzymu aktivitu RNA-dependentní DNA polymerasy u rozdílných typů onkogenních virů a je účinný proti *Herpes simplex* a flavivirům^{4,45}. Časné práce rovněž popisují inhibici proteosyntézy eukaryotických buněk potlačením tvorby peptidové vazby⁴⁶.

2.5. Pankratistatinový typ

Alkaloidy této skupiny jsou deriváty odvozené od molekuly fenantridinu. Nejslibnější látky z pohledu cytotoxické aktivity jsou narciklasin (obr. 6) a pankratistatin (obr. 1).

Narciklasin je alkaloid, který byl poprvé získán v roce 1967 z cibulí zástupců rodu *Narcissus*. Účinek narciklasinu byl původně popsán jako antimitotický s efektem na buňky eukaryotních organismů srovnatelným s působením kolchicinu⁴⁷. Dalším studiem působení narciklasinu bylo zjištěno, že se váže na ribozomální podjednotku 60S, kde inhibuje peptidyltransferasu, čímž brání vzniku peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu³⁷. Analogicky jako některá běžně používaná cytostatika, narciklasin pravděpodobně interaguje nebo tvoří komplexy s molekulou DNA živočišných buněk⁴⁸. Studie z nedávné doby pak prokázala indukci apoptózy u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a buněk karcinomu prostaty PC-3 zprostředkovanou receptory smrti (death receptor 4 – DR4), která zároveň byla doprovázena aktivací kaspas -8 a -9. Zajímavostí bylo, že narciklasin byl více než 250krát účinnější

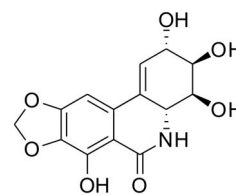


Obr. 5. **Analýza buněčné proliferace v reálném čase.** Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací tazettinu. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplikátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací tazettinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; 0,1% DMSO, ---- 1 μM tazettin, - · - 10 μM tazettin, — 5% DMSO

k nádorovým buňkám, než k primárním buňkám lidských fibroblastů Ccd-25-Lu (cit.¹¹). Z dalších biologicky významných účinků zmiňme baktericidní aktivitu proti *Corynebacterium fascians*, antifungální aktivitu proti *Candida albicans* a antivirovou aktivitu proti RNA virům hemoragické horečky reprezentovaných flaviviry a bunyaviry⁴⁹.

Pankratistatin byl poprvé izolován z cibule havajské lilie *Hymenocallis littoralis*. První poznatky o jeho cytotoxické aktivitě byly dokumentovány v roce 1993 Pettitem a spol., kteří provedli základní typizaci cytotoxické aktivity pomocí doporučení NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA). Testy byly provedeny na panelu 60 buněčných linií, které zahrnovaly nádorově transformované zástupce buněk derivovaných z tkání plic, střeva, ovarií, ledvin, mozku, melanomu a buněk akutní myeloidní leukémie. Během experimentů bylo prokázáno, že pankratistatin inhibuje růst HeLa buněk, má vysoce cytotoxický vliv proti zástupcům leukemických buněk a je rovněž účinný proti celé řadě dalších typů nádorů. Nadějným výsledkem byla dobrá aktivita proti buněčnému modelu melanomu, který se často vyznačuje rezistencí vůči proapoptickým stimulům⁵⁰. V posledních letech se ukazuje vysoká selektivita působení pankratistatinu. Expozice pankratistatinu v koncentraci 1 μM vedla o 48 hodin později k masivní apoptóze leukemických buněk pacientů nezávisle na typu zkoumané hematologické malignity. Zároveň ve stejném experimentálním uspořádání pankratistatin nevykazoval cytotoxický efekt na mononukleární buňky periferní krve zdravých dárců¹⁰. Tento efekt se znovu potvrdil

o rok později *in vitro* a *in vivo* studiemi pankratistatinu na dvou typech nádorových buněk kolorektálního karcinomu, p53 – mutovaných HT-29 a p53 – wild-type HCT116 ve srovnání se zdravými fibroblasty střeva CCD-18Co. Pankratistatin zde působil cytotoxicky indukci apoptózy selektivně jen vůči nádorovým buňkám. Apoptóza u nádorových buněk byla způsobena poklesem mitochondriálního membránového potenciálu bez detegovatelné tvorby dvouvláknových zlomů DNA. Podkožně lokalizované nádory buněk HT-29 u Nu/Nu myši reagovaly na podávání pankratistatinu v dávce 3 mg kg⁻¹ signifikantním zmenšením bez současného zaznamenání toxického efektu na játra a ledviny experimentálních objektů⁵¹. Paralelně byl potvrzen cytotoxický efekt pankratistatinu na dvou experimentálních zástupcích karcinomu prostaty, buněčné linii LNCaP a DU145 s nevýznamným efektem na zdravé lidské fibroblasty HDF. Působení pankratistatinu bylo zprostředkováno apoptózou a buněčnou autofagií doprovázenou kolapsem mitochondriálního membránového potenciálu buněk. Experimenty byly provedeny v analogickém



Obr. 6. **Strukturní vzorec narckiklasinu**

experimentálním uspořádání *in vivo* s výbornou odpovědí u myši s xenografty rakoviny prostaty⁵².

Skupina alkaloidů z rostlin čeledi Amaryllidaceae narciklasinového typu dále zahrnuje v rostlinách minoritně zastoupené látky příbuzné narciklasinu a pankratistatinu. Za všechny zde uvedeme narciklasin-tetraacetát, *cis*-dihydronarciklasin, *trans*-dihydronarciklasin a C10b-*R*-hydroxypankratistatin. Uvedené látky jsou ve svých přírodních zdrojích zastoupeny jen v malém procentuálním podílu, což dále komplikuje jejich izolaci a následné biologické testování. V nedávno publikované práci Evidente a spol.⁸ prokázal cytotoxický efekt zprostředkovaný apoptózou u leukemických buněk Jurkat po působení zmiňovaných alkaloidů. Do této skupiny se ještě řadí alkaloid trisferidin, který má antiretrovirovou aktivitu a ismin, který působí cytotoxicky na buňky MOLT-4 T-lymfoblastické leukemické linie a buňky LMTK4 fibroblastové linie³².

2.6. Galanthaminový typ

Alkaloidy spadající do této skupiny mají jako strukturní základ dibenzofuran. Nejdůležitějším zástupcem této skupiny z pohledu medicínského významu je galanthamin (obr. 1). Od předešlých alkaloidů se liší zejména svým biologickým účinkem. Galanthamin byl poprvé izolován z cibule sněženky *Galanthus woronowii* a později i z jiných rostlin této čeledi. Fyziologicky významná aktivita tohoto alkaloidu byla náhodně objevena bulharskými farmakology na počátku 50. let minulého století⁵³. Od té doby byl galanthamin experimentálně využíván k terapii neurologických poruch jako myasthenia gravis, dětská obrna, různé typy demence nebo paralytické poliomyelitidy. Jeho nejvyužívanější schopností je reverzibilní kompetitivní inhibice acetylcholinesterasy, čehož se využívá zejména v terapii AD (cit.⁵⁴). Bylo prokázáno, že terapie této neurodegenerativní choroby galanthaminem vede k zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. Výhodou galanthaminu je to, že vykazuje až 53× větší selektivitu k AChE než k butyrylcholinesterase⁵³. Alkaloid galanthamin je látka absolutně bez známek cytotoxického působení. Dnes patří mezi klinicky využívané léčivo k terapii AD ve formě hydrobromidu a je dostupný nejčastěji pod komerčními produkty Nivalin, Razadyne a Reminyl. Další alkaloidy čeledi Amaryllidaceae s potenciálním terapeutickým využitím v léčbě AD přehledně shrnuje práce jednoho ze spoluautorů¹³.

3. Závěr

Rostliny čeledi Amaryllidaceae obsahují celou řadu alkaloidů, které se dají potenciálně využít k terapii různých typů závažných onemocnění. Většina biologicky významných látek je stále ve stádiu preklinického vývoje, což platí také pro nejprozkoumanější ze sloučenin s potenciálem pro terapii nádorových onemocnění, lykoricinu a pankratistatinu. Důležitou vlastností zde popsaných alkaloidů je zejména jejich širší biologická aktivita zahrnující jak účinky antivirotické, antibakteriální, antifungál-

ní, protizánětlivé, analgetické, tak výrazné účinky cytotoxické zprostředkované indukcí apoptózy. Jejich výhodou je opakovaně potvrzená selektivita působení proti nádorovým buňkám s minimem negativních účinků na zdravé buňky organismu. Naopak limitujícím faktorem pro rozsáhlejší studium alkaloidů s protinádorovým účinkem a jejich použití je náročná izolace z přírodních zdrojů, proto se současný výzkum zaměřuje na přípravu syntetických analogů s terapeuticky podobnými, nebo lepšími vlastnostmi. Ačkoliv se jedná o širokou skupinu strukturně a biologicky různorodých látek, jistě si zaslouží hlubší studium a práci výzkumníků.

Tato práce byla podpořena prostředky z grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky ROUTER CZ.1.07/2.3.00/30.0058 a studentského projektu SGFChT07/2013.

LITERATURA

- Chase M. W., Reveal J. L., Fay M. F.: *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 132 (2009).
- Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: *J. Nat. Prod.* 73, 1223 (2010).
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 30 (2006).
- Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: *Recent Adv. Pharm. Sci.* 2, 65 (2011).
- El Tahchy A., Boisbrun M., Ptak A., Dupire F., Chrétien F., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D.: *Acta Biochim. Pol.* 57, 75 (2010).
- Cedrón J. C., Del Arco-Aguilar M., Estévez-Braun A., Ravelo A. G.: *Alkaloids Chem. Biol.* 68, 1 (2012).
- Jin Z.: *Nat. Prod. Rep.* 26, 363 (2009).
- Evidente A., Kireev A. S., Jenkins A. R., Romero A. E., Steelant W. F., Van Slambrouck S., Kornienko A.: *Planta Med.* 75, 501 (2009).
- McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C.: *Phytochemistry* 68, 1068 (2007).
- Griffin C., Hamm C., McNulty J., Pandey S.: *Cancer Cell Int.* 10, 1 (2010).
- Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Darro F., Lefranc F., Kiss R.: *Neoplasia* 9, 766 (2007).
- Cahlíková L., Kulhánková A., Urbanová K., Valterová I., Macáková K., Kuneš J.: *Nat. Prod. Commun.* 5, 1201 (2010).
- Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., Kučera R., Hrstka V., Klimeš J., Jahodář L., Opletal L.: *Nat. Prod. Commun.* 7, 571 (2012).
- Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: *Chem. Biodiversity* 10, 1120 (2013).

15. Kulhánková A., Cahlíková L., Macáková K., Opletal L.: *Chem. Listy* 105, 405 (2011).
16. Jin Z.: *Nat. Prod. Rep.* 28, 1126 (2011).
17. Hudlický T., Rinner U., Gonzalez D., Akgun H., Schilling S., Siengalewicz P., Martinot T. A., Pettit G. R.: *J. Org. Chem.* 67, 8726 (2002).
18. Nakagawa Y., Uyeo S., Yayima H.: *Chem. Ind.* 1956, 1238.
19. Arrigoni O., Arrigoni-Liso R., Calabrese G.: *Nature* 256, 513 (1975).
20. Hwang Y. C., Chu J. J., Yang P. L., Chen W., Yates M. V.: *Antiviral Res.* 77, 232 (2008).
21. Deng L., Dai P., Ciro A., Smee D. F., Djaballah H., Shuman S.: *J. Virol.* 81, 13392 (2007).
22. Li Y., Liu J., Tang L. J., Shi Y. W., Ren W., Hu W. X.: *Oncol. Rep.* 17, 377 (2007).
23. Del Giudice L., Massardo D. R., Pontieri P., Wolf K.: *Gene* 354, 9 (2005).
24. Mackey Z. B., Baca A. M., Mallari J. P., Apsel B., Shelat A., Hansell E. J., Chiang P. K., Wolff B., Guy K. R., Williams J., McKerrow J. H.: *Chem. Biol. Drug Des.* 67, 355 (2006).
25. Thi Ngoc Tram N., Titorenkova T. V., St Bankova V., Handjieva N. V., Popov S. S.: *Fitoterapia* 73, 183 (2002).
26. Liu J., Hu W. X., He L. F., Ye M., Li Y.: *FEBS Lett.* 17, 245 (2004).
27. Liu J., Li Y., Tang L. J., Zhang G. P., Hu W. X.: *Bio-med. Pharmacother.* 61, 229 (2007).
28. Liu X. S., Jiang J., Jiao X. Y., Wu Y. E., Lin J. H., Cai Y. M.: *Cancer Lett.* 274, 16 (2009).
29. Perciavalle R. M., Stewart D. P., Koss B., Lynch J., Milasta S., Bathina M., Temirov J., Cleland M. M., Pelletier S., Schuetz J. D., Youle R. J., Green D. R., Opferman J. T.: *Nat. Cell Biol.* 29, 575 (2012).
30. Liu J., Hu J. L., Shi B. W., He Y., Hu W. X.: *Cancer Cell Int.* 10, 1 (2010).
31. Casu L., Cottiglia F., Leonti M., De Logu A., Agus E., Tse-Dinh Y. C., Lombardo V., Sissi C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 7041 (2011).
32. Weniger B., Italiano L., Beck J. P., Bastida J., Ber-goñon S., Codina C., Lobstein A., Anton R.: *Planta Med.* 61, 77 (1995).
33. Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S.: *Res. Virol.* 140, 115 (1989).
34. Furusawa E., Irie H., Combs D., Wildman W. C.: *Chemotherapy* 26, 36 (1980).
35. Antoun M. D., Mendoza N. T., Ríos Y. R., Proctor G. R., Wickramaratne D. B., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 56, 1423 (1993).
36. Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D.: *Planta Med.* 68, 454 (2002).
37. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: *Biochim. Biophys. Acta* 425, 342 (1976).
38. Baez A., Vazquez D.: *Biochim. Biophys. Acta* 518, 95 (1978).
39. Çitoğlu G., Tanker M., Gümüşel B.: *Phytother. Res.* 12, 205 (1998).
40. Tanker M., Çitoğlu G., Gümüşel B., Hener B.: *Int. J. Pharmacogn.* 34, 194 (1996).
41. Herrera M. R., Machocho A. K., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: *Planta Med.* 67, 191 (2001).
42. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: *Phytother. Res.* 17, 1220 (2003).
43. Furusawa E., Furusawa S., Lee J. Y., Patanavanich S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152, 186 (1976).
44. Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., Molnár J., Ocsosvski I., Falkay G.: *In Vivo* 23, 41 (2009).
45. Ghosal S., Saini K. S., Razdan S.: *Phytochem.* 24, 2141 (1985).
46. Cordell G. A.: *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*. Wiley, New York 1981.
47. Ceriotti G.: *Nature* 213, 595 (1967).
48. Dall'acqua F., Rodighiero C.: *Farmacol. Sci.* 32, 67 (1977).
49. Kornienko A., Evidente A.: *Chem. Rev.* 108, 1982 (2008).
50. Pettit G. R., Pettit G. R. 3rd, Backhaus R. A., Boyd M. R., Meerow A. W.: *J. Nat. Prod.* 56, 1682 (1993).
51. Griffin C., Karnik A., McNulty J., Pandey S.: *Mol. Cancer Ther.* 10, 57 (2011).
52. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: *Int. J. Oncol.* 38, 1549 (2011).
53. Greenblatt H. M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J. L.: *FEBS Lett.* 463, 321 (1999).
54. Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M.: *Biol. Psychiatry* 49, 279 (2001).

M. Dalecká^a, R. Havelek^a, K. Královec^a, L. Brůčková^a, and L. Cahlíková^b (^a*Department of Biological and Biochemical Sciences, University of Pardubice, Pardubice*, ^b*Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Charles University, Hradec Králové*): **Amaryllidaceae Family Alkaloids as Potential Drugs for Cancer Treatment**

This article summarizes basic information about the Amaryllidaceae alkaloids with cytotoxic and apoptosis-inducing potential in diverse cancer cell lines and tumour xenografts. The review focuses on molecular mechanisms leading to cell death mediated by Amaryllidaceae alkaloids. Since some of them possess high cytotoxic efficiency in cancer cell lines study of Amaryllidaceae alkaloids could generate chemical structures for potential drugs. The biological activities that could be useful especially in topical cancer treatment are indicated. We have tested cytotoxic and antiproliferative activities of lycorine, galanthine and tazetidine in breast adenocarcinoma cells SK-BR-3 using label-free and real-time monitoring of the xCELLigence cell viability system.

EXTRAKČNÉ POSTUPY PRE IZOLÁCIU DITERPÉNOV Z UHLIA

ANTON ZUBRIK^a, MICHAL LOVÁS^a, SILVIA
DOLINSKÁ^a, SLAVOMÍR HREDZÁK^a,
ĽUDMILA TURČANIOVÁ^a, JOSEF CVAČKA^b
a VLADIMÍR VRKOSLAV^b

^a Ústav geotechniky SAV, Watsonova 45, 043 53 Košice,
SR, ^b Ústav organickej chémie a biochémie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2., 166 10 Praha 6, ČR
vrkoslav@uochb.cas.cz

Došlo 24.7.12, prepracované 7.11.12, prijaté 22.11.12.

Kľúčové slová: slovenské hnedé uhlie, diterpény, superkritická fluidná extrakcia, mikrovlnná extrakcia

Úvod

Uhlie a produkty jeho spracovania hrajú dôležitú úlohu hlavne v energetických potrebách spoločnosti. Okrem toho uhlie predstavuje unikátny prírodný zdroj organických zlúčenín, ktorý je možné využiť v rôznych oblastiach priemyslu¹ (napríklad skvapalňovaním uhlia sa získavajú rôzne organické látky a chemikálie, aromatické zlúčeniny môžu byť prevedené na cenné chemikálie, ako je fenol alebo naftalén). Uhlie môže byť využívané na získavanie rôznych uhlíkových materiálov typu uhlíkových vlákien, aktívneho uhlia, grafitových materiálov, fullerénov alebo nanorúrok². Unikátne zlúčeniny z uhlia ako sú terpény a humínové kyseliny majú zaujímavé vlastnosti z hľadiska ich biologickej aktivity^{3,4}.

Z fyzikálneho hľadiska je uhlie dvojzložkový systém^{5–9}. Prvou zložkou je makromolekulárna sieť, zložená z aromatických klastrov, spojených mostíkmi (neextrahovateľné zložky). Druhou zložkou je mobilná fáza, tvorená nízkomolekulovými, extrahovateľnými látkami. Obidve zložky sú súčasťou všetkých typov uhlia¹⁰. Mobilnú fázu tvorí množstvo aromatických, alifatických a alicyklických látok. Medzi nimi majú zvláštny význam terpenické biomarkery, ktoré je možné využiť pre štúdium vzniku uhlia a diagenetických procesov prebiehajúcich v minulosti. Do skupiny uhoľných biomarkerov patria látky s rigidným tetracyklickým skeletom, ako sú kaurány, fylokładány a beyerány¹¹.

V handlovskom hnedom uhli sa vyskytujú niektoré vzácné terpenoidné látky s potenciálnou biologickou aktivitou³. Jedným z hlavných komponentov je tetracyklický diterpén 16 α (H)-fylokładán, ktorý vykazuje slabú genotoxickú a selektívnu antimikrobiálnu aktivitu^{4,12}. Táto zlúčenina by mohla slúžiť aj ako prekursor pre syntézu derivátov s vyššou biologickou aktivitou, a preto boli hľa-

dané postupy jej izolácie z uhlia. Najbežnejším a najrýchlejším spôsobom získania nízkomolekulových látok je extrakcia a následná separácia extraktu v spojitosti s identifikačnými metódami. Extrakcia závisí nielen od typu extrakčnej metódy, ale aj napr. od čistoty, zloženia a zrnitosti vzorky. Mechanická aktivácia mletím, resp. aktivačné mletie je jedným z kľúčových krokov predextrakčnej úpravy uhlia¹³. Mechanickou aktiváciou uhlia dochádza nielen k jeho zdrobneniu a tým k sprístupneniu extrakčného činidla do matrixu uhlia, ale aj k zmenám v organickej štruktúre uhlia¹⁴ a uvoľneniu látok zadržovaných v polymérnom matrixe.

V tomto príspevku sú testované a porovnané rôzne extrakčné postupy pre izoláciu 16 α (H)-fylokładánu z mechanicky aktivovaného hnedého uhlia, t.j. klasická extrakcia v Soxhletovom prístroji, nízkoteplotná a vysokoteplotná superkritická fluidná extrakcia a mikrovlnná extrakcia.

Experimentálna časť

Postup prípravy vzoriek a ich charakterizácia

Základná vzorka uhlia, odobratá z Bane Handlová (Hornonitrianske bane Prievidza, a.s.) bola drvená v čelust'ovom drviči a vo vibračnom čelust'ovom mlynčeku. Drvením a kontrolným triedením za sucha na site s okatosťou 5 mm sa z pôvodnej vzorky uhlia pripravila vsádzka pre rozdrúžovanie v hydrocyklóne so zrnitosťou 0–5 mm. Rozdrúžovanie sa realizovalo v hydrocyklóne bez použitia zaťažkávadla (Water Only Cyclone). Detailný postup rozdrúžovania uhlia a schéma hydrocyklónu je uvedená v predchádzajúcich prácach^{15,16}.

Analyzované vzorky (základná vzorka – Z1 a prepad z hydrocyklónu – P1) boli podrvené pod 0,5 mm a pripravené na mechanickú aktiváciu v planetárnom mlyne Pulverisette 6 (Fritsch, Nemecko) za podmienok, ktoré sú uvedené v práci Zubrika⁴. Špecifický povrch (S_A) vzoriek bol meraný prístrojom Gemini 2360 (Micromeritics, USA) metódou BET. Granulometrická analýza bola vykonaná laserovým analyzátorom Sympatec Helos 12LA s disperzným podávačom Rodos SR za sucha (Sympatec, Nemecko).

Prvková analýza (CHN) bola realizovaná na analyzátoře Carlo Erba Model 1106 (Carlo Erba, Taliansko). Obsah popola, obsah SiO₂ a celková síra sa stanovila podľa štandardných analytických metód. Ostatné prvky boli stanovené atómovou absorpčnou spektrometriou (Fast Sequential AA240FS, Varian, Austrália).

Extrakcia

Nízkoteplotná superkritická fluidná extrakcia (LSFE): Experimenty nízkoteplotnej superkritickej fluidnej extrakcie s oxidom uhličitým boli vykonané na prístroji SE-1 vyrobenom firmou SEKO-K, Brno, Česká republika. Podmienky extrakcie boli nasledovné: hmotnosť vzorky uhlia

bola 1 g, celkový extrakčný čas 90 min, tlak 30 MPa a teplota 90 °C.

Vysokoteplotná superkritická fluidná extrakcia (HSFE): Schéma použitého prístroja je uvedená v práci Czechovského a spol.¹⁷ Extrakcia prebiehala 60 min pri tlaku 12–13 MPa a teplote 300 °C, resp. 340 °C. Hmotnosť vzorky bola 2,5 g. Ako rozpúšťadlo boli použité cyklohexán a izopropylalkohol v pomere 9:1. Prietok rozpúšťadla bol 60 ml h⁻¹. Po extrakcii bol extrakt prefiltrovaný.

Mikrovlnná extrakcia (ME): Pre mikrovlnnú extrakciu uhlia bola použitá špeciálne upravená mikrovlnná pec AVM 434/WP/HP (Whirlpool, Švédsko) s výkonom 500 W a frekvenciou 2,45 GHz. Pokusy boli realizované v 500ml varnej banke napojenej na refluxný chladiaci systém. 20 g uhlia bolo extrahované s 250 ml dichlórmetánu počas 20 min (cit.^{4,18}). Získaný extrakt uhlia bol prefiltrovaný.

Soxhletova extrakcia: Vzorka uhlia o hmotnosti 10 g bola podrobená klasickej Soxhletovej extrakcii v dichlórmetáne (300 ml). Soxhletová extrakcia trvala 72 hodín vo vodnom kúpeli pri teplote bodu varu rozpúšťadla. Získaný extrakt uhlia bol prefiltrovaný.

Všetky získané extrakty uhlia boli vysušené a zvážené.

Izolácia 16 α (H)-fylokkladánu z extraktov

Izolácia a štrukturálna charakteristika bola vykonaná z extraktu získaného mikrovlnnou extrakciou podľa predchádzajúcich pokusov^{4,12,16,18}. Po extrakcii mechanicky aktivovanej vzorky P1 rôznymi metódami boli vysušené

extrakty rozpustené v 1 ml *n*-hexánu. Pred samotnou separáciou v kolóne sa extrakty re-extrahovali na SPE kolónkach (Chromabond SiOH, Macharey-Nagel GmbH + Co. KG) s väčším množstvom *n*-hexánu (100 ml). Rozpúšťadlo bolo odparené a zvyšok každého extraktu bol ďalej separovaný do 4 frakcií v kolóne. Kolóna bola naplnená silikagélom (5 g, Kieselgel 60), cez ktorú pretieklo 80 ml *n*-hexánu. Boli zachytené štyri frakcie (F1 až F4) po 20 ml rozpúšťadla.

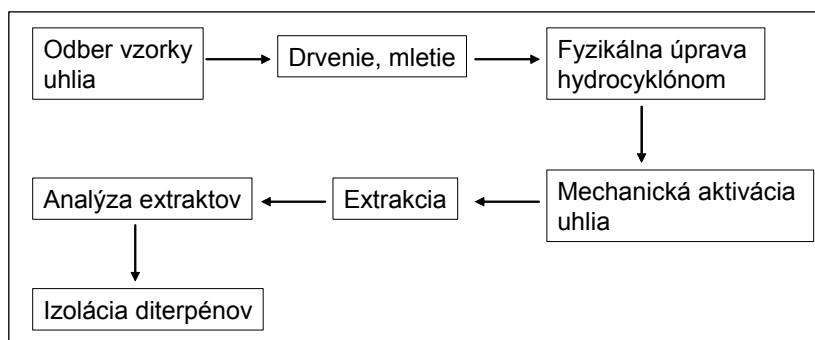
Rozpúšťadlo bolo odparené zo všetkých 4 frakcií a tieto frakcie boli analyzované tenkovrstvovou chromatografiou a plynovou chromatografiou s hmotnostnou detekciou (GC/MS).

Schéma celého procesu extrakcie a izolácie diterpénov zo slovenského hnedého uhlia je znázornená na obr. 1.

Výsledky a diskusia

Fyzikálna úprava v hydrocyklóne

Hydrocyklónovou úpravou sa zo základnej vzorky uhlia (Z1) získali tri produkty: ľahký produkt na prepade (P1) pri hmotnostnom výnose 29,37 %, ďalej ťažký produkt na výtoku (21,91 %) a kal zrnitosti pod 250 μ m ako obehová vsádzka (48,72 %). Hodnotené boli vzorky Z1 a P1. Výsledky ich analýzy sú uvedené v tab. I. Ľahký produkt P1 mal podstatne nižší obsah popola ako základná vzorka Z1. Hydrocyklónovou úpravou sa tak v tomto produkte podstatne znížil obsah popolovín ako SiO₂, Fe a S_T, pričom došlo k jeho nabohateniu spáliteľnými, organický-



Obr. 1. Schéma separačného postupu pre získanie diterpénov z uhlia

Tabuľka I

Výsledky analýz hnedého uhlia z lokality Handlová

Produkt	A ^d [%]	V ^d [%]	C ^d [%]	H ^d [%]	N ^d [%]	O ^d [%]	S _T [%]	SiO ₂ [%]	Fe _T [%]	As [ppm]
P1	7,70	32,52	61,33	5,57	0,68	23,56	1,16	3,33	0,93	73,40
Z1	39,65	22,32	42,92	3,86	0,50	12,00	1,17	21,25	3,45	90,11

A – popol, V – prchavé látky, ^d – v sušine, _T – celkový obsah, O^d – podľa vzorca 100 – (A^d + C^d + H^d + N^d + S^d_T)

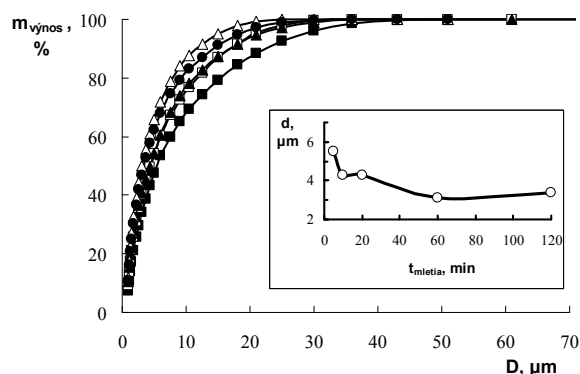
mi látkami (C^d – 61,33 %, H^d – 5,57 %). Z predchádzajúcich experimentov^{4,16} je zrejmé, že produkt P1 obsahuje najväčšie množstvo diterpénov, preto táto vzorka bola vybratá ako najvhodnejšia pre všetky extrakčné experimenty.

Mechanická aktivácia uhlia pre extrakčné experimenty

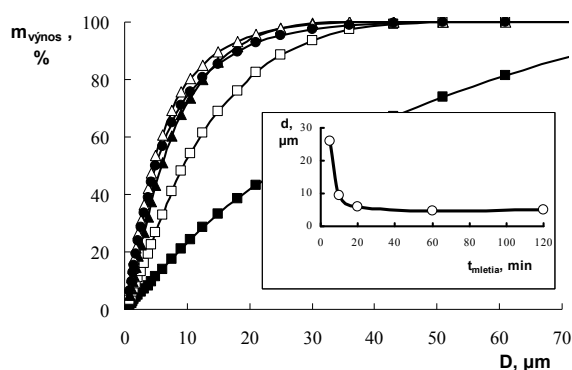
Je známe, že niektoré organické zlúčeniny sú zadržiavané na uhoľnom polymérnom matrici¹⁷. Vychádzalo sa z predpokladu, že pri mechanickej aktivácii uhlia dôjde k zdrobneniu materiálu a tým k sprístupneniu molekuly rozpúšťadla ku uhoľnému matrixu a ďalej k porušeniu štruktúry uhlia^{3,13}, prípadne priamo k uvoľneniu jednotlivých molekúl zo štruktúry uhlia. Preto po úprave v hydrocyklóne boli jednotlivé vzorky mechanicky aktivované vysoko intenzívnym mletím a následne pomocou granulometrie a meraním špecifického povrchu bola vyselektovaná optimálne pomletá vzorka. Počas mechanickej aktivácie uhlia bola sledovaná distribúcia častíc pri rôznych časoch mletia, jednak u vzorky P1 (obr. 2) s porovnaním so základnou vzorkou Z1 (obr. 3). U vzorky P1 došlo k najväčšiemu poklesu stredného priemeru zrna d (vnútorný obr. 2) počas mechanickej aktivácie v čase 20 min na hodnotu 5,9 μm . Kumulatívne krivky P1 20 min, P1 60 min a P1 120 min majú podobný tvar a hodnoty stredného priemeru zrna sa už veľmi nelíšia. Kumulatívne krivky pre základnú vzorku hnedého uhlia Z1 sú zobrazené na obr. 3. Už pri 5minútovom mletí uhlia Z1 stredný priemer zrna dosiahol hodnotu 5,5 μm (vnútorný obr. 3), čo je v porovnaní s ľahkým produktom P1 markantný rozdiel ($d_{50}(\text{P1})$ bol 26 μm). Ďalším mletím sa hodnota stredného priemeru zrna uhlia Z1 pomaly znižuje až na hodnotu d_{50} 3,1 μm .

žuje až na hodnotu d_{50} 3,1 μm .

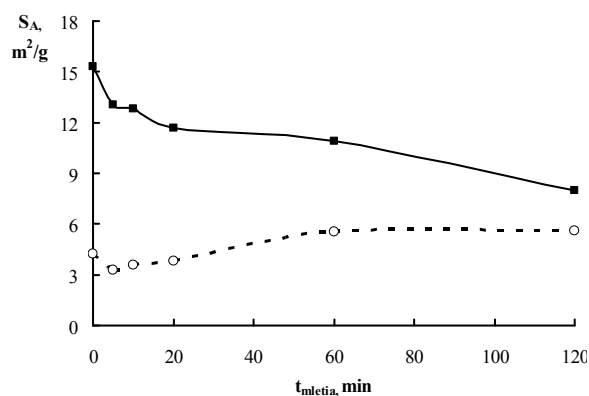
Priebeh kriviek, ktoré znázorňujú závislosť špecifického povrchu S_A od času mechanickej aktivácie u vzoriek Z1 a P1 je zobrazený na obr. 4. U vzorky P1 dochádza po 5minútovom mletí najskôr k poklesu hodnoty S_A v porovnaní s neaktivovanou vzorkou a potom k postupnému nárastu S_A s časom mletia. Tento jav môže byť spôsobený napríklad agregáciou zrn, resp. častíc. U vzorky Z1 s vysokým obsahom popola dochádza k pozvoľnému poklesu hodnoty S_A s časom mletia. Ale aj tak má vzorka Z1 vo všetkých prípadoch vyššiu hodnotu špecifického povrchu v porovnaní so vzorkou P1.



Obr. 3. Kumulatívna krivka podsitného podielu častíc po mechanickej aktivácii uhlia (Z1) pri rôznych časoch mletia: 5 min (■), 10 min (□), 20 min (▲), 60 min (Δ), 120 min (●); $m_{\text{výnos}}$ – hmotnostný výnos. Vnútroštruktúry: Závislosť stredného priemeru zrna (d_{50}) od času mechanickej aktivácie (t_{mletia})



Obr. 2. Kumulatívna krivka podsitného podielu častíc po mechanickej aktivácii uhlia (P1) pri rôznych časoch mletia: 5 min (■), 10 min (□), 20 min (▲), 60 min (Δ), 120 min (●); $m_{\text{výnos}}$ – hmotnostný výnos. Vnútroštruktúry: Závislosť stredného priemeru zrna (d_{50}) od času mechanickej aktivácie (t_{mletia})



Obr. 4. Závislosť špecifického povrchu (S_A) od času mletia (t_{mletia}) pri vzorkách P1 (○) a Z1 (■)

Na základe uvedených meraní bola vybratá optimálne mletá vzorka P1 20 min so stredným priemerom zrna $d_{50} = 5,9 \mu\text{m}$, $S_A = 3,78 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. 20 minút je z hľadiska spotreby energie a času a zlepšení parametra vzorky najvýhodnejší čas mletia. Takto aktivovaná vzorka P1 bola používaná pre extrakčné experimenty.

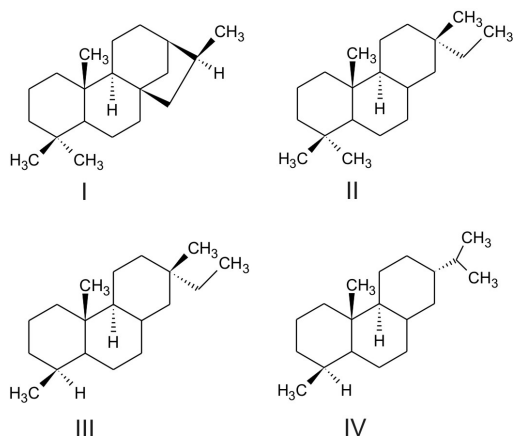
Porovnanie jednotlivých extrakčných metód pre extrakciu tetracyklických diterpénov

Po separácii extraktov v kolóne boli frakcie analyzované tenkovrstvovou chromatografiou. Vo frakciách F1 bola identifikovaná iba jedna škvrna s retenčným faktorom (R_F) = 0,91. Jedná sa o nepolárne satureované uhľovodíky. V ostatných frakciách táto škvrna nebola identifikovaná. Vo frakcii F2 nebola pozorovaná žiadna škvrna. Vo frakcii F3 a F4 boli identifikované polárnejšie látky s R_F = 0,48 resp. 0,33. GC/MS analýza potvrdila, že frakcia F1 všetkých extraktov získaných rôznymi metódami je rovnaká a obsahuje 4 diterpény (obr. 5). Tetracyklický diterpén – 16 α (H)-fylokkladán (82,5 %) a tricyklické diterpény – izopimarán (11,4 %), 18-norizopimarán (4,0 %) a abietán (2,1 %). Hlavná zložka (16 α (H)-fylokkladán) bola potvrdená pomocou HR-MS, ^{13}C NMR, ^1H NMR a GC-IR (cit.¹⁸).

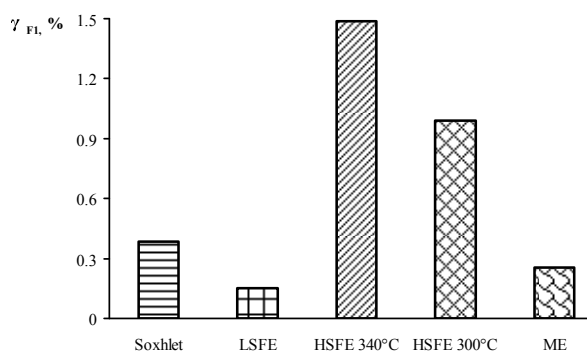
Účinnosť jednotlivých extrakčných techník na extrakciu 16 α (H)-fylokkladánu bol sledovaný pomocou určenia hmotnosti frakcie F1 (m_{F1}) s prepočtom na percentuálny hmotnostný výnos (γ_{F1}), ktorý sa vzťahuje na pôvodnú hmotnosť uhlia:

$$\gamma_{F1} = m_{F1} \times 100 / m_{\text{uhlie}}$$

Z experimentálnych výsledkov vyplýva (obr. 6), že najlepšou extrakčnou metódou je vysokoteplotná superkritická fluidná extrakcia. Potvrdzujú to výnosy frakcie F1 pri



Obr. 5. Štruktúrne vzorce diterpénov izolovaných z Handlovského hnedého uhlia¹⁸. Identifikované zložky: 16 α (H)-fylokkladán (I), isopimarán (II), 18-norizopimarán (III), abietán (IV)



Obr. 6. Hmotnostný výnos frakcie F1 po Soxhletovej extrakcii, LSFE, HSFE pri 300 °C a 340 °C a 20minútovej mikrovlnnej extrakcii s dichlórmetánom (ME); extrahovaná bola vzorka uhlia P1

obidvoch teplotách (300 °C a 340 °C). Výnos frakcie F1 z HSFE 340 °C je približne o 0,5 % vyšší ako pri HSFE, ktorá prebiehala pri 300 °C. Výnosy z ostatných typov extrakcie sú výrazne nižšie. Výnos F1 po Soxhletovej extrakcii bol 0,386 % a po mikrovlnnej extrakcii 0,254 %. Najnižší výnos poskytla metóda LSFE.

Extrakcia superkritickým fluidom je z technického hľadiska veľmi náročná. V laboratórnych podmienkach je relatívne jednoduchá mikrovlnná extrakcia a Soxhletova extrakcia. Mikrovlnná extrakcia v porovnaní s ostatnými technikami má jednu veľkú výhodu a to, že je oveľa rýchlejšia. Soxhletovou extrakciou sa podarilo pripraviť len o 0,133 % viac F1 ako v prípade 20minútovej mikrovlnnej extrakcie. Teoreticky sa za 72 hodín môže zopakovať 20minútová mikrovlnná extrakcia 216krát.

Neprehliadnuteľným a dôležitým údajom je získané množstvo 16 α (H)-fylokkladánu z handlovského uhlia. Z extrakcie 20 g uhlia P1 20 min dichlórmetánom sa odseparovalo 50,8 mg frakcie F1, t. j. teoreticky 40,4 mg 16 α (H)-fylokkladánu (výnos 0,202 %). V porovnaní s literárnymi údajmi uvedenými pre štruktúrne podobné látky z rastlín je to relatívne vysoký údaj. Napríklad, extrakciou 10 kg *Oryza sativa* sa získalo iba 10 mg orizaterpenolu (fylokklad-15-én-6 β -14 β diol) (výnos 0,0001 %)¹⁹. Alebo z 21 kg *Pseudognaphalium vira vira* (Asteraceae) sa získalo 7,8 g kyseliny ent-16-kaurén-19-ovej (výnos 0,0370 %) a 6,2 g kyseliny ent-3 β -hydroxy-16-kaurén-19-ovej (výnos 0,0295 %)²⁰. Hou a spol.²¹ izolovali 8 kauránových diterpénov z *Isodon xerophilus*. Hmotnostný výnos po extrakcii a izolácii bol v rozsahu 0,00042 až 0,0398 %. Dá sa konštatovať, že extrakcia tetracyklického diterpénu zo slovenského hnedého uhlia je v porovnaní s extrakciou podobných zlúčenín z rastlín omnoho efektívnejšia a aj o dosť jednoduchšia. Z praktického hľadiska je v našich podmienkach možné izolovať veľké množstvo 16 α (H)-fylokkladánu v relatívne krátkom čase, čo dáva možnosti nielen pre ďalšie experimentálne štúdium biologickej aktivity, ale aj nové možnosti pri organickej syntéze

rôznych fyklokladánových derivátov zo základného tetracyklického skeletu.

Záver

Z porovnania jednotlivých extrakčných techník vyplýva, že najlepšou extrakčnou metódou z hľadiska výnosu tetracyklického diterpénu – 16 α (H)-fyklokladánu je vysokoteplotná superkritická fluidná extrakcia. Ostatné techniky sú síce menej účinné, ale niektoré z nich sa možno lepšie uplatnia v praxi. Napríklad mikrovlnná extrakcia je technicky aj časovo menej náročná. Pri extrakcii, separácii a izolácii tetracyklického diterpénu z handlovského hnedého uhlia bol dosiahnutý relatívne veľký výnos, čo naznačuje ďalšie možné využitie pri syntéze nových fyklokladánových derivátov s následným testovaním biologickej aktivity. Jedná sa o prvý výsledok, kde bol z fyzikálne upraveného a mechanicky aktivovaného handlovského hnedého uhlia izolovaný tetracyklický diterpén fyklokladánového typu. Tento výsledok môže napomôcť aj k bližšiemu poznaniu slovenského hnedého uhlia z pohľadu identifikácie biomarkerov a k objasneniu flóry, z ktorého toto uhlie vznikalo.

Autori ďakujú F. Czechovskému, M. Stolarskému, K. Venturovi a V. Ježovej za umožnenie, odbornú pomoc pri realizácii superkritickej fluidnej extrakcie. Táto práca bola podporovaná grantovým projektom VEGA č. 2/0114/13, grantovým projektom GAČR P206/12/1093 a výskumným zámerom RVO 61388963.

Zoznam skratiek a symbolov

A ^d	obsah popola v sušine
BET	metóda merania špecifického povrchu založená na základe teórie Brunauera, Emmetta a Tellera
D	veľkosť zrna
d ₅₀	stredný priemer zrna
F	frakcia po kolónovej chromatografii
HSFE	vysokoteplotná superkritická fluidná extrakcia (High-Temperature Supercritical Fluid Extraction)
LSFE	nízokoteplotná superkritická fluidná extrakcia (Low-Temperature Supercritical Fluid Extraction)
ME	mikrovlnná extrakcia
P1	ľahký produkt – hydrocyklónový prepad
P1 X min	vzorka uhlia P1, ktorá je mechanicky aktivovaná po dobu X minút
R _F	retenčný faktor
S _A	špecifický povrch
SPE	extrakcia tuhou fázou (Solid Phase Extraction)
V ^d	obsah prchavých látok v sušine
W ^a	obsah vody, analytický

Z1	základná – fyzikálne neupravená vzorka uhlia, ako podanie do hydrocyklónu (vstup)
γ	percentuálny hmotnostný výnos

LITERATÚRA

- Schobert H. H., Song C.: Fuel 81, 15 (2002).
- Patney H. K., Nordlund Ch., Moy A., Rose H., Young B., Wilson M. A.: Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct. 7, 941 (1999).
- Turčániová E.: Úprava uhlia – Clean Coal Technology. Štroffek, Košice 2002.
- Zubrik A.: Doktorandská dizertačná práca. Ústav geotechniky SAV, Košice 2007.
- Given P. H.: Prog. Energy Combust. 10, 149 (1984).
- Given P. H.: Gorbaty M. L., Larsen J. W., Wender I. (ed.): Coal Science 3. Academic Press, New York 1984.
- Given P. H., Marzec A., Barton W. A., Lynch L. J., Gerstien B. C.: Fuel 65, 155 (1986).
- Solomon P. R., Best P. E., Yu Z. Z., Charpenay S.: Energ. Fuel. 6, 143 (1992).
- Haenel M. W., Collin G., Zande, M.: Erdöl Erdgas Kohle 105, 71 (1989).
- Speight J. G.: The Chemistry, Technology of Coal. Marcel Dekker, New York 1994.
- Sheng G., Simoneit B. R. T., Lief R. N., Chen X., Fu J.: Fuel 71, 523 (1992).
- Zubrik A., Lauková A., Gábelová A., Valovičová Z., Turčániová E., Cvačka J.: Chem. Listy 102, 534 (2008).
- Zubrik A., Turčániová E., Ježová V., Čuvanová S., Skybová M.: J. Alloys Compd. 434-435, 837 (2007).
- Welham J., Chapman P. G.: Fuel Process. Technol. 68, 75 (2000).
- Hredzák S.: Gospod. Surowcami Miner. 15, 221 (1999).
- Zubrik A., Hredzák S., Turčániová E., Lovás M., Bergmann I., Becker K. D., Lukčová M., Šepelák V.: Fuel 89, 2126 (2010).
- Czechovski F., Stolarski M., Simoneit B. R. T.: Fuel 81, 1933 (2002).
- Zubrik A., Šaman D., Vašíčkova S., Simoneit B.R.T., Turčániová E., Lovás M., Cvačka J.: Org. Geochem. 40, 126 (2009).
- Chung I. M., Ali M., Hahn S. J., Siddiqui N. A., Lim Y. H., Ahmad A.: Chem. Nat. Compd. 41, 182 (2005).
- Rezende M. C., Urzua A., Bortoluzzi A. J., Vasquez L.: J. Ethnopharmacol. 72, 459 (2000).
- Hou A. J., Zhao Q. S., Li M. L., Jiang B., Lin Z. W., Sun H. D., Zhou Y. P., Lu Y., Zheng Q. T.: Phytochemistry 58, 179 (2001).

**A. Zubrik^a, M. Lovás^a, S. Dolinská^a, S. Hredzák^a,
Ľ. Turčániová^a, J. Cvačka^b, and V. Vrkoslav^b** (^a*Institute
of Geotechnics, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slo-
vak Republic,* ^b*Institute of Organic Chemistry and Bioche-
mistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Pra-
gue, Czech Republic*): **Extraction Processes in Isolation
of Diterpenes from Coal**

The paper deals with the extraction of a tetracyclic diterpene from Slovak sub-bituminous coal. The extraction procedures used were Soxhlet, microwave-assisted, low-temperature supercritical fluid and high-temperature supercritical fluid (HSFE). The yield of the diterpene fraction containing 82.5 % of 16a(*H*)-phyllocladane was used to determine the efficiency of extraction procedures. HSFE seems to be the best though demanding procedure. The yield of the diterpene fraction obtained by Soxhlet and microwave-assisted extraction was 0.386 % and 0.254 %, respectively. Microwave-assisted extraction is much shorter compared with the other ones (min vs. days).

NÁHRADNÍ SLADIDLA

JANA ČOPÍKOVÁ^a, JITKA MORAVCOVÁ^b,
ZDENĚK WIMMER^{b,c}, LUBOMÍR OPLETAL^d,
OLDŘICH LAPČÍK^b a PAVEL DRAŠAR^b

^a Ústav sacharidů a cereálií, ^b Ústav chemie přírodních látek, VSCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^c Ústav experimentální botaniky AV ČR, Izotopová laboratoř, Václavská 1083, 142 20 Praha 4, ^d Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
pavel.drasar@vscht.cz

Došlo 7.8.13, přijato 1.10.13.

Klíčová slova: intenzivní sladidlo, potravní doplněk, bezpečnost potravin, toxikologie

Obsah

1. Úvod
2. Náhradní sladidla povolená v EU a ostatní
3. Cukr a zdraví
4. Nízkokalorická sladidla a zdraví
5. Závěr

1. Úvod

V naší sérii článků^{1–10} o přírodních látkách rozmanitých vlastností jsme se již několikrát zabývali látkami sladkými^{11–13}. Zajímali jsme se o ně víceméně z akademického hlediska, které dnes doplňujeme o obrázek náhradních sladidel z pohledu chemie potravinářské a bezpečnosti potravin tak, jak se sluší na naše mateřské pracoviště.

Potravin a nápoje se sníženým obsahem cukru jsou celosvětově velmi populární a jejich konzumace je považována za důležitou v boji proti obezitě a cukrovce. Lidé si je také často vybírají, protože si chtějí užít sladkou chuť, aniž by byli ohroženi tvorbou zubního kazu. Současně s tím ale vzrůstá zájem veřejnosti o jejich možné negativní vlivy na lidské zdraví, kde internet bohužel plní roli bohatého zdroje poplašných a falešných zpráv. K těmto zprávám někdy přispívají nechtěně i odborné články. Příkladem z poslední doby je kauza „kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy“ (HFSC)¹⁴. V roce 2004 byla publikována práce, ve které autoři uvádějí¹⁵, že může existovat časová závislost mezi spotřebou HFSC a epidemií obezity v USA v letech 1985 až 2000. I když sami definovali tuto

závislost jako časovou a nikoliv kauzální, tuto informaci okamžitě uchvátila média a internet, stala se předmětem debat laické veřejnosti a výrobci potravin dokonce přestali přidávat HFSC a vraceli se k sacharose s odůvodněním, že tak jsou jejich výrobky zdravější. Ačkoliv se vědci snažili usměrnit hysterii kolem HFSC logickými argumenty, že obezita roste i v zemích, kde se běžně HFSC nepoužívá, že obezita roste v USA, i když spotřeba HFSC klesla nebo že základními složkami HFSC je sacharosa a fruktosa v poměru zhruba 1:1, a tak je energetický obsah nižší než u samotné sacharosy, škoda už byla vykonána. Tento příklad ještě názorně ukazuje, že vědecké diskuse se neodehrávají ve vakuu, ale že mají velký potenciál mást a znepokojovat laickou veřejnost, čehož by si vědci měli být vědomi¹⁶.

Jednu skupinu náhradních sladidel tvoří sloučeniny velmi intenzivně sladké, jejichž malé množství nahradí velké množství cukru. Mezi odborníky se nazývají intenzivní nebo nízkokalorická sladidla a laická veřejnost je někdy označuje jako alternativní sladidla. Druhá skupina sladidel zahrnuje látky podobné sladivosti jako má sacharosa, proto se přidávají do potravin a nápojů prakticky v totožném množství; ty jsou označovány obvykle jako objemová sladidla. Tato skupina sladidel obvykle zvyšuje glykémii a zahrnuje spíše přírodní látky a jejich deriváty.

Při hodnocení nezávadnosti náhradních sladidel se často používá termín „přijatelná denní dávka“ (ADI, acceptable daily intake), která je definována jako odhadované množství vyjádřené v mg na kg hmotnosti, které lze bezpečně konzumovat každý den po celou dobu života. Tato hodnota představuje jednu setinu maximální dávky, která neměla žádné prokázané účinky při pokusech na zvířatech (NOAEL, non observable adverse effect level).

Cílem tohoto přehledu je podat současný pohled zejména na skupinu nízkokalorických náhradních sladidel.

2. Náhradní sladidla povolená v zemích EU a ostatní

Celosvětová spotřeba náhradních sladidel stoupá (tab. I). Evropská unie povoluje a reguluje obsah náhradních sladidel v potravinách; v současné době je mezi přídatnými látkami registrováno 16 náhradních sladidel (tab. II a III). Řada sladidel jinde běžně používaných doposud není pro evropské trhy povolená, což může být způsobeno silnou cukrovarnickou lobby, která by mohla blokovat uvedení sladidel na trh, může jít jen o liknavost úředního molocha, ale i o snahu výrobců současných sladidel chránit svoje obchodní zájmy. Tak zatím nenajdeme rebaudiosid A, tagatosu (Naturlose), trehalosu, alitam, brazzein, glycyrrhizin nebo mogrosidy (Luo Han Guo; Ne-

Tabulka I
Celosvětová spotřeba nízkokalorických sladidel¹⁷

Sladidlo	Spotřeba vyjádřená jako náhrada sacharosy [mil. t]		
	1985	1995	2005
Sacharin	5,3	8,1	11
Aspartam	1,2	2,2	4,1
Cyklamát	0,5	0,5	1,3
Ostatní	0,005	0,3	0,5

ctresse). Existují i sladidla, která mají místní historický význam, jako je med, javorový (javor cukrový – *Acer saccharum* a některé další druhy javorů), čirokový (amer.: sorghum; čirok cukrový – *Sorghum vulgare* var. *saccharatum*), palmový (arenga cukrodárná – *Arenga saccharifera*, lontar vějířový – *Borassus flabellifer*, palma olejná – *Elaeis guineensis*, nypa křovitá – *Nipa fruticans* a některé další), rýžový (rýže setá – *Oryza sativa*) a kokosový sirup (kokosovník ořechoplodý – *Cocos nucifera*), ztuhlá míza rostlin – mana (jasan manový – *Fraxinus ornus*), melasa a další, která se používají bez ohledu na názor úřední autority (tab. IV).

Pro zvědavé čtenáře je k dispozici řada užitečných zdrojů, z nichž poukážeme na recentní příručky^{18–23}.

Tabulka II
Nízkokalorická sladidla povolená v EU^{24,25}

Sladidlo	Obchodní název	Symbol E	Sladivost ve srovnání se sacharosou ^a	ADI ^b	Maximální dávka ^b
Acesulfam-K	Sunett, Sweet One	E950	200	9	250–2000
Aspartam	Nutrasweet, Equal	E951	180–200	40	25–6000
Cyklamát	Clio, Kandisin,	E952	30	7	250–2500
Sacharin	Dukaril, Spolarin, Sweet'n low, Sweet Twin	E954	300–500	5	80–3000
Sukralosa	Splenda	E955	600	15	50–3000
Thaumatococin	Talin	E957	2000–3000	nestanoveno	50–400
Neohesperidin dihydrochalcon	NHDC Neo-DHC	E959	1900	5	10–400
Steviol-glykosid		E960	200–300	4	
Neotam		E961	7000–13000	2	
Aspartam-acesulfam	Twinsweet	E962	350	9	25–2500

^a Relativní sladivost může být různá podle druhu nápoje nebo potraviny; ^b mg/den.kg tělesné hmotnosti

Tabulka III
Objemová sladidla povolená v EU

Sladidlo	Obchodní název	Symbol E	Sladivost ve srovnání se sacharosou ^a
Sorbitol a sorbitolový sirup	Glucitol, Dulcin	E420	0,5–1
Mannitol		E421	0,5–0,7
Isomalt	Palatinit	E953	0,5
Maltitol a maltitolový sirup		E965	0,9–1
Laktitol	Galaktosyl-glucitol	E966	0,5
Xylitol	Birch sugar	E967	1
Erythritol		E968	0,6–0,8
Kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy	HFSC	---	1

^a Relativní sladivost může být různá podle druhu nápoje nebo potraviny

Tabulka IV
Charakteristické hodnoty sladidel

Sladidlo	Sladivost ⁱ	Glykemický index	cal/lžička ^j	Sladidlo	Sladivost ⁱ	Glykemický index	cal/lžička ^j
Acesulfam-K	200	0	0	LuoHanGuo	300	0	0
Agavový sirup ^a	1,5	15	10	Maltitol	0,9	35	11
Aspartam	180	0	0	Maltosa	0,3	105	53
Brazzein	1	0	0	Mannitol	0,5	2	13
Cyklamát	40	0	0	Med	1,1	50	14
Čirokový sirup ^b	1	50	15	Monellin	1,5	0	0
Dextrosa	0,75	100	21	Neotam	8	0	0
Erythritol	0,65	1	1	Pentadin	500	0	0
Fruktosa	1,7	23	9	Sacharin	300	0	0
Galaktosa	0,3	23	53	Sacharosa	1	65	16
Glukosa	0,75	100	21	Sirup z hnědé rýže ^f	0,5	25	32
HFCS-42	1,1	68	14	Sirup z ječmenného sladu ^g	0,5	42	32
HFCS-55	1,2	58	13	Sorbitol	0,55	4	19
HFCS-90	1,6	31	10	Stevia	300	0	0
HSH ^c	0,4	36	30	Sukralosa	600	0	0
Isomalt	0,5	2	17	Tagatosa	0,92	0	7
Javorový sirup ^d	1	54	15	Thaumatococin	2	0	0
Kokosový cukr ^e	1	35	15	Trehalosa	0,45	70	36
Laktitol	0,4	3	20	Xylitol	1	12	10
Laktosa	0,15	45	107	Zlatý sirup ^h	1,1	60	15

^a Agavový sirup po hydrolyze složitějších cukrů ve šťávě agave (*Agave tequilana*, *A. salmiana*, piña) obsahuje hlavně 56 až 92 % D-fruktosy a 8–20 % D-glukosy. ^b Čirokový sirup obvykle obsahuje kolem 46 % sacharosy, 16 % D-glukosy a 13 % D-fruktosy, ale i kolem 3 % tuků a 10 % proteinů a 2,5 % minerálů. ^c HSH je hydrogenovaný škrobový hydrolyzát (Hydrogenated Starch Hydrolyzate) s vysokým obsahem sorbitolu a maltitolu. ^d Javorový sirup z javorové mízy obsahuje převážně sacharosy. ^e Kokosový cukr z mízy kokosové palmy obsahuje převážně sacharosy s příměsí D-fruktosy a D-glukosy. ^f Sirup z hnědé rýže je fermentovaný a zahuštěný produkt z vařené rýže obsahující 45 % maltosy, 3 % D-glukosy a 52 % maltotriosy. ^g Sirup z ječmenného sladu se vyrábí z naklíčeného ječmene (sladu) a obsahuje 65 % maltosy, 30 % složitějších sacharidů a 3 % bílkovin. ^h Zlatý sirup je obchodní název pro zahuštěný produkt po hydrolyze sacharosy, tzv. umělý med. ⁱ U sirupů je sladivost přepočtena na sušinu. ^j Vztaženo na obsah zarovnané čajové lžičky (cca 4 g); jsou použity běžné potravinářské jednotky; přibližný převod na jednotky SI je 1 [cal/lžička] ~ 1 [J/g].

3. Cukr a zdraví

Cukr je složkou lidské potravy od nepaměti. Podezření, že právě cukr má negativní vliv na lidské zdraví, se po desetiletí stále vrací a v souvislosti s vysokým výskytem civilizačních chorob je právě teď zase na vzestupu. Objevují se názory odborníků, že vysoký příjem cukrů může být odpovědný za tak různé choroby, jako je zubní kaz, obezita a adiposita, kardiovaskulární onemocnění, diabetes, ztučnění jater, některé druhy nádorových onemocnění a hyperaktivita. Bohužel situaci nahrává i to, že epidemiologické a nepočetné klinické studie mají mnohdy ne-

správný design, liší se způsobem zjišťování denního příjmu a dokonce ani termín „cukr“ nemá jednotný význam. To vše vede k nekonzistentním výsledkům, které neumožňují nezpochybnitelné závěry. Přehledový článek z roku 2012 se snaží²⁶ vnést pořádek do toho, co se skrývá pod termínem cukr, a upozorňuje na další možné nedorozumění pramenící z pojmu „přidaný cukr“. Uvádí také obsahy cukrů v základních potravinách a nápojích a výživová doporučení různých zdravotnických organizací. Tak např. Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organisation) doporučuje, že volné cukry (mono- a disacharidy v potravinách, ovocných džusech a v medu) by

měly poskytovat méně než 10 % z energetického příjmu, a pro Českou republiku platí doporučení konzumovat 1–3 čajové lžičky (<15 g) cukru denně.

Není proto divu, že se začaly objevovat tzv. meta-analýzy, které pomocí sofistikovaných statistických metod srovnávají výsledky jednotlivých studií publikovaných v odborné literatuře. První z nich zveřejněná²⁷ v roce 2011 analyzovala 3666 studií, z nichž pouhých 53 randomizovaných studií s 1126 účastníky splňovalo definované podmínky výstupů (kontrola hmotnosti, energetického příjmu, hladiny lipidů, glykosylovaného hemoglobinu, markerů insulinové rezistence a glykemické odezvy), věku účastníků nad 16 let a podávání alespoň dvou sladidel po dobu nejméně jednoho týdne. Zásadním nálezem bylo, že náhrada cukrů nízkokalorickými sladidly zejména v nápojích a moučnících může signifikantně zlepšit zdraví. Dále doporučují snížit obsah cukrů ve sladkém pečivu a sušenkách na nejmenší možnou míru a konstatují, že v žádné studii nenalezli negativní účinek HFSC na hladinu cholesterolu.

Zřejmě i jako reakci na kauzu HFSC zahájila WHO v lednu 2009 i systematický výzkum literatury s cílem nalézt odpověď na otázku, jaký vliv má zvýšená či snížená konzumace volných cukrů u dospělých a dětí. Jedním z výsledků je rozsáhlá meta-analýza²⁸ z roku 2012, která podle nastavených kritérií vybrala 30 ze 7895 sledování dospělých, kde nebyla striktní kontrola konzumovaných potravin, a 38 z 9445 studií, kde byli účastníci rozděleni podle věku. Vyhodnocovanými parametry byl BMI (Body Mass Index), hmotnost, obsah tělního a podkožního tuku. Z nalezených závislostí je zajímavé, že ve shodě s předchozími přehledy^{29–32} zjistili, že vysoká konzumace fruktosy je spojena s přírůstkem hmotnosti díky vyššímu příjmu energie a ne s jakýmkoliv metabolickým účinkem tohoto sacharidu. Ve skupině osob s dietou bez omezení zjistili, že snížení příjmu volných cukrů způsobilo snížení hmotnosti v průměru o 0,8 kg za týden a naopak vyšší konzumace způsobila přírůstek hmotnosti 0,75 kg. Tento vliv nebyl ve skupině dětí významný. Konečně, isoenergetická náhrada sacharosy jiným cukrem byla bez vlivu na tělesnou hmotnost.

Podobné otázky si kladou autority i v USA a v roce 2010 byla poradní komise pro výživová doporučení (DGAC, Dietary Guidelines Advisory Committee) aktualizována i doporučení pro konzumaci cukrů. Velice zajímavé a poučné je shrnutí zkušeností DGAC s tím, jak je riskantní vyhodnocovat vztah mezi expozicí a ovlivněním zdraví³³. Na příkladu slazených a ochucených nápojů jsou diskutovány otázky přidaného cukru, nekalorických sladidel, typu přijímané potravy (pevná-tekutá) *versus* změny hmotnosti či vyvolání pocitu nasycenosti. Asi nejčernější je komentář, jak některá dobře míněná doporučení ve skutečnosti zapůsobila opačně, neboť se projevily nezamýšlené důsledky. Jedním příkladem jsou snídaňové cereálie, kde výrobci svědomitě zareagovali na doporučení a částečně nahradili cukr upraveným škrobem. Ve skutečnosti ale energetická vydatnost zůstala stejná, a proto nebyl nalezen žádný pozitivní vliv na redukci hmotnosti³⁴. Jiným příkladem je chování škol, které přestaly pro děti objednávat

čokoládové mléko, aby nebyla zvýšena konzumace tuku; výsledkem bylo, že děti, než by pily neochucené mléko, přestaly ho ve škole pít vůbec³⁴.

4. Nízkokalorická sladidla a zdraví

Globální trh s nízkokalorickými sladidly představoval v roce 2010 finanční objem 1146 miliard U\$, přičemž 27,9 % zaujímal aspartam, 27,9 % sukralosa, 15,7 % cyklamat, 13,1 % sacharin, 8,7 % stevia-glykosidy, 5,2 % acesulfam K a 1,4 % neotam³⁵.

Aspartam

Aspartam (methyl ester L- α -aspartyl-L-fenylalaninu) objevený v roce 1965 je unikátní mezi ostatními intenzivními sladidly, protože je v těle metabolizován na dvě aminokyseliny, aspartát a fenylalanin, a methanol. Tyto metabolické produkty zpracovává tělo stejným způsobem, jako když jsou jejich zdrojem maso, mléko, zelenina a ovoce. Tak např. sklenice odtučněného mléka obsahuje 6krát více fenylalaninu a 13krát více aspartátu a sklenice rajčatového džusu 6krát více methanolu než stejný objem nápoje oslazeného aspartamem. Lidé trpící fenylketonurií, metabolickým onemocněním, které postihuje zhruba jednoho člověka z 15 000, nemohou toto sladidlo používat. Protože jsou u všech novorozenců v posledních 50 letech dělány testy na toto onemocnění, ani tady nehrozí žádné nebezpečí. Je přidáván do žvýkaček, limonád ale i jako balené nekalorické sladidlo „do kávy a čaje“. Roční produkce aspartamu na světě je kolem 30 tisíc tun. V závislosti na pH, zvýšenou teplotou a dlouhodobým skladováním cyklizuje na cykloaspartylfenylalanin diketopiperazin (DKP), který není sladký a z těla je vylučován. Běžným zdrojem DKP je kakao, sýr, proteinové hydrolyzáty nebo pražený slad (roasted malt). Aspartam se proto nehodí na slazení surovin pro potravinářskou výrobu, ani na výrobu produktů s prodlouženou trvanlivostí.

Velice obsažný a podrobný přehledový článek³⁶ shrnující výsledky studia bezpečnosti aspartamu byl publikován v roce 2002. V závěru autoři konstatují, že bezpečnost aspartamu za dobu 20 let jeho používání byla prokázána, nicméně že je stále potřeba se tímto tématem zabývat, aby se v co možná největší míře omezil vliv „zaručených zpráv“ na názor laické veřejnosti. Jedním z mnoha příkladů, jak jsou takové zprávy záměrně konstruovány, je text dostupný na URL³⁷, který uvádí, že „Při 40 °C se za pomoci trávicích enzymů v lidském těle methanol v aspartamu změnil ve formaldehyd a následně v kyselinu mravenčí, která způsobí metabolické překyselení. Formaldehyd je roztok, určený k balzamování mrtvých těl, jeho klasifikace je třídy A – karcinogen – život ohrožující neurotoxin. Kyselina mravenčí je jed, který se vyskytuje v kusadlech červených mravenců, kterým zabíjejí své oběti“. Výše citovaný článek³⁶ uvádí: „je třeba se dále zabývat aspekty bezpečnosti použití aspartamu, zejména jako důsledek teoretické toxicity jeho metabolitů – aminokyselin kyseliny

asparagové a fenylalaninu a methanolu – i když je jejich příjem v ostatní potravě (často) mnohem větší než ze samotného aspartamu“. Většinu poplašných zpráv je proto nutno považovat za „hoax“.

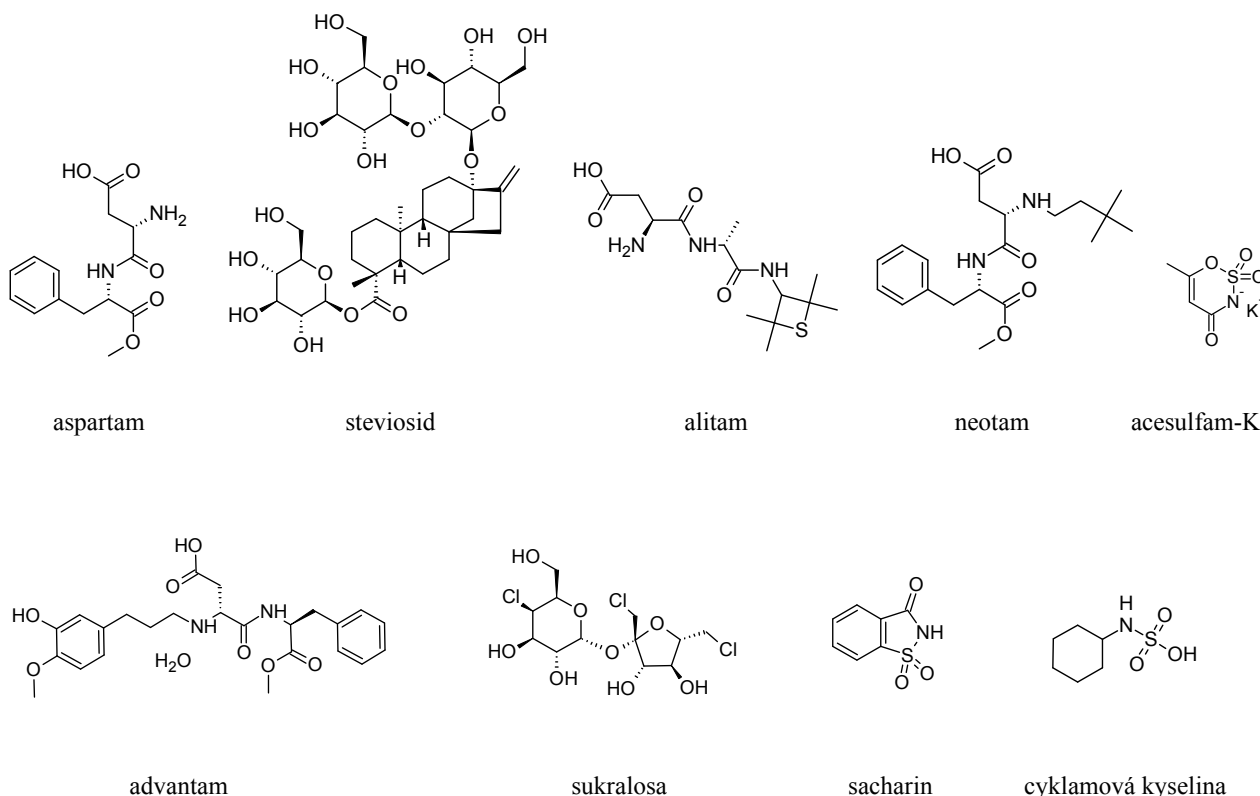
Sukralosa

Sukralosa (1,6-dichlor-1,6-dideoxy- β -D-fruktofuranosyl-4-chlor-4-deoxy- α -D-galakto-pyranosid) byla objevena náhodou v roce 1976 při hledání nových insekticidů. Vyrábí se přímou chlorací chráněné sacharosy a její chuť je přirozeně sladká, bez velkých příchutí a dochutí. Je stabilní i za vysokých teplot a nepodléhá ani kyselé ani enzymové hydrolýze. Vysoká stabilita předurčuje sukralosu jako vhodné sladidlo pro široké spektrum potravin a nápojů; přidává se i do některých léků. Sukralosa není karyogenní a lidské tělo ji nerozpoznává, proto ji nemetabolizuje a vylučuje ji močí v nezměněné podobě. Americký úřad pro potraviny a léčiva (USFDA, U.S. Food and Drug Administration) povolil sukralosu v roce 1998 a Evropská komise pro bezpečnost potravin³⁸ (EFSA, European Food Safety Authority) v roce 2000. Mezi objevením sladké chuti sukralosy a povolením používat ji jako sladidlo uplynulo více než 20 let a za tuto dobu bylo publikováno více než 100 odborných studií zabývajících se bezpečností tohoto sladidla a na jejich základě byla sukralosa označena jako bezpečná. Práce z nedávné doby dokumentují, že sukralosa není genotoxická³⁹ a že je inertním sladidlem z pohledu homeostáze glukosy a podněcování apetitu⁴⁰.

I poslední přehledový článek⁴¹ neuvádí žádné negativní nálezy o vlivu sukralosy na lidské zdraví kromě jedné práce, ve které autoři publikovali, že Splenda ovlivňovala střevní mikroflóru, zvyšovala obsah transportního P-glykoproteinu a cytochromu P450 u samic krys⁴². Všechny tyto účinky byly autory připsány právě sukralose. Tato publikace byla posouzena panelem expertů⁴³, kteří zpochybnili výsledky této studie zejména proto, že byl použit preparát Splenda obsahující 1 % sukralosy a 99 % maltodextrinu bez toho, že by byl současně kontrolní skupině podáván maltodextrin samotný. Poté následovala čilá korespondence na stránkách časopisu *Regulatory Toxicology and Pharmacology* ještě v roce 2012, kdy jak autoři, tak oponenti stáli na svých stanoviscích. Nicméně v poslední době se na internetu objevují poplašné zprávy, které dávají na stejnou úroveň sukralosu a chlorované pesticidy, což u nepoučeného konzumenta může vyvolat asociaci, že i sukralosa je zdraví nebezpečná. Na druhou stranu se lze setkat i s reklamními triky označujícími sukralosu jako derivát cukru, tedy vlastně přírodní látku. Ani tento přístup není správný.

Cyklamát

Cyklamát (sodná nebo vápenatá sůl kyseliny cyklamové) byl objeven v USA v roce 1937 při vývoji protihořečnatých látek. Má sladivost cca 30–50krát vyšší než sacharosa, proto se musí přidávat do potravin v relativně větším množství. Velmi často se používají ve směsi 10:1



se sacharinem, protože tato směs má lepší chuť než každá složka sama. V roce 1975 bylo publikováno, že cyklamát může způsobovat rakovinu močového měchýře krys⁴⁴ a americký úřad USFDA okamžitě zakázal jeho používání. Mnoho následujících studií na myších, krysách, psech a opicích tuto domněnku nepotvrdilo, nicméně cyklamát není v USA povolen doposud. Dokonce i studie trvající 24 let, kdy byly opicím od narození podávány dávky 100 a 500 mg cyklamátu 5krát týdně, nenalezla žádný vztah ke vzniku nádorového onemocnění⁴⁵. Ovšem diskuse kolem bezpečnosti cyklamátu nekončí, protože je bohužel metabolizován různě. Většina lidí vylučuje cyklamát nezměněný, ale někteří ho metabolizují až z 85 % na cyklohexylamin, který je toxičtější než cyklamát. V současné době je právě proto věnována pozornost hlavně osudu cyklamátu v lidském těle. Poslední studie dokládají, že ani u osob konvertujících cyklamát na cyklohexylamin⁴⁶ nebyla prokázána souvislost mezi dlouhodobou konzumací cyklamátu a neplodností mužů⁴⁷.

Neotam

Neotam je 30krát sladší derivát aspartamu (methyl ester *N*-(3,3-dimethyl)butyl-L- α -aspartyl-L-fenylalaninu), je stabilní i za vyšších teplot, proto se hodí na vaření i pečení. Poprvé byl připraven v roce 1991 ve Francii. Přibližně 20 až 30 % neotamu je absorbováno po požití z trávicího traktu. Jak absorbovaný, tak neabsorbovaný neotam je degradován deesterifikací na methanol a *N*-(3,3-dimethyl)butyl-L- α -aspartyl-L-fenylalanin a oba jsou rychle vylučovány močí a stolicí⁴⁸. Expozice methanolem z neotamu je toxikologicky nevýznamná v porovnání s dávkami přijímanými běžně v ovoci, zelenině a fermentovaných nápojích. Na rozdíl od aspartamu není metabolizován na derivát diketopiperazinu. Díky výsledkům desítek studií je neotam považován za bezpečné sladidlo pro všechny, dokonce i pro ty, kteří trpí fenylketonurií. Zatím se proti neotamu nezvedl odpor laické veřejnosti jako proti aspartamu pravděpodobně i díky tomu, že ještě není na trhu mnoho potravin a nápojů slazených tímto intenzivním sladidlem.

Alitam

Alitam (L- α -aspartyl-*N*-(2,2,4,4-tetramethyl-3-thietanyl)-D-alaninamid) je dipeptidové sladidlo druhé generace, je 10krát sladší než aspartam a nemá žádnou nepřijatelnou dochuť. Ve srovnání se sacharosou je asi 2000krát sladší. Je stálejší než aspartam, a tudíž pravděpodobně nalezne v potravinářství více použití. Alitam je v těle hydrolyzován na asparagovou kyselinu, která je normálně metabolizována, a na D-alaninamidovou část molekuly, která je z těla vylučována beze změny⁴⁸. V současné době je povolen v Mexiku, Kolumbii, Číně, Austrálii a na Novém Zélandu. Hodnota ADI byla stanovena na 1 mg/kg, ale z dávek konzumovaných v Austrálii a Novém Zélandu se zdá být pravděpodobné, že může být překračována. Takže je jasné, že výzkum bezpečnosti alitamu bude nadá-

le pokračovat, i když prozatím je věnována hlavní pozornost vědců analytickým metodám.

Advantam

Advantam (methyl ester *N*-[*N*-(3-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)propyl)-L- α -aspartyl]-L-fenylalaninu) je další sladký derivát aspartamu 20 000krát sladší než sacharosa a má statut GRAS. Má chuť podobnou aspartamu, s delší resistencí sladkého vjemu. Podle předpokládané spotřeby v USA je odhadován průměrný denní příjem advantamu na 1,2 mg/den (cit.⁴⁹). Advantam je v těle omezeně ze 4–23 % absorbován po hydrolyze esterové vazby v gastrointestinálním traktu. Po orálním podání je asi 80 % advantamu vylučováno stolicí. Toxicita byla studována u myši, krys, králíků a psů a jediným pozorováním bylo snížení hmotnosti a/nebo snížení kalorického využití potravin u skupiny zvířat s vysokými dávkami advantamu. Snížení příjmu potravin není obvykle považováno za toxikologicky významné, bylo nalezeno i u jiných sladidel⁴⁹. Biologickým studiím tohoto nového nízkokalorického sladidla bylo v roce 2011 věnováno celé číslo 49/S1 časopisu *Food and Chemical Technology*, proto laskavě čtenáře odkazujeme pro další podrobnosti na tento zdroj.

Steviol-glykosidy

Listy keřku *Stevia rebaudiana* zvaném též „the sweet herb of Paraguay“ obsahují více než 100 různých sloučenin⁵⁰, z nichž nejzajímavější jsou sladké látky steviosid, steviolbiosid a rebaudiosidy (Rebiana) obsažené v koncentraci 4–20 % hmotnosti suchých listů⁵¹. Pro účely tohoto článku je budeme uvádět pod společným názvem steviol-glykosidy. Steviol-glykosidy jsou komplexní molekuly, které obsahují 13-hydroxykaur-16-en-18-onovou kyselinu (steviol), na které je navázán různý počet glukosových jednotek. Steviol-glykosidy jsou hydrolyzovány střevní mikroflórou na steviol, který je v játrech konjugován s glukuronidem a poté vylučován zejména močí⁵². Hlavním světovým producentem je dnes Čína, která vyrábí ročně přes 12 tisíc tun. Hlavní komponenta, steviosid, je 300krát sladší než sacharosa. K uživatelským přednostem steviosidu patří jeho stabilita, dále fakt, že není upotřebitelný jako zdroj energie organismu, není karyogenní, mutagenní nebo teratogenní⁵³, ale i to, že může být používán diabetiky a pacienty s fenylketonurií.

Sacharin a jeho Na, K a Ca soli

Při studiu *o*-sulfabenzamidů objevili Konstantin Fahlberg a Ira Remsen náhodně sladkou chuť sacharinu (2,3-dihydro-3-oxobenzisosulfonazol) v roce 1878. Dnes se už nedovíme, kdo byl tím prvním ochutnávatelem. Pravdou zůstává, že Fahlberg dal látce název sacharin a razantně se pustil do komercializace, aniž by uvedl Remsen jako spoluautora patentu⁵⁴. Sacharin se vyrábí od roku 1901 a čas od času se vyskytují diskuse o jeho zdravotní závadnosti⁵⁵. Sacharin není lidským organismem metabolizován

a beze změny je vylučován hlavně močí, méně pak stolicí. Diskusi vyvolaly články dokládající vliv velkých dávek sodné soli sacharinu na vznik nádorů močového měchýře samců kryš⁵⁶. Velké dávky způsobily vznik sraženiny fosforečnanu vápenatého v močových cestách a při dlouhodobém podávání pak zřejmě podnítily vznik nádorů. Ovšem tento vliv není vlastní pouze sacharinu, ale byl pozorován i u jiných sodných solí, např. kyseliny askorbové. Krysy jsou zvláště citlivé ke vzniku nádorů močového měchýře, ale u lidské populace nikdy podobný vliv nebyl zaznamenán. Sacharin je extrémně stabilní a představuje tak sladidlo univerzálně použitelné v mnoha potravinářských výrobcích i pro přímou konzumaci. Je výhodné konzumovat sacharin ve směsi s jinými sladidly, protože sám má poněkud nepříjemnou kovovou dochuť.

Acesulfam K

Náhodný objev sladké chuti 5,6-dimethyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on-2,2-dioxidu v roce 1967 vedl k syntéze řady derivátů, z nichž právě draselná sůl 6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on-2,2-dioxidu se stala průmyslově vyráběným sladidlem. Acesulfam K je stabilní i za vyšších teplot, proto se hodí i na vaření a pečení. Má rychlý náběh sladké chuti, která přetrvává jen po dobu konzumace jídla. Ve vodných roztocích a vyšších koncentracích má hořkou příchut'. V lidském těle není metabolizován a je rychle vylučován zejména močí. Je prokazatelně netoxický, není mutagenní ani karyogenní. Tak jako u ostatních sladidel i pro acesulfam K jsou čas od času analyzovány výsledky vědeckých studií a žádné nepříznivé vlivy nebyly identifikovány ani v posledním přehledu z roku 2000. Oficiální autority tak znovu potvrdily nezávadnost tohoto sladidla.

5. Závěr

V dnešní době si jak konzument, tak potravinář i technolog může vybrat z široké palety sladidel a přídavných látek ať již z hlediska chuti, intenzity sladivosti, výživného a glykemického potenciálu, vedlejších účinků atd., protože nabídka je zde více než široká. Ekonomický tlak na straně jedné a dietní výhrady vůči sladidlům s vyšším glykemickým indexem na straně druhé tlačí výrobce potravin k tomu, že nahrazují klasický cukr čímkoliv, co je lacinější, nebo dietnější. Když si k tomu přičteme laické názory na zdravou výživu zdatně podporované informacemi z Internetu, je jasné, že diskuse o tak nápadné položce potravních aditiv, jakými jsou intenzivní sladidla, bude i v budoucnosti pokračovat měrou neztenčenou.

I pro sladidla, podobně jako pro další složky potravin, bude ale stále platit základní výživové doporučení „všeho s mírou“.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305.

LITERATURA

- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).
- Moravcová J.: Chem. Listy 95, 202 (2001).
- Jambal I., Kefurt K., Moravcová J.: Chem. Listy 106, 283 (2012).
- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 895 (2007).
- Hampl F., Moravcová J., Čopíková J., Opletal L., Lapčík O., Drašar P.: Chem. Listy 103, 15 (2009).
- Lapčík O., Opletal L., Moravcová J., Čopíková J., Drašar P.: Chem. Listy 105, 452 (2011).
- Opletal L., Wimmer Z., Čopíková J., Lapčík O., Moravcová J., Cahliková L., Drašar P.: Chem. Listy 105, 761 (2011).
- Čopíková J., Moravcová J., Lapčík O., Opletal L., Drašar P.: Chem. Listy 105, 938 (2011).
- Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahliková L.: Chem. Listy 106, 113 (2012).
- Wimmer Z., Opletal L., Čopíková J., Moravcová J., Abdulmanea K. S. O., Lapčík O., Drašar P.: Chem. Listy 106, 926 (2012).
- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: Chem. Listy 101, 1002 (2007).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
- Rippe J. M., Angelopoulos T. J.: Adv. Nutr. 4, 236 (2013).
- Bray G. A., Nielsen S. J., Popkin B. M.: Am. J. Clin. Nutr. 79, 537 (2004).
- Cohen R.: Nat. Geogr. 8, 82 (2013).
- Walters D. E.: The Sweetener Book, D. Eric Walters 2013, North Chicago, IL; <http://www.sweetenerbook.com/index.html> (staženo 25/2 2013).
- Carbohydrates in human nutrition. (FAO Food and Nutrition Paper - 66), Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome 1997 (Reprinted 1998); <http://www.fao.org/docrep/W8079E/w8079e00.htm#Contents>; (staženo 26/2 2013).
- Sugar and Sweetener Guide; <http://www.sugar-and-sweetener-guide.com/> (staženo 27/2 2013).
- O'Donnell K., Kearsley M. W.: *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, Wiley-Blackwell, Oxford 1012.
- Codex Alimentarius, International Food Standards, <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/en/> (staženo 5/8 2013).
- Zákon ČR 110/1997 Sb.
- Hess J., Latulippe M. E., Ayoob K., Slavin J.: Food Funct. 3, 477 (2012).
- Wiebe N., Padwal R., Field C., Marks S., Jacobs R.,

- Tonelli M.: *BMC Medicine* 9, 123 (2011); <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/123>. (staženo 5.8.2013).
25. Te Morenga L., Mallard S., Mann J.: *Brit. Med. J. Open* 345, 7492 (2012).
 26. DiMeglio D. P., Mattes R. D.: *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 794 (2000).
 27. van Baak M. A., Astrup A.: *Obes. Rev.* 10, 9 (2009).
 28. Dolan L. C., Potter S. M., Burdock G. A.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 53 (2010).
 29. Sievenpiper J. L., de Souza R. J., Mirrahimi A., Yu M. E., Carleton A. J., Beyene J., Chiavaroli L., Di Buono M., Jenkins A. L., Leiter L. A., Wolever T. M. S., Kendall C. W. C., Jenkins D. J. A.: *Ann. Intern. Med.* 156, 291 (2012).
 30. Slavin J.: *Nutr. Rev.* 70 (Suppl. 2), S111 (2012).
 31. Hess J., Latulippe M. E., Ayoob K., Slavin J.: *Food&Funct.* 3, 477 (2012).
 32. Freeman L.: *Leatherhead Food Trends*, 2011 Food and drink trends, <http://www.leatherheadfood.com/2011-food-and-drink-trends> (staženo 5/8 2013).
 33. Butchko H. H., Stargel W. W., Comer C. P., Mayhew D. A., Benninger C., Blackburn G. L., de Sonnevile L. M. J., Geha R. S., Hertelendy Z., Koestner A., Leon A. S., Liepa G. U., McMartin K. E., Mendenhall C. L., Munro I. C., Novotny E. J., Renwick A. G., Schiffman S. S., Schomer D. L., Shaywitz B. A., Spiers P. A., Tephly T. R., Thomas J. A., Trefz F. K.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35, S1 (2002).
 34. <http://www.sladkypolibek.com/sladkypolibek/Jed%20zvany%20aspartam.htm> (staženo 5/8 2013).
 35. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf (staženo 1.6.2013).
 36. Brusick D., Grotz V. L., Slesinski R., Kruger C. L., Hayes A. W.: *Food Chem. Toxicol.* 48, 3067 (2010).
 37. Brown A. W., Bohan Brown M. M., Onken K. L., Beitz D. C.: *Nutr. Res.* 31, 882 (2011).
 38. Grotz V. L., Munro I. C.: *Regul. Tox. Pharm.* 55, 1 (2009).
 39. Abou-Donia M. B., El-Masry E. M., Abdel-Rahman A. A., McLendon R. E., Schiffman S. S.: *J. Toxicol. Environ. Health* 71, 1415 (2008).
 40. Brusick D., Borzelleca J. F., Gallo M., Williams G., Kille J., Hayes A. W., Pi-Sunyer F. X., Williams C., Burks W.: *Regul. Tox. Pharm.* 55, 6 (2009).
 41. Oser B. L., Carson S., Cox G. E., Vogin E. E., Sternberg S. S.: *Toxicology* 4, 315 (1975).
 42. Takayama S., Renwick A. G., Johansson S. L., Thorgeirsson U. P., Tsutsumi M., Dalgard D. W., Sieber S. M.: *Toxicol. Sci.* 53, 33 (2000).
 43. Renwick A. G., Thompson J. P., O'Shaughnessy M., Walter E. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 367 (2004).
 44. Serra-Majem L., Bassas L., Garcia-Glossas R., Ribas L., Ingles C., Casals I., Saavedra P., Renwick A. G.: *Food Addit. Contam.* 20, 1097 (2003).
 45. Kroger M., Meister K., Kava R.: *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 5, 35 (2006).
 46. Otabe A., Fujieda T., Masuyama T., Ubukata K., Lee C.: *Food Chem. Toxicol.* 49, 52 (2011).
 47. Wölwer-Rieck U.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 886 (2012).
 48. Geuns J. M. C.: *Phytochemistry* 64, 913 (2003).
 49. Urban J. D., Carakostats M. C., Brusik D. J.: *Food Chem. Toxicol.* 51, 386 (2013).
 50. Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K.: *Food Chem.* 132, 1132 (2012).
 51. Pearson R. L.: *Saccharin. V knize: Alternative Sweeteners*, (Nabors L.O., ed.), str. 147. Marcel Dekker, New York 2001.
 52. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 73, Lyon 1999. <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/b11242m> (staženo 5.8.2013).
 53. Arnold D. L., Moodie C. A., Grice H. C., Charbonneau S. M., Stavric B., Collins B. T., Mcguire P. F., Zawadzka Z. Z., Munro I. C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 52, 113 (1980).

J. Čopíková^a, J. Moravcová^b, Z. Wimmer^{b,c}, L. Opletal^d, O. Lapčík^b, and P. Drašar^b (^aDepartment of Carbohydrates and Cereals, ^bDepartment of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague; ^cInstitute of Experimental Botany AS CR, Prague; ^dDepartment of Pharmaceutical Botany and Ecology, Charles University in Prague): **Artificial Sweeteners**

A brief survey of the artificial sweeteners and their properties and use aims to show the importance of this group of mainly renewable materials, to contribute to the knowledge of the practical chemistry that can be utilized, among others, in food and pharmaceutical industry. The article is also aimed as a teaching tool for teachers and students.

REZISTENTNÍ A POMALU STRAVITELNÝ ŠKROB

EVŽEN ŠÁRKA^a, PETRA SMRČKOVÁ^a
a LENKA SEILEROVÁ^b^a Ústav sacharidů a cereálií, ^b Ústav chemie pevných látek,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
evzen.sarka@vscht.cz

Došlo 25.2.13, přepracováno 24.6.13, přijato 12.7.13.

Klíčová slova: rezistentní škrob, pomalu stravitelný škrob, stravitelnost škrobu, chemicky modifikované škroby, extruze

Obsah

1. Úvod
2. Stravitelnost škrobu
3. Rezistentní škrob a možnosti zvýšení jeho obsahu
4. Pomalu stravitelný škrob
5. Využití škrobů s upravenou stravitelností škrobu v potravinářství a ve farmacii

1. Úvod

Škrob patří mezi fyziologicky a hospodářsky nejdůležitější polysacharidy. Vyskytuje se v podobě diskrétních částic, tzv. škrobových zrn, která se ukládají v zásobních orgánech rostlin. Škrobová zrna jsou unikátní pro rostlinný druh, ze kterého pochází, a liší se vnějším vzhledem, che-

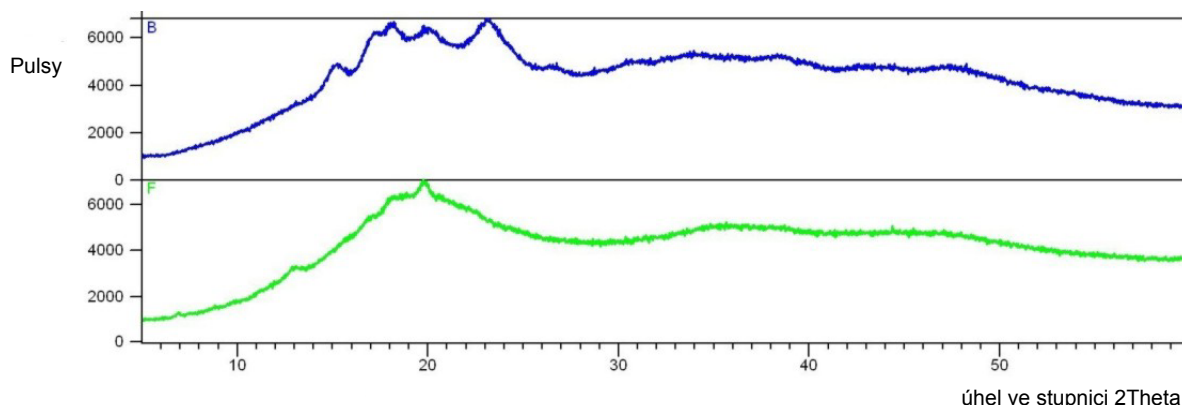
mickou strukturou, vlastnostmi a distribucí velikosti částic.

Škrob je hlavní energetickou složkou lidské potravy a významně ovlivňuje funkční vlastnosti potravin – je využíván k zahušťování potravin a k úpravě jejich textury. Mimo to se škrob využívá v papírenském a textilním průmyslu a při chemických a biochemických aplikacích. Ve farmaceutickém průmyslu je dominantní jeho použití jako excipientu např. jako pojiva, plniva či rozvolňovadla. Je studován i jako pomocná látka v nových formulacích léků s řízeným uvolňováním.

Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany – lineární amylosa s α -D(1 $\rightarrow$ 4) vázanými glukosovými jednotkami a větvený amylopektin, obsahující α -D(1 $\rightarrow$ 4) a α -D(1 $\rightarrow$ 6) vazby.

Poměr těchto polysacharidů, který se liší u škrobů různého původu, ovlivňuje řadu fyzikálních vlastností. U cereálních škrobu se obsah amylosy pohybuje v rozmezí 25–28 %, přičemž škroby některých modifikovaných genotypů kukuřice, ječmene nebo pšenice mají obsah amylosy zvýšený až na 70 %. Obsah amylosy v bramborách kolísá obvykle v rozmezí 17–21 % (cit.¹) a rýžový škrob obsahuje 15–20 % amylosy². Luštěninové škroby jsou charakteristické vysokým obsahem amylosy, např. u polního hrachu se uvádí rozmezí 33–50 %, u geneticky modifikovaných odrůd 8–72 %, a v dřeňovém hrachu 61 až 88 % (cit.³).

Cereální škroby, konkrétně pšenice, ječmen, žito a tritikale, mají ve srovnání s hlízovými škroby dva typy škrobových zrn – větší zrna A-škrobu a menší zrna B-škrobu. Tyto dvě skupiny škrobových zrn se liší tvarem, chemickým složením, molekulární strukturou amylopektinu, způsobem uložení ve škrobovém znu a dalšími vlastnostmi⁴.



Obr. 1. Rentgenový difraktogram průmyslově vyrobeného pšeničného B-škrobu; B – nativní škrob, F – škrob po zmazovatění a usušení⁶

Škrobová zrna jsou nerozpustná ve studené vodě, ale mohou absorbovat molekuly vody (botnat) a při nahřívání vodné suspenze botnají mnohem energičtěji. Tento proces, tzv. mazovatění (želatinace), je charakteristický fázovým přechodem škrobových zrn z uspořádaného stavu do neuspořádaného⁵ působením intenzivních vibrací molekul, které roztěpí původní inter- a intramolekulární vodíkové vazby, takže se škrob stává amorfním (obr. 1). Molekuly vody pronikají dovnitř zrna současně s uvolňováním molekul amylosy do vodného prostředí. Disperze po ukončení procesu obsahuje zbytky nabídných skeletů škrobových zrn a molekulárně dispergované částice (především amylosy), což se projevuje v tokovém chování.

2. Stravitelnost škrobu

Nutriční hodnota škrobu souvisí se strukturou molekuly a s modifikací upravující biologickou dostupnost – mechanickou, tepelnou nebo chemickou. Podle úrovně stravitelnosti může být škrob rozdělen do tří kategorií: rychle stravitelný škrob (rapidly digestible starch – RDS), pomalu stravitelný škrob (slowly digestible starch – SDS) a rezistentní škrob (resistant starch – RS)⁷. RDS úzce souvisí s glykemickým indexem, u kterého se předpokládá, že zvyšuje pravděpodobnost vzniku cukrovky a prediabetes, kardiovaskulárních chorob a obezity⁸.

Amylolýza škrobu je v tenkém střevě realizována α -amylasou ze slinivky břišní (α -1,4 glukano-4-glukanohydrolasou, EC 3.2.1.1), hydrolyzující vazby α -D(1 $\rightarrow$ 4). Na rozdíl od hydrolýzy amylosy, která je náhodně štěpena na maltooligosacharidy, působení α -amylasy na amylopektin není náhodné: jeho výslednými produkty jsou maltosa, maltotriosa a větvené α -hraniční dextriny obsahující všechny původní vazby α -D(1 $\rightarrow$ 6) a sousední vazby α -D(1 $\rightarrow$ 4). Amylosa je trávena pomaleji a v menší míře než amylopektin. Bylo prokázáno, že glykemická odezva amylosy je menší, než u stejného množství amylopektinu.

Rychle a pomalu stravitelné škroby jsou ve výsledku zcela hydrolyzovány. Tepelně modifikované (předželatinované) škroby jsou tráveny rychleji, ale neliší se energetickou (kalorickou) hodnotou od nativních škrobů s výjimkou rezistentních škrobů. Naproti tomu rezistentní škrob není rozštěpen enzymy v tenkém střevě, ale přechází až do tlustého střeva. RS se tak řadí mezi nevyužitelné polysacharidy, má tedy podobnou funkci jako vláknina, do které bývá i zařazován. V tlustém střevě však může být střevní mikroflórou metabolizován na sekundární produkty.

Na rozdíl od vlákniny nepůsobí tak hrubým chuťovým vjemem. Denní příjem RS není u nás vysoký – asi 3,2 g v porovnání s doporučenou dávkou 5 g. Rezistentní škrob nejenže snižuje energetickou hodnotu stravy, ale může hrát důležitou roli v prevenci kolorektálního karcinomu, jehož výskyt v České republice je značný.

Stravitelnost škrobu ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří původ (zdrojová rostlina), velikost škrobových zrn, poměr amylosy a amylopektinu, rozsah molekulárních asociací mezi složkami škrobu, typ a stupeň krystalinity,

délka řetězce amylosy, molekulární struktura amylopektinu a přítomnost amyloso-lipidových komplexů. V úvahu by rovněž měly být brány morfologie a ultrastruktura, jde např. o měrný povrch, kanálky a porozitu škrobových zrn⁹.

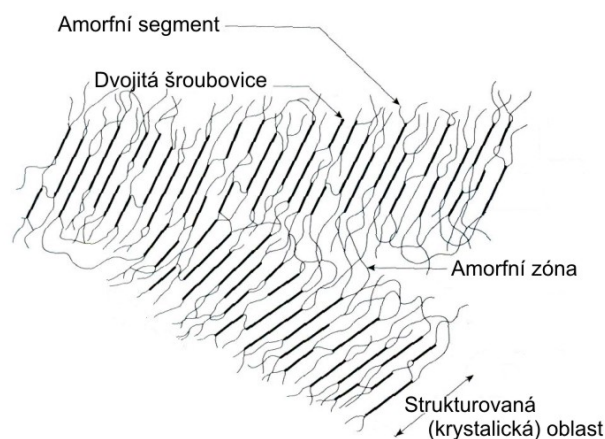
Měrný povrch souvisí s distribucí velikosti částic, která je charakteristická pro danou plodinu¹⁰, ve škrobářenských technologiích ji lze jen mírně upravit buď volbou vhodné odrůdy nebo úpravou nastavení separační stanice¹¹.

Škrob typu B (podle difrakčních obrazců rentgenového záření)¹² má nejvíce bodů větvení seskupeno v amorfní oblasti, a proto snadněji podléhá enzymové hydrolýze. Oproti tomu banánový škrob typu C je odolný vůči enzymové hydrolýze, vytváří Naegeliho dextrin (se stupněm polymerace přibližně 25) s méně větvenými řetězci než škroby typu A (cit.¹³).

3. Rezistentní škrob, zdroje a možnosti zvýšení jeho obsahu

Rezistentní škrob se člení do čtyř primárních kategorií:

- RS1 je fyzikálně nepřístupný škrob, např. škrob v luštěninách, kde je součástí materiálu buněčných stěn nebo proteinové matrice a není přístupný enzymové hydrolýze.
- RS2 je nativní škrob obsažený ve škrobových zrnech s typem krystalinity B nebo C (např. škrob ze syrových nikoliv uvařených brambor, z banánů a vysoceamylosový kukuřičný škrob).
- RS3 je retrogradovaná amylosa. RS3 je škrob nejprve zmazovatělý, amylosa je následkem zmazovatění uvolněna do roztoku jako nahodile uspořádané šroubovice, ty po ochlazení reasociují za vzniku dvojitých šroubovic, stabilizovaných vodíkovými vazbami (obr. 2), kde závit o výšce 20,8 Å obsahuje šest glukosových jednotek¹⁴. Tyto dvojšroubovice vznikající retrogradací vytvářejí hexagonální krystalickou struk-



Obr. 2. Model retrogradované amylosy, tenčí čáry označují řetězce glukosových jednotek propojených glykosidovou vazbou α -D(1 $\rightarrow$ 4), silné čáry symbolizují dvojité šroubovice¹⁹

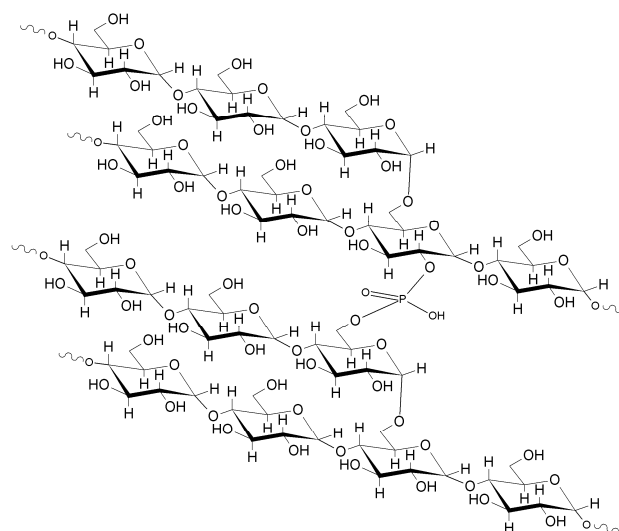
turu, která brání přístupnosti α -amylasy ke glykosidovým vazbám. Běžná tepelná úprava potravin s obsahem RS3 nepůsobí disociaci amylosové krystalinity, proto krystalinická amylosa zůstává velmi rezistentní k enzymové hydrolýze.

- RS4 je chemicky modifikovaný škrob.

Škroby RS1 a RS2 jsou po vhodné tepelné úpravě stravy pomalu, ale zcela stravitelné, kdežto škrob RS3 brání trávení úplně. Obsah rezistentního škrobu typu RS2 lze zvýšit např. zahříváním vodné suspenze obsahující vysoceamylosová škrobová zrna v přítomnosti inhibitorů mazovatění¹⁵, zahříváním s minimálním množstvím vody¹⁶ nebo zahříváním v kyselých vodných roztocích alkoholu¹⁷.

Obsah rezistentního škrobu RS3 lze zvýšit např. opakovaným náhřevem suspenze v autoklávu a následným chlazením. Buď se využívá škrob s vysokým obsahem amylosy (u amylokukuřičného škrobu se uvádí výtěžek až 48 %) nebo se enzymově rozštěpí vazby α -D-(1 $\rightarrow$ 6) v amylopektinu (po ukončení hydrolýzy zbývají v roztoku lineární řetězce amylosy, s výtěžkem až 47 %)¹⁸. Další možností je využít mazovatění škrobu za podmínek velmi vysokého tlaku s předchozím využitím kyselé hydrolýzy nebo extruze škrobu.

Obsah RS4 ve škrobu lze zvýšit např. kyselou hydrolýzou škrobu z amyloječmene a opakovaným náhřevem a chlazením²⁰. Chemická modifikace škrobu často předpokládá zesíťování škrobu, např. podle patentu²¹ reakcí škrobu s fosforečnanem, druhou možností je reakce s POCl_3 při násobně vyšší koncentraci činidla než u obvyklého potravinářského fosforečnanového diesteru škrobu (obr. 3).



Obr. 3. Diester škrobu s kyselinou fosforečnou

Lze využít i kombinaci kyselé modifikace, annealingu a zesíťování²² nebo prostou acetylaci. Hydrofobní acetylovaný škrob s požadovaným stupněm substituce > 2 nalézá uplatnění i při vytváření fólií biodegradabilních kompozitů na bázi škrobu, přičemž zajišťuje možnost jejich využití ve vlhkém prostředí²³. Řada těchto reakcí může být realizována pomocí extruze za vhodných reakčních podmínek.

Tabulka I

Obsah rezistentního škrobu (RS) v luštěninách a izolovaných škrobech

Zdroj rezistentního škrobu	Obsah RS [% suš.]		Lit.
	v surovém stavu	po tepelném zpracování	
Fazol zahradní (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	2,0 ^b	6,0–6,5 ^b	28
Fazol obecný (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	0,9 ^b	4,3–4,7 ^b	28
<i>Vigna aconitifolia</i>	12,2	3,2–3,9	30
<i>Macrotyloma uniflorum</i>	26,4	5,0–5,2	30
Fazol mořský (<i>Vigna mungo</i>)	19,7	3,4–3,6	30
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)	–	1,7–3,4; 6,1; 5	31,24,29
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>) – mutant 33 % amylosy	–	5,1	31
Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>) – mutant 65 % amylosy	–	9,2–9,6	31
Čočka (<i>Lens culinaris</i>)	–	8,6 ^c	29
Škrob izolovaný z fazolu zahradního (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	2,3 ^a	19,9 ^a	28
Škrob izolovaný z vigny adzuki (<i>Vigna angularis</i>)	1,8 ^a	22,3 ^a	28
Škrob izolovaný z fazolu obecného (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	2,1 ^a	32,3 ^a	28
Škrob izolovaný z hrachu (<i>Pisum sativum</i>)	31,5	–	32

^a Přepočteno na 95 % suš., ^b přepočteno na 93 % suš., ^c po uvaření a vychlazení

Jednou ze zajímavých funkcí rezistentního škrobu (s výjimkou některých zvlášť odolných rezistentních škrobů např. ze skupiny RS4) je jeho fermentace mikroorganismy v tlustém střevě na monokarboxylové kyseliny s krátkým alifatickým řetězcem (short chain fatty acids – SCFAs). Tyto kyseliny jsou známy jako hlavní nutrient epiteliálních buněk tlustého střeva, přičemž např. nedostatek butyrátů zvyšuje riziko rakoviny. SCFAs mají pozitivní efekt na zlepšenou absorpci hořčíku a vápníku, pravděpodobně díky jejich vyšší rozpustnosti v kyselejších prostředích^{24,25}. Mají rovněž příznivý vliv na rovnováhu bakteriálních druhů, tzn. především *Bifidobakterií* a *Laktobacilů*, které zamezují rozvoji patogenních bakterií²⁶; což se projevuje zlepšením bakteriálního metabolismu solí žlučových kyselin²⁷. Metabolismus SCFAs může přispívat ke zlepšení kontroly glykémie a zlepšení metabolismu lipidů u diabetiků, což souvisí s tím, že rezistentní škrob snižuje postprandiální glukosovou a insulinovou odezvu.

Obsah rezistentního škrobu je vysoký zejména v luštěninách a škrobech izolovaných z nich (tab. I). Po tepelném zpracování obsah rezistentního škrobu u luštěnin

s vysokým obsahem rezistentního škrobu klesá, naopak u luštěnin s nižším obsahem rezistentního škrobu dochází k vysokému nárůstu po tepelné úpravě (např. u fazolu obecného až na 32,3 % suš.), což bude souviset s retrogradací amylosy, na kterou je luštěninový škrob bohatší. Největší nárůst RS po tepelném zpracování byl zjištěn u izolovaného škrobu, což bude souviset s tím, že tento škrob byl již vyčleněn z proteinové matrice. Údaje pro izolované škroby vyžadují ověření, protože např. údaje o obsahu RS v nativním fazolovém škrobu²⁸ oproti očekávání nekorespondují s údaji o obsahu hrachového škrobu od jiného autora²⁹, tzn. ve škrobech podobného typu.

RS je obsažen i v moukách, rýži, bramborách a cereálních výrobcích (tab. II). U cereálních produktů (např. u žitno-pšeničného chleba nebo pečiva) dochází po tepelném zpracování k nárůstu obsahu rezistentního škrobu, což opět souvisí s retrogradací amylosy (viz skladovaný chléb). Rezistence škrobu při trávení může být tedy způsobena i přípravou či skladováním potravin.

Spotřeba rezistentního škrobu se v různých zemích významně liší. Denní příjem v EU je 3 až 6 g, v USA 3 až

Tabulka II

Obsah rezistentního škrobu (RS) v moukách, škrobech, cereálních výrobcích a dalších potravinách

Zdroj rezistentního škrobu		Obsah RS [% suš.]	Lit.
Pšeničná mouka		0,35–0,45; 2,4	33,29
Ječná mouka		0,6	33
Kukuřičná mouka		1,6	33
Banánová mouka		56	29
Pšeničný škrob		3,1	32
Bramborový škrob		60,8	32
Pšeničné vločky		1,0	33
Střídky pšeničného chleba		0,6; 2,1	31, 24
Žitno-pšeničný chléb		2,6–4,2	33
Pšeničný tmavý		1,5	33
Chléb s 50% přídavkem vysoceamylosové pšeničné mouky		3,0	34
Chléb s 50% přídavkem vysoceamylosové pšeničné mouky, po 5 dnech uskladnění		16,8	34
Bagety, rohlíky, housky		2,3–3,0 ^b 1,2–1,8	35
Přesnídávkové cereálie		0,0–2,3	35
Krekery		1,2–1,3 ^a 1,06	35,33
Sušenky		0,3–1,8 ^a ; 0,13	35,33
Knäckebröt		0,82	33
Brambory	v surovém stavu	70	29
	po tepelné úpravě	2,7–3,1; 0,7	24,29
Rýže	v surovém stavu	5,8–11,0	2
	po tepelné úpravě	1,1–1,9	24
Těstoviny po tepelné úpravě		1,2–1,9; 4,7	24,29

^a Přepočteno na 97 % suš., ^b přepočteno na 43 % suš.

8 g (tedy mírně vyšší než v ČR), 5–7 g v Austrálii a 10–18 g v Indii a Číně³⁶. Chléb přispívá k denní spotřebě RS 21 %, další obilné produkty jako těstoviny 19 % a zelenina (jiná než luštěniny) přispívá 19 % celkového příjmu RS³⁷.

Obsah rezistentního škrobu se stanovuje enzymovými metodami *in vitro* – buď přímo³⁸ nebo nepřímo po odečtení obsahu RS a SDS⁷, další možností je sledování *in vivo*.

4. Pomalu stravitelný škrob

SDS je tráven v tenkém střevě člověka za dobu 20 až 120 min (cit.³⁹). Předností SDS je pomalý nárůst postprandiální hladiny glukosy v krvi, přičemž její hladinu udržuje na konstantní úrovni. Oproti tomu křivka rychle stravitelného škrobu má vysoké maximum a následný rychlý pokles. Hormonální a metabolické odezvy odpovídají postprandiální glykémii. Pozitivní důsledky SDS se projevují ve fyzické a duševní výkonnosti organismu, v pocitu sytosti a umožňují řízení diabetu.

Maximální obsah SDS 44 % byl zjištěn⁴⁰ ve škrobu z voskové (waxy) rýže, tzn. u škrobu s vysokým obsahem amylopektinu, takže svoji roli tedy hraje zvýšení podílu vazeb α -D(1→6). Podobné hodnoty byly také pozorovány u zmazovatělého škrobu pocházejícího z voskového čiroku, který byl degradován pomocí isoamylasy⁴¹. Dalšími příklady SDS odlišného původu jsou nativní kukuřičný škrob, škrob s optimalizovanou retrogradací a škrob v optimalizované potravinové matici. U cereálních výrobků ovlivňuje tvorbu SDS stupeň zmazovatění, který závisí na obsahu vlhkosti těsta, době a teplotě tepelného procesu. Např. u sušenek s velmi nízkým obsahem vlhkosti je stupeň zmazovatění snížen, takže škrob obsahuje jak zmazovatělý škrob, tak i nedotčená škrobová zrna, což má za důsledek vyšší obsah SDS v porovnání s běžnými pečárenskými výrobky³⁵. Oproti tomu je u chleba, kde se k přípravě těsta používá značně vyšší podíl vody, poměr SDS:RDS 1:10, oproti výchozímu poměru 1:1 v mouce³⁹.

SDS lze dělit na dva druhy podle odlišné struktury molekuly amylopektinu: amylopektin s vyšším stupněm větvení obsahujícím velmi krátké řetězce, který příliš nepodléhá retrogradaci, a amylopektin s větším podílem vnitřních dlouhých řetězců, který naopak retrogradaci podléhá a je tráven pomaleji.

Obsah pomalu stravitelného škrobu se stanovuje enzymovou metodou⁷.

5. Využití škrobů s upravenou stravitelností v potravinářství a ve farmacii

Rezistentní škroby hrají významnou roli v prevenci různých chorob, např. cukrovky. V Číně je proto doporučována konzumace celých zrn obilovin (hnědé rýže, pšenice, ječmene, pohanky, ovesa, ad.), neboť jsou cenným zdrojem deficitních živinových látek, jako je vláknina, rezistentní škrob, vitaminy skupiny B, vitamin E, zinek, měď,

hořčík, fenolické sloučeniny atd.⁴². Toto platí pro jejich konzumaci v syrovém stavu, při použití moderních potravinářských procesů se rezistentní škrob většinou rozkládá⁴³.

V současné době, aby bylo dosaženo pozitivních účinků na zdraví, vzrůstá u spotřebitelů zájem o celozrnné produkty. V nich by mohla být nahrazena (částečně nebo úplně) vláknina rezistentním škrobem odolným vůči tepelnému rozkladu. Na rozdíl od vlákniny RS nevyvolává nepříjemnou příchut', tmavnutí či zmenšení objemu pečiva. Kromě tradičního pečiva byly zkoušky prováděny např. na koláčích, kde se osvědčilo kombinovat přísadek vlákniny a rezistentního škrobu²³.

Podobně byl zkoušen doplněk rezistentního banánového škrobu do těstovin, s cílem zvýšit jejich nutriční hodnotu (snížit množství využitelné energie). Teprve při překročení obsahu 15 % surovin došlo ke zmenšení průměru uvařených špaget, do této hodnoty si zachovávaly standardní parametry, přičemž se senzorická kvalita dokonce zlepšila⁴⁴.

RS na bázi kukuřice dovážený do České republiky z USA nevyklučuje riziko, že by mohl pocházet z geneticky modifikované plodiny. Pro zajištění bezpečných potravin bude proto vhodné se zabývat výzkumem v této oblasti.

Ačkoli dosud byly prováděny mnohé zkoušky s rezistentním škrobem jen na zvířatech, zvažuje se zařazení rezistentního škrobu i jako prebiotika⁴³. Rezistentní škrob lze tak využít např. v jogurtech⁴⁵ jako synbiotikum (probiotická potravinová doplněná prebiotiky).

RS může být podáván jako podstatná složka stravy na rozdíl od želírujících látek na bázi polysacharidů (např. guarová guma nebo psyllium).

Při určitém charakteru tepelného zpracování cereálií lze dosáhnout i zvýšení obsahu rezistentního škrobu či pomalu stravitelného škrobu. Jde např. o výrobu přesnídávkových (snídaňových) cereálií, u nichž jsou udávány hodnoty glykemického indexu (40–60), tyto výrobky jsou proto nutričně mnohem výhodnější v porovnání s bílým pečivem. Další skupinou potravin jsou sušenky či oplatky, které jsou vyráběny s velmi nízkou vlhkostí těsta. Tradičním extrudovaným výrobkem s vysokým obsahem SDS a RS jsou kukuřičné lupinky, které se využívají jako tzv. přesnídávkové (snídaňové) cereálie.

Extruze se v cereálním průmyslu využívá především k výrobě produktů s vysokým obsahem vlákniny⁴⁶, při kterých dochází naopak ke zvýšení stravitelnosti škrobu. Tento proces nabízí mnoho výhod v porovnání s klasickým tepelným zpracováním, např. jde o možnost zajištění velkého sortimentu výrobků, o krátkou dobu technologického zpracování, využití i levnějších surovin a menší energetickou náročnost. Extruze s cílem vyrobit RS nebo SDS z nativního škrobu vyžaduje obvykle teploty < 100 °C při nepříliš vysokém tlaku. Dochází tak k vytvoření tvrdého, křehkého a amorfního materiálu.

Ve farmaceutickém průmyslu se často využívá inkorporace částicového plniva do polymerní matrice léku, čímž se dosahuje zlepšení jeho užitelských vlastností. Biopolymerní matrice na bázi škrobu jsou dostupné, levné, obnovitelné, a také biologicky rozložitelné⁴⁷, ale jsou poměrně

citlivé na vlhkost a společně s některými materiály se rozpouští velmi rychle.

Podle parametrů extruze se liší výsledný disoluční profil léčivé látky z lékové formy. Pokud je extruze aplikována na nativní škroby při vyšších teplotách, škrob přechází do disperze, což může být v některých aplikacích zajímavé. Biologická dostupnost obtížně rozpustných léků tak např. může být zvýšena inkorporací porézního škrobu⁴⁸. Lze připravit extrudáty s již integrovaným léčivem^{49,50}.

Rezistentní škrob lze použít i jako filmotvornou látku či jako plnivo do pevných lékových forem, a tím usměrnit rozpad tablety a absorpci léčivé látky až v tlustém střevě. Pomalu stravitelný škrob se hydrolyzuje už v tenkém střevě, což umožňuje postupné uvolňování léčivé látky. Horškovou extruzí lze připravit kulovité granule s řízenou dobou uvolňování⁵¹. Takovéto pelety připravené z „waxy“ kukuřičného škrobu byly během disolučního experimentu narušovány, zatímco mechanismus uvolňování léčiv z kukuřičného, hrachového a bramborového škrobu na bázi extruze byl primárně založen na botnání.

Návrh materiálů na bázi škrobu pro léčiva je vzhledem k vysoké hydrofililitě škrobu limitován. Vhodnou substitucí hydroxylových skupin lze připravit hydrofobní materiál, např. škrob s vysokým stupněm acetylce, který snižuje rychlost biodegradace⁵².

Disoluční testy léčivé látky z lékové formy se provádějí pomocí trávicích enzymů podle očekávaného místa absorpce lékové formy. Disoluční profil je stanoven jako množství uvolněné látky v závislosti na čase. Tento postup lze využít pro pevné lékové formy i pro extrudáty v tobolkách.

Přehledný článek byl zpracován v rámci řešení projektu výzkumu a vývoje QJ1310219.

LITERATURA

- Pérez S., Bertoft E.: *Starch/Stärke* 62, 389 (2010).
- Benmoussa M., Moldenhauer K. A. K., Hamaker B. R.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 1475 (2007).
- Ratnayake W. S., Hoover R., Shahidi F., Perera C., Jane J.: *Food Chem.* 74, 189 (2001).
- Šárka E., Bubník Z.: *Chem. Listy* 104, 318 (2010).
- Babić J., Šubarić D., Miličević B., Ačkar D., Kopjar M., Tiban N. N.: *Czech J. Food Sci.* 27, 151 (2009).
- Šárka E., Koláček J., Sikora A., Hrušková K., Prokopová D., Hrabal R., Maixner J., Bubník Z.: *Proc. 6th Int. Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Praha, 29.9.-1.10.2010* (Řápková R., Čopíková J., Šárka E., ed.), str. 200.
- Englyst H. N., Kingman S. M., Cummings J. H.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 46 (Suppl. 2), S33 (1992).
- Ludwig D. S.: *J. Nutr.* 130, 280 (2000).
- Zhang P., Hamaker B. R.: *Carbohydr. Polym.* 87, 1552 (2012).
- Šárka E., Bubník Z.: *Starch/Stärke* 61, 457 (2009).
- Šárka E.: *Listy cukrov. a řep.* 128, 307 (2012).
- Sarko A., Wu H.-C. H.: *Starch/Stärke* 30, 73 (1978).
- Jane J.-L., Wong K.-S., McPherson A. E.: *Carbohydr. Res.* 300, 219 (1997).
- Hoover R., Zhou Y.: *Carbohydr. Polym.* 54, 401 (2003).
- Chiu C.-W., Shi Y.-C., Sedam M.: US 5 902 410 (1999).
- Shi Y.-C., Trzasko P.T.: EP Appl. 747 397 (1996).
- Binder T. P., McClain J. A.: US 7 744 944 (2010).
- Berry C. S.: *J. Cereal Sci.* 4, 301 (1986).
- Leloup V. M., Colonna P., Ring S. G., Roberts K., Wells B.: *Carbohydr. Polym.* 18, 189 (1992).
- Vasanthan T., Bhatta R. S.: *Starch/Stärke* 50, 286 (1998).
- Seib P. A., Woo K.: US 5 855 946 (1999).
- Lim J. U., Mun S. H., Shin M. S., Song J. Y.: KR 065 072 (2004).
- Kotek J., Kruliš Z., Růžek L., Šárka E.: CZ 303 840 (2011).
- Lopez H. W., Coudray C., Bellanger J., Levrat-Verny M.-A., Demigne C., Rayssiguier Y., Remesy C.: *Nutr. Res.* 20, 141 (2000).
- Yonekura L., Suzuki H.: *Eur. J. Nutrition* 44, 384 (2005).
- Kleessen B., Stoof G., Proll J., Schmiedl D., Noack J., Blaut M.: *J. Animal Sci.* 75, 2453 (1997).
- Haralampu S. G.: *Carbohydr. Polym.* 41, 285 (2000).
- Tovar J., Melito C.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 2642 (1996).
- Meuser F., Manners D. J., Seibel W. (ed.): *Plant Polymeric Carbohydrates*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 1993.
- Bravo L., Siddhuraju P., Saura-Calixto F.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 4667 (1998).
- Skrabanja V., Liljeberg H. G. M., Hedley C. L., Kreft I., Björck I. M. E.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 2033 (1999).
- Wronkowska M., Soral-Šmietana M.: *Czech J. Food Sci.* 30, 9 (2012).
- Šípková A., Leitnerová D., Dostálová J., Bouzová M.: *Proc. 7th Int. Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Praha, 2.11. – 4.11.2011* (Řápková R., Čopíková J., Šárka E., ed.), str. 67.
- van Hung P., Yamamori M., Morita N.: *Cereal Chem.* 82, 690 (2005).
- Englyst K. N., Vinoy S., Englyst H. N., Lang V.: *Br. J. Nutr.* 89, 329 (2003).
- Nugent A. P.: *Nutr. Bull.* 30, 27 (2005).
- Murphy M. M., Douglass S. J., Birkett A.: *J. Am. Diet. Assoc.* 108, 67 (2008).
- Anon.: *Resistant starch assay kit*. Firemní literatura, Megazyme, Irsko (2011).
- Englyst H. N., Hudson G. J.: *Food Chem.* 57, 15 (1996).
- Backer D., Saniez M. H.: US 6861519 (2005).
- Shin S. I., Choi H. J., Chung K. M., Hamaker B., Park K. H., Moon T. W.: *Cereal Chem.* 81, 404 (2004).
- Zeng Y., Pu X., Du J., Yang S., Yang T., Jia P.: *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6, 2570 (2012).

43. Figueroa-González I., Quijano G., Ramírez G., Cruz-Guerrero A.: *J. Sci. Food Agric.* 91, 1341 (2011).
44. Hernandez-Nava R. G., Berrios J. De J., Pan J., Osorio-Diaz P., Bello-Perez L.A.: *Food Sci. Technol. Int.* 15, 73 (2009).
45. Crittenden R. G., Morris L. F., Harvey M. L., Tran L. R., Mirchell H. L., Playne M. J.: *J. Appl. Microbiol.* 90, 268 (2001).
46. Chang Y. K., Wang S. S. (ed.): *Advances in Extrusion Technology*. Technomic Publishing Company, Lancaster 1999.
47. Sahoo P. K., Rana P. K.: *J. Mater. Sci.* 41, 6470 (2006).
48. Deveswaran R., Sravya M., Bharath S., Basavaraj V., Madhavan V.: *Adv. Appl. Sci. Res.* 3, 162 (2012).
49. Kalivoda A., Fischbach M., Kleinebudde P.: *Int. J. Pharm.* 429, 58 (2012).
50. Nagy Z. K., Sauceau M., Rodier E., Vajna B., Marosi G., Fages J.: *Polym. Adv. Technol.* 23, 909 (2012).
51. Bialleck S., Rein H.: *Starch/Stärke* 64, 408 (2012).
52. Šárka E., Kruliš Z., Kotek J., Růžek L., Korbářová A., Bubník Z., Růžková M.: *Czech J. Food Sci.* 29, 232 (2011).

E. Šárka^a, P. Smrčková^a, and L. Seilerová^b
(^a *Department of Carbohydrates and Cereals,*
^b *Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Resistant and Slowly Digestible Starch**

Digestibility of starch has been attributed to many factors, such as starch source, granule size, amylose/amylopectin ratio, crystallinity. Resistant starch (RS) escapes enzymatic digestion in the small intestine and passes into colon. The review is focused on the RS content in foods, nutritional benefits and on methods of increasing the RS/total starch ratio. Slowly digestible starch is absorbed in the small intestine within 20–120 min. RS can be used in treatment of diabetes or in controlled-release drugs.

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z HMYZU

VÁCLAV ČEŘOVSKÝ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
cerovsky@uochb.cas.cz

Došlo 23.10.13, přijato 18.11.13.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, analoga, hmyz,
lucifensin, jed, hymenoptera, α -helikální struktura

Obsah

1. Úvod
2. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů a jejich působení
3. Antimikrobiální peptidy (AMP) izolované z hmyzu
 - 3.1. Lucifensin
 - 3.2. Antimikrobiální peptidy izolované z jedu blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera)
 - 3.2.1. AMP z jedu vos
 - 3.2.2. AMP z jedu mravenců
 - 3.2.3. AMP z jedu čmeláků
 - 3.2.4. AMP z jedu včely medonosné
 - 3.2.5. AMP z jedu volně žijících včel
4. Předpoklady pro využití AMP v praxi

1. Úvod

Zavedení antibiotik do praxe následně po objevu penicilinu Sirem Alexandrem Flemingem v roce 1928 (publikováno 1929)¹ bylo bezesporu významným mezníkem v historii moderní medicíny. Zlatý věk antibiotik, následující po druhé světové válce a trvající až do 70. let minulého století, znamená objevy téměř všech dnes známých typů antibiotik včetně jejich derivátů. V té době se zdálo, že bakteriální infekce jsou navždy pod kontrolou. Nadměrné a nesprávné používání antibiotik si však během doby vybralo svou daň v podobě rezistence bakterií. Příkladem jsou *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicillin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, rezistentní kmeny *Escherichia coli*, ESBL produkující *Klebsiella*, patogenní enterokoky či rezistentní původci tuberkulózy. Rychlost vstupu nových antibiotik od jejich objevu v laboratoři do klinické praxe je však stále pomalejší a nedrží krok s rychlostí, s jakou bakterie získávají proti antibiotikům rezistenci. Zájem o objevování nových antibiotik je stále menší, neboť jejich výzkum není

pro farmaceutické firmy rentabilní. Dle slov mnoha odborníků se velmi rychle blížíme do doby „post-antibiotické“.

Vzhledem k této situaci byl již před lety, a to převážně v akademických institucích, započat výzkum nových typů antimikrobiálních látek, které zabíjejí bakterie na základě principiálně odlišného mechanismu působení než mají tradiční antibiotika, a přitom by neměly vytvářet rezistenci. Mezi tyto látky patří antimikrobiální peptidy (AMP), které ačkoliv ještě nebyly uvedeny do praxe, představují jednu z možných kategorií hledaných protiinfekčních látek. Výzkumem nových AMP se od roku 2007 zabýváme v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

2. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů a jejich působení

Antimikrobiální peptidy představují evolučně zachovanou složku vrozeného imunitního systému, která tvoří první obrannou linii proti infekci. Tyto peptidy vykazující přímý antimikrobiální účinek byly identifikovány již téměř ve všech formách organismů, počínaje bakteriemi, rostlinami a konče obratlovci.

V současné době je v databázi antimikrobiálních peptidů² evidováno více než 2000 AMP. Pro některé AMP je často používán název obranné peptidy hostitele (host defense peptides), neboť u vyšších organismů byla u nich kromě přímého antimikrobiálního účinku prokázána také imunomodulační aktivita.

AMP lze rozdělit podle náboje na anionické a kationické. V tomto článku se zaměříme na kationické AMP, které jsou v přírodě daleko hojnější a též více studované. Velmi mnoho jich bylo izolováno právě z hmyzu³. Jedná se o peptidy složené z 10 až 50 aminokyselin s výrazným obsahem bazických aminokyselin Arg a Lys, které jim dodávají celkový kladný náboj (+2 až +10), ale k tomu obsahují ještě vysoké procento hydrofobních aminokyselin ($\geq 30\%$). Dále se pak dají kategorizovat na základě sekundární struktury, a to na peptidy tvořící α -helix, peptidy obsahující struktury skládaného listu (β -list), struktury smyčky a peptidy s rozvolněnou strukturou⁴.

Některé z nich mají neuspořádanou strukturu ve vodném prostředí, ale v přítomnosti biologických membrán nebo v prostředí napodobujícím membránu vytvářejí některou z výše uvedených konformací, která má amfipatický charakter. To znamená, že obsahují hydrofobní aminokyseliny na jedné straně molekuly a hydrofilní aminokyseliny včetně Arg a Lys na straně druhé. Tato charakteristická vlastnost hraje u většiny z nich významnou úlohu v mechanismu zabíjení bakterií.

V *in vitro* testech vykazují AMP aktivity srovnatelné s konvenčními antibiotiky, ale zabíjejí bakterie podstatně

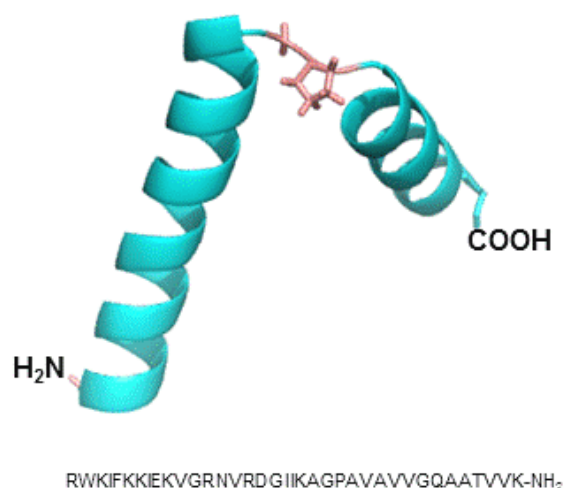
rychleji. I když samotný mechanismus účinku AMP není dostatečně probádán, obecně se přijímá, že tyto kladně nabitě peptidy jsou přitahovány k povrchu bakteriální membrány složené převážně z fosfolipidů nesoucích negativní náboj, interagují s ní, proniknou do její lipidové dvojvrstvy a různými mechanismy rozruší její strukturu. V důsledku toho dojde k porušení membránového potenciálu a úniku cytoplazmatického obsahu, a tím ke smrti bakterie. Pro tyto mechanismy bylo vypracováno několik modelů v literatuře popisované jako kobercový model, soudkový model, toroidní model a model micelárních agregátů⁴. Některé AMP nemusí nutně poškodit buněčnou membránu, ale pronikají dále do nitra bakterií, kde naruší jejich metabolismus nebo poškodí cytoplazmatické komponenty^{4,5}. Odlišné složení membrán eukaryotických buněk tvořených fosfolipidy převážně neutrálního charakteru a cholesterolu brání vlastní buňky hostitele před účinkem AMP.

3. Antimikrobiální peptidy z hmyzu

Hmyz, jenž tvoří 90 % druhů veškeré živočišné říše, prošel velmi úspěšným evolučním vývojem, a to díky svému efektivnímu vrozenému (nespecifickému) imunitnímu systému. Na rozdíl od obratlovců hmyz neprodukuje immunoglobuliny ani lymfocyty, tedy nedisponuje adaptivním (specifickým) imunitním systémem. Vzhledem k prostředí, ve kterém se hmyz pohybuje, je zřejmé, že jeho obranný systém musí být velice účinný proti mikrobiální infekci^{3,6}.

Imunitní systém hmyzu^{3,6} můžeme rozdělit na vnější bariéry a složku buněčnou a humorální. Vnější mechanická bariéra je tvořena kutikulou. Buněčná reakce je zprostředkována hemocyty, které se účastní fagocytózy, nodulace a enkapsulace mikroorganismů a apoptotických buněk. Výsledkem humorální odpovědi je uvolnění zásobního lysozymu a AMP, které hmyz rychle vytváří v reakci na infekci především v tukovém tělese (tkáň, která odpovídá savčím játrům). Poté jsou AMP vyloučeny do hemolymfy, která je už snadno roznesena po celém těle. AMP mohou vznikat také v hemocytech, epitelálních buňkách epidermis, ve střevě, v slinných žlázách a v rozmnožovacích orgánech. Hmyz produkuje celou škálu AMP, které lze opět rozdělit podle jejich sekundární struktury do výše uvedených 4 základních skupin⁴, ale některé z nich mají ve své molekule více strukturních prvků (např. α -helix, β -list) a jiné nelze podle tohoto dělení jednoznačně klasifikovat.

Nejpočetnější skupinu představují hmyzí defensiny^{7,8}. Tyto cyklické peptidy složené z 30 až 60 aminokyselin jsou svým aminokyselinovým složením i strukturou velmi odlišné od defensinů savců. Jejich peptidový řetězec je, podobně jako je tomu u savčích defensinů⁹, také propojen třemi disulfidovými můstky, ale toto propojení má odlišné pořadí. Navíc mají hmyzí defensiny ve své molekule kromě antiparalelního β -listu též α -helix¹⁰. První hmyzí defensiny^{11,12} byly izolovány z dvoukřídlého hmyzu (řád Diptera), a to z larev much druhů *Sarcophaga peregrina*



Obr. 1. Prostorová struktura a sekvence cecropinu izolovaného z hemolymfy motýla otakárka *Papilio xuthus*. Tento cecropin složený ze 37 aminokyselin obsahuje jako dominantní strukturní prvek α -helix přerušovaný flexibilním ohybem v místě dipeptidu Gly-Pro

a *Phormia terranova*. Hmyzí defensiny jsou aktivní hlavně proti Gram-pozitivním bakteriím a některým plísním. Další početnou skupinu představují cecropiny, lineární peptidy v délce 35–39 aminokyselin patřící do skupiny α -helikálních AMP (obr. 1). Cecropin A byl vůbec první objevený a charakterizovaný AMP. Byl izolován z hemolymfy kukly nočního motýla martináče *Hyalophora cecropia*¹³ a dal název celé rozsáhlé skupině vzájemně podobných peptidů identifikovaných výlučně v hmyzu řádu Lepidoptera a Diptera¹⁴. Do další rozsáhlé skupiny hmyzích AMP patří peptidy, které nevykazují definované strukturní uspořádání (α -helix, β -list), ale mají rozvolněnou strukturu. Jsou to lineární peptidy vyznačující se výrazným zastoupením jedné aminokyseliny jako je prolin nebo glycin^{3,6,8,15,16}.

V následujících dvou kapitolách se budeme věnovat převážně AMP, které byly v nedávné době charakterizovány v naší laboratoři ÚOCHB AV ČR. Jde o lucifensiny ze skupiny hmyzích defensinů, ale větší prostor věnujeme AMP nalezeným v jedových rezervoárech žahadlovitého hmyzu řádu blanokřídlých (Hymenoptera).

3.1. Lucifensiny

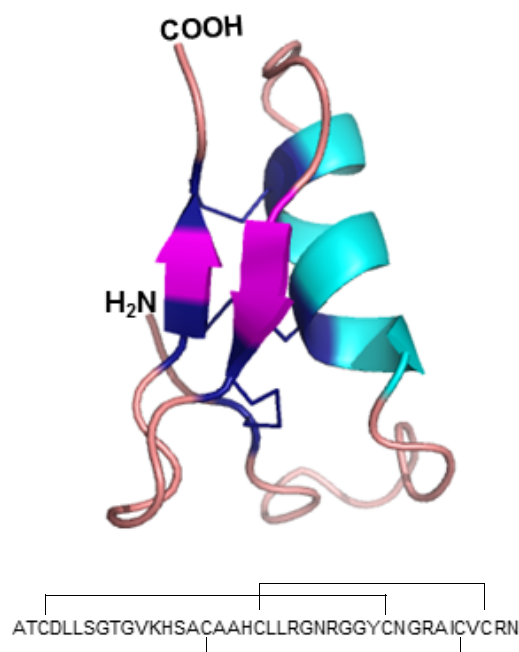
Významné místo mezi hmyzími defensiny zaujímají lucifensiny^{17,18}, izolované z larev much bzučivek *Lucilia sericata* a *L. cuprina*, které se používají k larvální terapii. Larvální terapie je léčebná metoda založená na čištění a léčení infikovaných nehojících se ran mladými larvami, které vyžíráním odstraňují nekrotickou tkáň a přitom v raně hubí bakterie včetně těch patogenních, rezistentních na tradiční antibiotika, a tím ránu desinfikují^{19,20}. Je to

k tkáním šetrná léčebná metoda, která je v současné době součástí standardní léčby syndromu diabetické nohy a která pomáhá zachraňovat dolní končetiny diabetických pacientů před amputací²⁰. Larvy během tohoto procesu do rány vylučují lucifensin¹⁷, který působí bakteriocidně na bakterie uvnitř rány a zároveň jako součást jejich imunitního systému přispívá k ochraně larev před infekcí. Počátky cíleného použití larvální terapie v medicíně se datují od konce první světové války. Můžeme tedy považovat nasazení larev do rány jako první praktické byť nevědomé použití antimikrobiálního peptidu lucifensinu k léčebným účelům?

Lucifensin byl v larvách mouchy bzučivky zelené (*L. sericata*) identifikován až v roce 2010, a to v naší laboratoři, ve spolupráci s lékaři Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze^{17,20}. Látku s antimikrobiálním účinkem proti citlivé bakterii *Micrococcus luteus* jsme nejprve identifikovali v extraktu vypreparovaných larválních střev, ten jsme pak ultrafiltrovali a aktivní peptid izolovali metodou RP-HPLC. Následně jsme stanovili jeho primární sekvenci Edmanovým odbouráváním a hmotovou spektrometrií. Jedná se o hmyzí defensin složený ze 40 aminokyselin obsahující tři disulfidové můstky. Lucifensin jsme poté našli také v hemolymfě larev, ve slinných žlázách, tukovém tělese, ale též ve výměšcích larev¹⁷. To dokazuje, že lucifensin je larvami do rány vyměšován a přispívá k jejímu léčení. O tom také svědčí i přítomnost lucifensinu zjištěná v ráně pomocí stěru ihned po odstranění larev koncem terapie¹⁷.

Objev lucifensinu byl po dalším půlroce publikován též dánskými autory, kteří jeho přítomnost v medicíně larvách druhu *L. sericata* prokázali metodami molekulární biologie²¹. Nukleární magnetickou rezonancí (NMR) bylo zjištěno, že molekula lucifensinu zaujímá prostorové uspořádání charakteristické i pro ostatní hmyzí defensiny^{10,22}. Jeho terciární struktura obsahuje N-koncovou smyčku (1. – 12. aminokyselina), následuje α -helix (13. – 23. aminokyselina) spojený ohybem s párem β -vláken (28. – 31. a 34. – 38. aminokyselina), které vytváří anti-paralelní β -list (obr. 2). Disulfidový můstek mezi Cys3 a Cys30 připojuje N-koncovou smyčku k prvnímu β -vlákně a další dva (Cys16–Cys36 a Cys20–Cys38) spojují α -helix s druhým β -vláknem²². Spojení α -helixu a β -struktury pomocí dvou disulfidových můstků tvoří strukturní prvek¹⁰ známý jako „cysteine-stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) motif“ (obr. 2).

V následné studii jsme dokázali, že jeho přítomnost v molekule je nutná pro zachování antimikrobiální aktivity. Pro tuto studii jsme lucifensin a jeho tři analogy, z nichž každý obsahoval pouze jeden disulfidový můstek, připravili metodou syntézy peptidů na pevné fázi²³. Měřením jejich antimikrobiální aktivity proti Gram-pozitivním bakteriím se ukázalo, že analogy s jedním můstkem jsou neaktivní, s výjimkou analogu, jehož disulfidový můstek Cys16–Cys36 spojuje α -helikální část molekuly s β -strukturou. I tento analog vykazoval mnohonásobně nižší aktivitu v porovnání s lucifensinem²³. Je zřejmé, že bez „podpory“ disulfidových můstků si molekula tohoto defensinu neudrží původní stabilní terciární konformaci,



Obr. 2. **Prostorová struktura a sekvence lucifensinu.** Tento hmyzí defensin složený ze 40 aminokyselin obsahuje jako dominantní strukturní prvky α -helix a antiparalelní β -list. Tyto dva strukturní prvky jsou mezi sebou odděleny smyčkami a vzájemně je celá struktura propojena disulfidovými můstky Cys3–Cys30, Cys16–Cys36 a Cys20–Cys38

a tím ztratí svoji biologickou aktivitu. Antimikrobiální aktivitu ztratil i analog lucifensinu, jehož sekvence byla na N-konci zkrácena o 10 aminokyselin²³.

V roce 2012 jsme lucifensin identifikovali¹⁸ také v larvách mouchy *L. cuprina*, které se využívají k larvální terapii převážně v zemích horkého klimatu, např. v Egyptě či Malajsii. V tomto případě jsme zdokonalenou metodou z hemolymfy asi tisíce larev izolovali lucifensin II. Jeho sekvence potvrdila vysokou podobnost s původním lucifensinem bzučivky *L. sericata*. Lucifensin II je peptid složený rovněž ze 40 aminokyselin lišící se od lucifensinu pouze jednou aminokyselinou, a to isoleucinem v poloze 11 na místě valinu. Lucifensiny jsou jediné AMP doposud jednoznačně identifikované v medicíně larvách. Mají baktericidní účinek proti Gram-pozitivním bakteriím infikujícím ránu (*Staphylococcus aureus*), ale jsou bohužel neúčinné proti Gram-negativním bakteriím. To vysvětluje selhání larvální terapie při léčení ran infikovaných Gram-negativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Antimikrobiální peptidy izolované z jedu blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera)

Tyto antimikrobiální peptidy byly izolovány z jedových rezervoárů žahadlovitého hmyzu (řád Hymenoptera, podřád Apocryta, skupina Aculeata). Společným

znakem skupiny Aculeata je žihadlo (přeměněné kladélko), které je spojené s jedovým rezervoárem jedové žlázy. Mezi nejznámější zástupce patří vosy, včely, čmeláci a mravenci. Obsah látek v jedu se mezi jednotlivými druhy liší a odvíjí se podle funkce, kterou žihadlový jed má. Soliterní dravé druhy, jako jsou např. kutilky, využívají jed pro paralyzu kořisti, již krmí své larvy. Jed u sociálních včel a vos plní funkci především obrannou při ochraně před predátory nebo konkurujícími společenstvími, mravenci jej mohou využívat k oběma účelům^{24,25}.

Látky obsažené v jedu lze podle molekulové hmotnosti rozdělit do tří skupin^{25–28}. Do první skupiny se řadí proteiny, a to především hojně se vyskytující enzymy hyaluronidasy a fosfolipasy. Druhou skupinu reprezentují peptidy o molekulové hmotnosti do 10 kDa představované neurotoxiny, cytolytickými peptidy, kininy, chemotaktickými peptidy a kationickými AMP. Třetí skupina se sestává z nízkomolekulárních látek, jako jsou ionty, volné aminokyseliny, biogenní aminy, neurotransmitery, polyaminy a heterocyklické sloučeniny. Funkce AMP v jedu nebyla zatím zcela jednoznačně prokázána, ale lze očekávat, že AMP ochraňuje jedince před infekcí, která by se mohla přenést z napadnuté kořisti. Dále by AMP mohly sloužit jako konzervační činidlo v případě, kdy paralyzovaná oběť má vydržet jako výživa po delší dobu larválního vývoje. U některých AMP je pak možné, že kromě antimikrobiální funkce vykazují ještě jinou aktivitu a mohou působit synergicky s dalšími komponenty jedu. Společným znakem těchto AMP je jejich amfipatická struktura a schopnost interagovat s biologickými membránami. V případě interakce se záporně nabitými membránami bakterií dochází k jejich narušení a následnému kolapsu vedoucímu ke smrti bakterie, v případě interakce s neutrálně nabitými membránami eukaryotických buněk může dojít ke spuštění různých škodlivých biologických procesů uvnitř buněk.

3.2.1. AMP z jedu vos

Podstatnou složkou jedu sociálních vos a sršní jsou mastoparany – α -helikální, amfipatické peptidy složené ze 14 aminokyselin, u nichž C-koncovou aminokyselinou je leucinamid^{28–30}. Všechny mastoparany obsahují podobnou sekvenci s převážným obsahem hydrofobních aminokyselin a 2 až 4 lysiny. Mastoparany vykazují množství biologických aktivit, jako jsou např. degranulace žírných buněk vedoucí k uvolnění histaminu či uvolnění serotoninu z krevních destiček, aktivaci fosfolipas, G-proteinu a guanylatcyklasy a vazbu ke kalmodulinu a troponinu. Od objevu prvního mastoparanu²⁹ sekvence H-Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH₂, který byl izolován z jedu sociální vosy *Vespula lewisii*, bylo popsáno a studováno několik desítek dalších mastoparanů a peptidů od nich odvozených. Některé z nich mají silný antimikrobiální účinek doprovázený slabší či silnější hemolytickou aktivitou jako třeba mastoparany, které jsme izolovali z jedu podčeledi vosíkovití (*Polistinae*) (cit.³¹). Mastoparany vykazující antimikrobiální aktivitu byly objeveny i v jedu některých soliterních vos³². V jedu soliterní vosy hrabalky *Anoplius samariensis* byl identifikován do-

posud nejkratší objevený přírodní AMP anoplin³³ (10 aminokyselin). Dekoralin³⁴ z jedu vosy jízlivky *Oreumenes decoratus* vykazuje navíc aktivitu proti protozoálnímu původci leishmaniózy.

3.2.2. AMP z jedu mravenců

Přes velkou rozmanitost mravenců byly AMP objeveny jen u několika druhů. Tyto druhy ovšem disponují větším počtem AMP odlišujících se biologickými aktivitami. Z jedu mravence *Pachycondyla goeldii* bylo izolováno 15 peptidů označených jako ponericytiny³⁵, z nichž většina vykazuje hemolytickou aktivitu. Jed australského mravence *Myrmecia pilosula* obsahuje neobvyklé pilosuliny – lineární peptidy, které se vyskytují také ve formě dimerů, které se tvoří z monomerních jednotek spojených disulfidovým můstkem^{36,37}. V jedu mravence *Tetramorium bicarinatum* byl objeven jen jeden AMP, ale zcela odlišný od výše zmíněných AMP. Bicarinalin³⁸ obsahující 20 aminokyselin vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu a jen slabou hemolytickou aktivitu.

3.2.3. AMP z jedu čmeláků

AMP z jedu různých druhů čmeláků nesou společný název bombolitiny. Obsahují 17–19 aminokyselin a sdílejí velice podobnou sekvenci. Prvních pět bombolitín³⁹ bylo izolováno z jedu čmeláka *Megabombus pennsylvanicus*. Další pak následovaly izolací z jedu čmeláků *Bombus lapidarius*⁴⁰ a *B. ignitus*⁴¹, u kterých byla podrobně studována antimikrobiální aktivita, podobně jako u šesti bombolitínů⁴², které jsme izolovali z jedu *B. pascuorum*. Většina bombolitínů však vykazuje značný hemolytický účinek.

3.2.4. AMP z jedu včely medonosné (čeledi Apidae)

Hlavní peptidovou složkou jedu včely medonosné (*Apis mellifera*) je melittin⁴³, který tvoří 40–50 % suché váhy včelího jedu. Je to lineární peptid složený z 26 aminokyselin, který ve vodě vytváří rozvolněnou strukturu, ale v přítomnosti membrán a organických rozpouštědel zaujímá konformaci dvou amfipatických α -helixů spojených krátkým ohybem. Melittin je znám již od 50. let minulého století hlavně díky jeho hemolytickým vlastnostem, zatímco jeho antimikrobiální aktivita⁴⁴ byla popsána prvně v roce 1968. Od té doby až do současnosti se tento peptid stal předmětem studia stovek vědeckých prací, a to nejen z pohledu svých biologických aktivit. Je poněkud překvapivé, že kromě melittinu doposud žádný jiný AMP nebyl v jedu včely medonosné identifikován.

3.2.5. AMP z jedu volně žijících včel

Tyto AMP jsme izolovali v naší laboratoři v ÚOCHB AV ČR z jedů volně žijících včel čeledi Apidae, Halictidae, Andrenidae a Colletidae. Převážně se jedná o kratší lineární amfipatické α -helikální peptidy v délce 12–18 aminokyselin s poměrně značným zastoupením Arg a Lys a amidované na C-konci. Jejich sekvence byla určena Edmanovým odbouráváním na základě jejich molekulární hmotnosti stanovené hmotnostní spektrometrií. Některé z nich vykazují značnou antimikrobiální aktivitu, ale níže-

Tabulka I

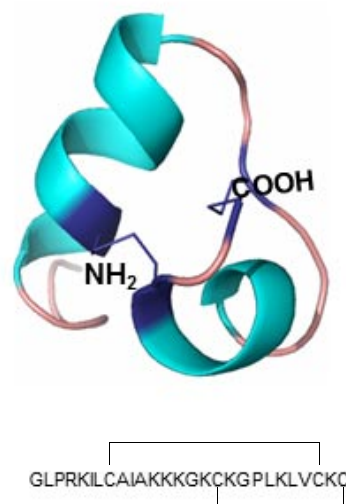
Antimikrobiální peptidy izolované z jedu volně žijících včel

Název peptidu	Sekvence peptidu	Druh (čeleď)
Melectin (MEP)	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂	<i>Melecta albifrons</i> (Apidae)
Lasioglossin-I (LL-I)	VNWKKVLGKIIKVAK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Lasioglossin-I (LL-II)	VNWKKILGKIIKVAK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Lasioglossin-I (LL-III)	VNWKKILGKIIKVVK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Halictin-1 (HAL-1)	GMWSKILGHLIR-NH ₂	<i>Halictus sexcinctus</i> (Halictidae)
Halictin-2 (HAL-2)	GLWMSLLKHILK-NH ₂	<i>Halictus sexcinctus</i> (Halictidae)
Macropin (MAC-1)	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	<i>Macropis fulvipes</i> (Melittidae)
Lasiocepsin (Las)	GLPRKILCAIAKKKGKCKGPLKLVCCK	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Panurgin (PNG-1)	LNWGAILKHIK-NH ₂	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)
PNG-K	LDVKKIICVACKIKPNPACKKICPK	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)
PNG-R	LDVKKIICVACKIRPNPACKKICPK	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)

kou, popřípadě jen mírnou toxicitu vůči eukaryotním buňkám. Ve srovnání s obdobnými peptidy objevenými jinými vědeckými týmy mají vyšší antimikrobiální účinky. Kupodivu v žádném z těchto jedů nebyla zjištěna přítomnost výše zmíněného melittinu.

V roce 2008 jsme z jedu kleptoparazitické včely smutilky obecné (*Melecta albifrons*, čel. Apidae) izolovali první peptid této skupiny, pojmenovaný melectin⁴⁵. Tento lineární peptid složený z 18 aminokyselin (tab. I) vykazoval značnou aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (tab. II), degranuloval žírné buňky, ale jeho hemolytická aktivita byla nízká. Měřením spekter cirkulárního dichroismu (CD) byla dokázána jeho schopnost zaujmout v přítomnosti trifluoroethanolu či dodecylsulfátu sodného (SDS) amfipatickou α -helikální strukturu. Pro melectin je charakteristická přítomnost prolinu (pozice 11) uprostřed peptidového řetězce, který je příčinou mírného ohybu α -helixu. Tento tzv. „Pro kink“ je důležitý pro selektivitu účinku peptidu na prokaryotní a nikoli eukaryotní buňky, jak bylo prokázáno sledováním biologické aktivity několika analogů melectinu. V případě nahrazení Pro11 některými aminokyselinami, které stabilizují helikální konformaci (Ala, Lys), byla hemolytická aktivita podstatně zvýšena.

Z hlediska biologických aktivit představují významnou skupinu tři patnáctipeptidy (tab. I a II), pojmenované jako lasioglossiny⁴⁶ (LL-I, LL-II a LL-III), které jsme našli v jedu primitivně eusociální včely ploskočelky velkohlavé (*Lasioglossum laticeps*, čel. Halictidae). Mají vysokou antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím⁴⁶, proti kvasinkám⁴⁷ a nevykazují hemolytickou aktivitu. Jejich schopnost degranulovat žírné buňky je podstatně nižší v porovnávání s mastoparany. LL-III též prokazoval aktivitu proti některým rakovinným buňkám, a to hlavně proti leukemickým liniím⁴⁸. Jak bylo potvrzeno měřením CD a NMR spekter, lasioglossiny též zaujímají amfipatickou α -helikální konformaci v přítomnosti trifluoroethanolu nebo SDS. Měření



Obr. 3. **Prostorová struktura a sekvence lasiocepsinu.** Lasiocepsin je složený ze 27 aminokyselin, obsahuje jako dominantní strukturní prvky dva α -helixy, které jsou od sebe odděleny smyčkami a vzájemně propojeny disulfidovými můstky Cys8-Cys25 a Cys17-Cys27

NMR v přítomnosti trifluoroethanolu navíc ukázalo, že α -helix je mírně ohnut do oblouku, přičemž postranní řetězce hydrofilních aminokyselin jsou soustředěny převážně na konvexní a hydrofobní aminokyseliny na konkávní straně oblouku⁴⁶. Toto mírné zakřivení je důsledkem přítomnosti glycinového zbytku situovaného uprostřed peptidového řetězce (pozice 8), kolem něhož dochází k ohybu. Pokud byl tento glycin ve studovaných analozích zaměněn prolinem, antimikrobiální aktivita všech tří lasioglossinů proti patogenním bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa* několikrát poklesla, a to důsledkem narušení jejich α -helikální konformace, což bylo dokázáno CD spektrometrií. Následná studie LL-III ukázala, že jeho antimikro-

Tabulka II

Antimikrobiální a hemolytická aktivita peptidů izolovaných z jedu volně žijících včel

Peptid	Antimikrobiální aktivita MIC [μ M]						Hemolytická aktivita ^g LC ₅₀ [μ M]
	<i>M.l.</i> ^a	<i>B.s.</i> ^b	<i>S.a.</i> ^c	<i>E.c.</i> ^d	<i>P.a.</i> ^e	<i>C.a.</i> ^f	
MEP	–	0,8	6,8	2,0	18,5	8,3	>100
LL-I	–	0,8	14,3	1,7	15,8	9,1	>200
LL-II	–	0,7	9,0	1,4	14,4	10,0	>200
LL-III	–	0,7	3,9	1,4	18,7	11,7	>200
HAL-1	–	0,8	7,7	3,8	45	6,2	82
HAL-2	–	1,0	8,1	2,5	42,1	6,6	78,1
MAC-1	–	1,3	3,7	3,0	35,0	6,3	160
Las	–	0,4	93	8,6	15	3,6	>200
PNG-1	1,5	1,3	10,6	3,7	51,7	7,3	119
PNG-K	1,6	3,3	>100	63,3	>100	24,2	>200
PNG-R	0,8	1,5	>100	32,5	>100	18,7	>200

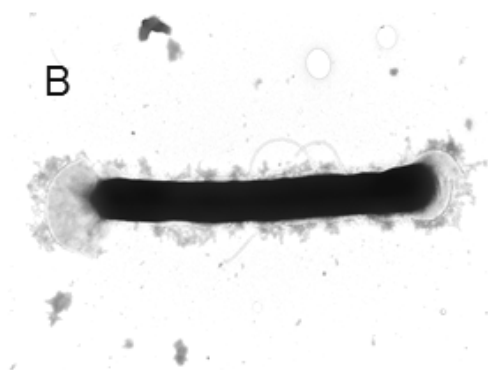
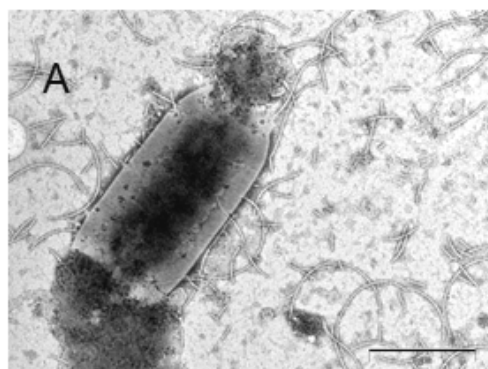
^a *Micrococcus luteus*; ^b *Bacillus subtilis*; ^c *Staphylococcus aureus*; ^d *Escherichia coli*; ^e *Pseudomonas aeruginosa*; ^f *Candida albicans*; ^g vyjadřuje míru toxicity vůči eukaryotickým buňkám

biální aktivita není ovlivněna přítomností solí a iontů ve fyziologických koncentracích a že peptid zabráňuje tvorbu bakteriálních biofilmů⁴⁹. LL-III si svoji aktivitu zachoval i po kovalentní imobilizaci přes polyethylenglykolové raménko na silikonový povrch nosiče; zdá se tedy být vhodným kandidátem na antimikrobiální úpravu povrchů tělních implantátů a různých kloubních náhrad náchylných pro tvorbu bakteriálního biofilmu⁴⁹.

V jedu této ploskočelky jsme kromě lasioglossinů objevili i cyklický AMP složený z 27 aminokyselin a dvou disulfidových můstků spojených v pořadí Cys8-Cys25 a Cys17-Cys27 (obr. 3). Toto pořadí jsme zjistili stanovením molekulové hmotnosti peptidových fragmentů izolovaných RP-HPLC po předchozím štěpení přírodního peptidu trypsinem. Peptid jsme pojmenovali lasiocepsin⁵⁰ a pro další studie ho připravili metodou syntézy na pevné fázi s využitím regioselektivního chránění čtyř cysteinových můstků, zajišťující tvorbu disulfidových můstků ve správném pořadí. Zároveň jsme syntetizovali analogy s jedním disulfidovým můstkem (zbývající dva cysteiny byly nahrazeny alaninem), lineární analog (všechny cysteiny byly nahrazeny alaninem) a dva analogy s nesprávným propojením můstků. Antimikrobiální aktivita analogů byla těmito zásahy do struktury molekuly dramaticky snížena. To dokazuje, že disulfidové můstky, a to ve správném pořadí, hrají podstatnou úlohu pro zachování terciární struktury lasiocepsinu, která je potřebná pro zachování jeho biologické aktivity⁵⁰. Terciární strukturu lasiocepsinu jsme stanovili⁵¹ dvojdimensionální NMR ve vodném prostředí (obr. 3). Je pro ni charakteristická přítomnost dvou α -helikálních úseků, z nichž první (Arg4-Lys13) je dvakrát delší než úsek druhý (Pro20-Val24). Disulfidový můstek Cys8-Cys25 spojuje střed prvního helixu s C-koncem dru-

hého helixu. C-koncová oblast je stabilizována dalším disulfidovým můstkem mezi C-koncovým Cys27 a Cys17 situovaným uprostřed smyčky, která odděluje oba helixy. Pro lasiocepsin je charakteristický velký počet bazických aminokyselin (8 $\times$ Lys a 1 $\times$ Arg), které vytvářejí dvě kladně nabitě oblasti na povrchu molekuly: Arg4 a Lys5 a druhou větší oblast obsahující zbývajících 7 lysinů. Tyto pozitivně nabitě oblasti zaujímají téměř 53 % celkového povrchu molekuly a jsou důvodem značné preference peptidu pro membrány tvořené anionickými fosfolipidy včetně kardiolipinu. To jsme zjistili studiem interakcí lasiocepsinu s uměle vytvořenými modely membrán⁵¹. Antimikrobiální účinek lasiocepsinu na *Bacillus subtilis* jsme sledovali pomocí transmisního elektronového mikroskopu⁵⁰. Pozorovali jsme rozrušení povrchové struktury bakterií *B. subtilis*, a to především na pólech buněk, kudy unikaly vnitrobuněčné komponenty (obr. 4a). Právě v těchto pólech bakteriální membrána obsahuje zvýšenou koncentraci výrazně anionického kardiolipinu.

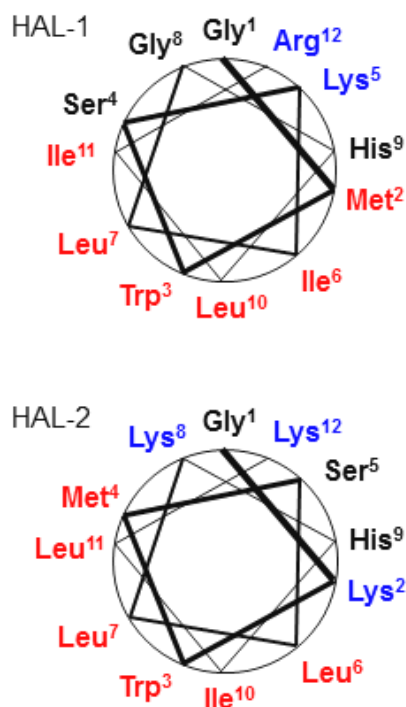
Značnou pozornost jsme věnovali strukturně aktivnímu studiu dvou peptidů izolovaných z jedu eusociální ploskočelky šestipásé (*Halictus sexcinctus*, čel. Halictidae) pojmenovaných halictiny (HAL-1, HAL-2) (tab. I). Halictiny⁵² jsou lineární α -helikální dvanáctipeptidy, které vytvářejí dokonalou amfipatickou strukturu. Po vložení jejich sekvence do Edmunsonovy projekce je totiž patrné rozložení všech hydrofobních aminokyselin po jedné straně helixu a hydrofilních aminokyselin včetně bazických aminokyselin (Arg, Lys) na opačné straně helixu (obr. 5). Oba halictiny vykazovaly značnou aktivitu vůči Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím, ale zároveň měly i mírnou hemolytickou aktivitu. Syntetizovali jsme rozsáhlou řadu analogů ve snaze snížit jejich hemolytickou akti-



Obr. 4. Baktericidní účinek antimikrobiálního peptidu lesiocepsinu (A) a jedním z analogů PNG-1 (B) na Gram pozitivní bakterii *Bacillus subtilis* sledovaný transmisní elektronovou mikroskopií po 60min působení. Měřítka představuje 1 μm

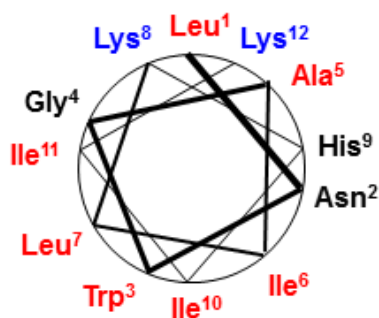
vitu při zachování aktivity antimikrobiální, popř. docílit i jejího navýšení vůči patogenním bakteriím. Toho mělo být dosaženo empirickou výměnou stávajících aminokyselin v sekvenci jinými aminokyselinami. Tyto výměny směřovaly k ovlivnění celkového náboje peptidu, hydrofobicity, α -helicity a amfipaticity. Je třeba poznamenat, že záměna jakékoliv aminokyseliny za jinou, směřující ke změně jednoho z těchto fyzikálně chemických parametrů, zároveň více či méně ovlivní parametry zbývající. Obecně je známo, že zvýšení kladného náboje doprovází zvýšení antimikrobiální aktivity, zvýšení hydrofobicity a helicity přispívá spíše ke zvýšení hemolytické aktivity. Helikální struktura je nutná k vytvoření amfipatického uspořádání. Je tedy zřejmé, že pouze správnou kombinací těchto parametrů lze získat analog s optimální biologickou aktivitou. V případě halictinů to byly analogy se zvýšeným kladným nábojem, ve kterých vybrané aminokyseliny v sekvenci byly zaměněny lysinem⁵².

Z včely pískohrabky ostruhaté (*Panurgus calcaratus*, čel. Andrenidae) jsme izolovali tři AMP pojmenované panurginy⁵³. Panurgin-1 (PNG-1) je dvanáctipeptid, který je svojí sekvencí, sekundární strukturou i biologickou aktivitou podobný halictinům (tab. I). PNG-1 však v Edmundsonově projekci nevykazuje úplně optimální amfipatické uspořádání (obr. 6). Ze série připravených analo-



Obr. 5. Amfipatické α -helikální struktury halictinů HAL-1 a HAL-2 izolované z jedu volně žijící včely ploskočelky šestipásé (*Halictus sexcinctus*) zobrazené Edmundsonovou kruhovou projekcí. Hydrofilní aminokyseliny (černě) včetně kladně nabitých lysinů a argininu (modře) jsou umístěny na jedné straně α -helixu, zatímco hydrofobní aminokyseliny (červeně) jsou na jeho opačné straně

gů měly, podobně jako v případě halictinů, zlepšenou biologickou aktivitu analogy se zvýšeným kladným nábojem, a to pouze ty, u nichž byla výměna za lysin provedena v hydrofilní části amfipatického helixu (obr. 6). Pokud byla náhrada za lysin provedena v hydrofobní části helixu, antimikrobiální aktivita dramaticky poklesla, a to v důsledku snížené amfipaticity peptidu. Další dva panurginy (PNG-K a PNG-R) jsou cyklické peptidy o 25 aminokyselinách mající dva disulfidové můstky v pořadí Cys8-Cys23 a Cys11-Cys19. Oba peptidy mají téměř stejnou sekvenci s výjimkou jedné aminokyseliny v poloze 14, a to Lys (PNG-K) a Arg (PNG-R) (tab. I). I když tyto dva peptidy mají výrazný kladný náboj i určitou podobu s lasiocepsinem, byly účinné pouze proti citlivým bakteriím, jako jsou *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*. PNG-1 včetně jeho analogů i PNG-K(R) narušovaly membrány umělé vytvořených vezikulů. K tomuto studiu byly použity velké unilamelární vezikuly, připravené kombinací záporně nabitých fosfolipidů, jako je diolelylfosfatidylglycerol (DOPG) a kardiolipin (CL), a ze zwitteriontových fosfolipidů, jako je diolelylfosfatidylcholin (DOPC) či diolelylfosfatidylethanolamin (DOPE). Záporně nabitá vezikuly napodobují



Obr. 6. Amfipatická α -helikální struktura PNG-1 izolovaného z jedu volně žijící včely pískohrabky ostruhaté (*Panurgus calcaratus*) zobrazená Edmundsonovou kruhovou projekcí

membrány bakterií, zatímco vezikuly konstruované pouze z zwitteriontového DOPC simulují membránu erytrocytů. Rozsah narušení těchto membrán byl sledován měřením uvolněné fluorescenční barvy calceinu cíleně zakomponované dovnitř vezikulů. Zatímco PNG-1 způsoboval uvolnění calceinu z obou typů vezikulů s preferencí pro záporně nabitě vezikuly, PNG-K(R) působil aktivně pouze na záporně nabitě vezikuly. Výsledky těchto měření odpovídají zanedbatelné hemolytické aktivitě PNG-K(R) a značně vyšší hemolytické aktivitě PNG-1 a jeho analogů. Jeden ze studovaných analogů PNG-1 byl zvolen ke sledování antimikrobiálního účinku proti bakterii *Bacillus subtilis* transmisním elektronovým mikroskopem⁵³. V tomto případě bylo pozorováno odpadnutí flagel, podélné zúžení válcovitého tvaru bakterie doprovázené nabobtnáním obou polů bakteriální obálky s následným vyplavením vnitřního obsahu (obr. 4b).

V případě strukturně aktivní studie peptidu macropinu⁵⁴, izolovaného z jedu solitérní včely olejnice žlutonohé (*Macropis fulvipes*, čel. Melittidae), jsme zkoumali vliv inkorporace D-aminokyselin na změnu jeho sekundární struktury a následnou změnu biologické aktivity⁵⁵. V tomto α -helikálním trináctipeptidu (tab. I) byla postupně každá L-aminokyselina v sekvenci nahrazena odpovídající aminokyselinou v D-konfiguraci. Připravili jsme 11 analogů a pomocí metody CD sledovali jejich schopnost vytvářet α -helikální strukturu v přítomnosti trifluoroethanolu. Třídídimensionální strukturu vybraných analogů jsme určili měřením NMR v prostředí vodného trifluoroethanolu a SDS. Zjistili jsme, že proporce α -helikální struktury každého analogu byla závislá na pozici D-aminokyseliny v sekvenci, a tato postupně klesala s pozicí D-aminokyseliny ve směru od N-konce k C-konci⁵⁵. Snížená míra α -helikální struktury se projevila poklesem hemolytické aktivity analogů, ale nepříznivě též snížením jejich antimikrobiální aktivity. Pouze analog mající D-Phe v pozici 2 si zachoval biologickou aktivitu odpovídající přírodnímu macropinu. Z jeho třídídimensionální struktury určené NMR byla patrná hydrofobní interakce mezi methylenovou sku-

pinou postranního řetězce D-Phe a methylovou skupinou Ala3, která měla zvýšený stabilizační efekt na α -helikální konformaci celého analogu, a tím na zachování jeho biologické aktivity. Krom toho se inkorporace D-Phe do předposlední pozice peptidu příznivě projevila na stabilitě peptidu v krevním séru. MAC-1 a některé jeho analogy vykazovaly i silnou aktivitu proti patogenní kvasině *Candida albicans*, a to i včetně těch s nízkou antimikrobiální aktivitou⁵⁵. Zvýšenou antimikrobiální aktivitu proti patogenní *P. aeruginosa* vykazovaly dva analogy s výměnou Gly v pozici 3 buď za L-Lys nebo D-Lys, tedy v důsledku navýšení kladného náboje peptidu.

4. Předpoklady pro využití AMP v praxi

Pro využití AMP v praxi jsou žádoucí široké spektrum aktivity, selektivní toxicita vůči mikrobům, minimální vedlejší účinky a minimální riziko vyvolání bakteriální rezistence, což jsou naštěstí vlastnosti odpovídající jejich přirozené funkci. Všeobecně známý problém stability peptidů, vyplývající z jejich citlivosti vůči proteolytickému štěpení, může být překonán syntézou vhodně navrženého analogu. Principiální překážkou se ale zdá být výrobní cena, která může být podstatně vyšší než výrobní cena tradičních antibiotik. Proto se farmaceutické firmy zatím orientují spíše na komercializaci kratších AMP, jako byl Pexiganan (22 aminokyselin, analog magaininu izolovaného z žabí kůže), nebo analogy indolicidinu (13 aminokyselin, z krve skotu) či histatinu (12 aminokyselin, ze slin člověka) (cit.¹⁶).

Výsledky naší práce uvedené v tomto přehledném článku byly podpořeny grantem GA ČR 203/08/0536 a vědeckým projektem RVO 61388963 Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

LITERATURA

1. Fleming A.: Br. J. Exp. Pathol. 10, 226 (1929).
2. Wang G., Li X., Wang Z.: Nucleic Acids Res. 37, D933-D937 (2009).
3. Otvos L.: J. Pept. Sci. 6, 497 (2000).
4. Doležilková I., Macková M., Macek T.: Chem. Listy 105, 346 (2011).
5. Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. F.: Cent. Eur. J. Biol. 2, 1 (2007).
6. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.-L., Hoffmann D.: Dev. Comp. Immunol. 23, 329 (1999).
7. Hoffmann J. A., Hetru C.: Immunol. Today 13, 411 (1992).
8. Bulet P., Stöcklin R.: Protein Pept. Lett. 12, 3 (2005).
9. Schneider J. J., Unholzer A., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H. C.: J. Mol. Med. 83, 587 (2005).
10. Cornet B., Bonmatin J.-M., Hetru C., Hoffmann J. A.,

- Ptak M., Vovelle F.: *Structure* 3, 435 (1995).
11. Matsuyama K., Natori S.: *J. Biol. Chem.* 263, 17112 (1988).
 12. Lambert J., Keppi E., Dimarcq J.-L., Wicker C., Reichhart J.-M., Dunbar B., Lepage P., Van Dorselaer A., Hoffmann J., Forthergill J., Hoffmann D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 262 (1989).
 13. Hultmark D., Steiner H., Rasmusson T., Boman H. G.: *Eur. J. Biochem.* 106, 7 (1980).
 14. Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H., Lee J. Y., Lidholm D. A.: *Eur. J. Biochem.* 201, 23 (1991).
 15. Conciancich S., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. A.: *Parasitol. Today* 10, 132 (1994).
 16. Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B.: *Chem. Listy* 103, 460 (2009).
 17. Čerovský V., Žďárek J., Fučík V., Monincová L., Voburka Z., Bém R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 455 (2010).
 18. El Shazely B., Veverka V., Fučík V., Voburka Z., Žďárek J., Čerovský V.: *J. Med. Entomol.* 50, 571 (2013).
 19. Sherman R. A., Hall M. J. R., Thomas S.: *Annu. Rev. Entomol.* 45, 55 (2000).
 20. Čerovský V.: *Vesmír* 90, 266 (2011).
 21. Andersen A. S., Sandvang D., Schnorr K. M., Kruse T., Neve S., Joergensen B., Karlsmark T., Krogfelt K. A.: *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1646 (2010).
 22. Nygaard M. K. E., Andersen A. S., Kristensen H.-H., Krogfelt K. A., Fojan P., Wimmer R.: *J. Biomol. NMR* 52, 277 (2012).
 23. Čerovský V., Slaninová J., Fučík V., Monincová L., Bednářová L., Maloň P., Štokrová J.: *ChemBioChem* 12, 1352 (2011).
 24. Žďárek J.: *Hmyzí rodiny a státy*. Academia, Praha 2013.
 25. Kuhn-Nentwig L.: *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2651 (2003).
 26. Habermann E.: *Science* 177, 314 (1972).
 27. Hisada M., Satake H., Masuda K., Aoyama M., Murata K., Shinada T., Iwashita T., Ohfune Y., Nakajima T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1048 (2005).
 28. Patočka J.: *Vesmír* 83, 392 (2004).
 29. Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C.: *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1942 (1979).
 30. Nakajima T., Uzu S., Wakamatsu K., Saito K., Miyazawa T., Yasuhara T., Tsukamoto Y., Fujino M.: *Biopolymers* 25, 115 (1986).
 31. Čerovský V., Slaninová J., Fučík V., Hulačová H., Borovičková L., Ježek R., Bednářová L.: *Peptides* 29, 992 (2008).
 32. Konno K., Hisada M., Naoki H., Itagaki Y., Kawai N., Miwa A., Yasuhara T., Morimoto Y., Nakata Y.: *Toxicon* 38, 1505 (2000).
 33. Konno K., Hisada M., Fontana R., Lorenzi C. C. B., Naoki H., Itagaki Y., Miwa A., Kawai N., Nakata Y., Yasuhara T., Neto J. R., de Azevedo W. F. Jr., Palma M. S., Nakajima T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1550, 70 (2001).
 34. Konno K., Rangel M., Oliveira J. S., dos Santos Cabrera M. P., Fontana R., Hirata I. Y., Hide I., Nakata Y., Mori K., Kawano M., Fuchino H., Sekita S., Neto J. R.: *Peptides* 28, 2320 (2007).
 35. Orivel J., Redeker V., Le Caer J.-P., Krier F., Revol-Junelles A.-M., Longeon A., Chaffotte A., Dejean A., Rossier J.: *J. Biol. Chem.* 276, 17823 (2001).
 36. Zelezetsky I., Pag U., Antcheva N., Sahl A.-G., Tossi A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 358 (2005).
 37. Inagaki H., Akagi M., Imai H. T., Taylor R. W., Wiese M. D., Davies N. W., Kubo T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 411 (2008).
 38. Rifflet A., Gavalda S., Téné N., Orivel J., Leprince J., Guilhaudis L., Génin E., Vétillard A., Treilhou M.: *Peptides* 38, 363 (2012).
 39. Argiolas A., Pisano J. J.: *J. Biol. Chem.* 260, 1437 (1985).
 40. Favreau P., Menin L., Michalek S., Perret F., Cheneval O., Stöcklin M., Bulet P., Stöcklin R.: *Toxicon* 47, 676 (2006).
 41. Choo Y. M., Lee K. S., Yoon H. J., Je Y. H., Lee S. W., Sohn H. D., Jin B. R.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 156, 168 (2010).
 42. Ježek R., Janechová D., Cvačka J., Slaninová J., Voburka Z., Hovorka O., Fučík V., Borovičková L., Maloň P., Čerovský V.: *Collection Symposium Series* 11, 51 (2009) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague 2009.
 43. Habermann E., Jentsch J.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 37 (1967).
 44. Fennell J. F., Shipman W. H., Cole L. J.: *Exp. Biol. Med.* 127, 707 (1968).
 45. Čerovský V., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Bednářová L., Borovičková L., Slaninová J., Fučík V.: *ChemBioChem* 9, 2815 (2008).
 46. Čerovský V., Buděšínský M., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Slaninová J., Borovičková L., Fučík V., Bednářová L., Votruba I., Straka J.: *ChemBioChem* 10, 2089 (2009).
 47. Slaninová J., Putnová H., Borovičková L., Šácha P., Čerovský V., Monincová L., Fučík V.: *Cent. Eur. J. Biol.* 6, 150 (2011).
 48. Slaninová J., Mlsová V., Kroupová H., Alán L., Tůmová T., Monincová L., Borovičková L., Fučík V., Čerovský V.: *Peptides* 33, 18 (2012).
 49. Mishra B., Basu A., Saravanan R., Xiang L., Yang L. K., Leong S. S. J.: *RSC Adv.* 3, 9534 (2013).
 50. Monincová L., Slaninová J., Fučík V., Hovorka O., Voburka Z., Bednářová L., Maloň P., Štokrová J., Čerovský V.: *Amino Acids* 43, 751 (2012).
 51. Monincová L., Buděšínský M., Čujová S., Čerovský V., Veverka V.: *ChemBioChem* 15, 301 (2014).
 52. Monincová L., Buděšínský M., Slaninová J., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Straka J., Čerovský V.: *Amino Acids* 39, 763 (2010).

53. Čujová S., Slaninová J., Monincová L., Fučík V., Bednářová L., Štokrová J., Hovorka O., Voburka Z., Straka J., Čeřovský V.: *Amino Acids* 45, 143 (2013).
54. Monincová L., Slaninová J., Voburka Z., Hovorka O., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Buděšínský M., Straka J., Čeřovský V.: *Collection Symposium Series 11*, 77 (2009) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague 2009.
55. Monincová L., Veverka V., Slaninová J., Buděšínský M., Fučík V., Bednářová L., Straka J., Čeřovský V.: *J. Pept. Sci.*, v redakčním řízení.

V. Čeřovský (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Antimicrobial Peptides Isolated from Insects**

Antimicrobial peptides (AMP) which kill microbes by a fundamentally different mechanism of action than do traditional antibiotics are a new category of compounds capable of fighting resistant pathogens. The cationic AMP isolated from insects comprise a significant group among those 2000 peptides already registered in The Antimicrobial Peptide Database. The novel AMP include lucifensins – the insect defensins isolated from medicinal larvae of flies which are routinely used in maggot therapy and AMP ranking among α -helical amphipathic peptides isolated from the venom of stinging hymenopterans. The AMP isolated from the venom show strong antimicrobial activities and low or moderate toxicity to eukaryotic cells. Systematic structure modification of these naturally occurring AMP resulted in their analogs with enhanced antimicrobial activities.

ANOREXIGENNÍ NEUROPEPTID CART V REGULACI PŘÍJMU POTRAVY

VERONIKA NAGELOVÁ, BLANKA ŽELEZNÁ
a LENKA MALETÍNSKÁÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
zelezna@uochb.cas.cz

Došlo 1.10.13, přijato 12.12.13.

Klíčová slova: CART, cocaine and amphetamine regulated transcript, anorexigenní neuropeptid

Obsah

1. Úvod
2. Expres peptidu CART
3. Vztah peptidu CART k dalším peptidům ovlivňujícím příjem potravy
4. Hledání receptoru peptidu CART
5. Hledání kratších biologicky aktivních analogů peptidu CART
6. Farmakologické využití peptidu CART
7. Závěr

1. Úvod

Epidemie obezity a s ní spojených dalších chorob (diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární choroby, nádorová onemocnění a jiné) představuje v dnešní době závažný zdravotní problém, který je důsledkem naší genetické predispozice a současného nevhodného životního stylu (přejídání, nevhodné složení stravy, nedostatek pohybu). Množství obézních lidí celosvětově stoupá nesmírně rychlým tempem. Stále je k dispozici velmi málo léků, které v kombinaci s úpravou diety a životního stylu pomáhají snižovat hmotnost – v Evropě je to v současné době pouze orlistat, inhibitor střevní lipasy, poté, co byl sibutramin, inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, stažen z trhu pro negativní vliv na kardiovaskulární systém. Výzkum mechanismů ovlivňujících příjem potravy a nových látek účastnících se těchto dějů, které by mohly být potenciálními antiobezitiky, je tedy velmi důležitý.

Anorexigenní (navozující pocit sytosti) neuropeptidy vznikají v mozku, kde velmi cíleně působí na snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Jedním z nich je peptid CART (angl. cocaine- and amphetamine-regulated transcript). Výzkum anorexigenních neuropeptidů jako je peptid CART směřuje k vytvoření jejich specificky působících analogů s potenciálním antiobezitním účinkem.

2. Expres peptidu CART

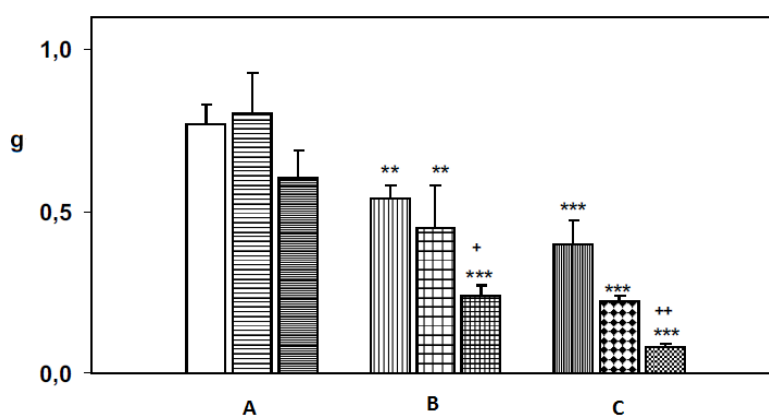
CART byl objeven v roce 1995 jako genový transkript, jehož množství bylo zvýšeno účinkem kokainu a amfetaminu¹. Již před objevením CART byl z hypothalamu izolován peptid o sekvenci, jež byla později přiřazena² k peptidovému produktu CART. Transkripce genu vznikají dva alternativní produkty m-RNA, podle nichž pak vznikají dva různě dlouhé pro-peptidy s identickou C-koncovou sekvencí. Ty jsou pak kráceny pro-hormonkonvertasami na CART (55-102) nebo CART (62-102)³, které mají po centrálním podání stejnou biologickou aktivitu^{4,5}.

Peptidy CART jsou exprimovány především v centrálním nervovém systému (CNS), zejména v hypothalamu, ale také hojně v kortexu, zadním mozku a jinde. V periférii se vyskytují v dřeni nadledvin, Langerhansových ostrůvcích pankreatu a v trávicím traktu⁶.

Peptidy CART se účastní celé řady fyziologických procesů v organismu, zejména centrální regulace příjmu potravy, energetického metabolismu, endokrinní regulace, ovlivňují funkci pankreatu.

3. Vztah peptidu CART k dalším peptidům ovlivňujícím příjem potravy

Expres CART v hypothalamu je řízena anorexigenním hormonem leptinem uvolňovaným z tukové tkáně⁷. Leptin stimuluje v *nucleu arcuatu* hypothalamu expresi a sekreci dvou anorexigenních neuropeptidů: peptidu CART a hormonu stimulujícího melanocyty (angl. melanocyte stimulating hormone, MSH, jeho pro-hormonem je pro-opiomelanokortin POMC). Na druhé straně leptin v hypothalamu tlumí expresi a sekreci neuropeptidu Y (NPY), nejúčinnějšího orexigenního (navozujícího pocit hladu) neuropeptidu, a to i přes peptid CART, neboť sám peptid CART v hypothalamu inhibuje orexigenní účinky NPY⁷. Tento inhibiční účinek je zachován i u modelu myši obezity vyvolané v neonatálním období opakovanou podkožní aplikací glutamátu sodného, kdy je *nucleus arcuatus* nefunkční, ale ostatní jádra hypothalamu nepoškozena⁸. Kromě toho má peptid CART, který se uvolňuje i působí v CNS, synergistické anorexigenní účinky s dalším anorexigenním peptidem, cholecystokininem (CCK), který se uvolňuje po příjmu potravy v trávicím traktu a také působí centrálně⁹ (obr. 1). Tento účinek souvisí se synergistickou aktivací neuronů ve společných cílových místech obou peptidů, tj. v mozkovém kmeni a paraventriculárním a dorsomediálním jádru v hypothalamu^{9,10}.



Obr. 1. Synergistický účinek peptidu CART a CCK⁹; kumulativní příjem potravy (6–8 myši na skupinu) v gramech (g) 30 min po intraperitoneálním podání cholecystokininu (CCK), event. v kombinaci s intracerebroventrikulárním podáním peptidu CART(61-102). Trojice sloupců znázorňuje hodnoty vždy pro dávky CCK 0, 0,4 a 4 µg kg⁻¹, a to bez peptidu CART (sloupce A) nebo v kombinaci s 0,1 µg CART/myš (sloupce B), resp. s 0,5 µg CART/myš (sloupce C). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (látká vs. fyziologický roztok), + $P < 0,05$ (kombinace s CCK vs. samotný CART (61-102) 0,1 µg/myš), ++ $P < 0,05$ (kombinace s CCK vs. samotný CART (61-102) 0,5 µg/myš)

4. Hledání receptoru peptidu CART

Pro peptid CART nebyl dosud nalezen receptor. Předpokládá se ale, že peptid CART realizuje své specifické biologické účinky přes receptor, neboť pro-peptid CART a jeho příslušná pro-hormon konvertasa jsou exprimovány stejnými neurony², podobně jako u jiných neuropeptidů, jejichž receptory jsou známy. Peptid CART se specificky

váže k buněčným membránám či celým buňkám s afinitou obvyklou pro endogenní ligandy receptorů^{11,12} a také aktivuje nitrobuněčnou signalizaci^{13,14}.

Vazba radioaktívne značeného peptidu CART, jmenovite ^{125}I -CART(61-102) k buňkám z *nucleu accumbens* a inhibície této vazby analogem guanosin-trifosfátu poukázala na možnost, že peptid CART se váže k receptoru spázaným s G-proteinem¹². Naše laboratoř demonstrovala

Tabulka I

Struktura analogů peptidu CART a jejich vazebné afinity (upraveno dle cit.¹⁵⁾

[illegible]

^a Průměr ± S.E.M. ze tří až pěti samostatných experimentů. Kompetitivní vazebné pokusy probíhaly 30 min při 37 °C s intaktními buňkami PC12. K_i bylo vypočteno z Chengovy-Prusoffovy rovnice (koncentrace radioligandu byla 0,1 nM a K_d ze saturačních vazeb byla u nediferencovaných buněk 0,48 nM)

specifickou vazbu ^{125}I -CART(61-102) k potkaní feochromocytomové buněčné linii PC12, a to k nativním buňkám i diferencovaným pomocí nervového růstového faktoru na neurony¹¹.

Co se týká nitrobuňčných účinků peptidu CART, bylo uveřejněno, že peptid CART snižoval průnik vápenatých iontů depolarizovanou buněčnou membránou primárních neuronů tak, že inhiboval napětím řízené vápníkové kanály¹⁴. Kromě toho po centrálním podání peptidu CART byla pozorována zvýšená exprese raného genu (early gene) c-Fos v neuronech regulujících příjem potravy v hypotalamu^{9,13}.

5. Hledání kratších biologicky aktivních analogů peptidu CART

Peptid CART má velmi kompaktní strukturu klubička stabilizovanou třemi disulfidovými můstky, k němuž je připojen na N-konci peptidu krátký řetězec. Nativní aktivní peptid obsahuje 48 nebo 42 aminokyselin⁴. V naší studii jsme zjistili, že pro *in vitro* (vazebnou afinitu) a *in vivo* (anorexigenní účinek) aktivitu peptidu CART je nutný celý peptidový řetězec a žádný fragment peptidu CART odpovídající úsekům mezi disulfidovými můstky není biologicky aktivní⁵. Ze tří disulfidových můstků pouze jediný a to I-III, tj. mezi cysteiny 68 a 86, není nutný pro zachování biologické aktivity peptidu CART. Analog peptidu CART, v němž jsou původní cysteiny 68 a 86 nahrazeny alaniny, má zachovaný biologický účinek jak *in vitro*, tak *in vivo* (tab. I)¹⁵.

6. Farmakologické využití peptidu CART

Kromě hypotalamu je peptid CART produkován neurony *nucleu accumbens*, které také exprimují dopaminové receptory. Když se účinkem psychotropních látek zvýší přísun dopaminu k jeho receptorům, peptid CART zřejmě tlumí tento efekt¹⁶. Tato vlastnost a především anorexigenní účinek činí z peptidu CART cíl farmakologické intervence při závislostech na psychotropních látkách a především obezitě, protože důležitá úloha peptidu CART v regulaci příjmu potravy a vztah k ostatním peptidům účastnícím se tohoto procesu byl mnohokrát prokázán.

7. Závěr

Z farmakologického hlediska má peptid CART tu výhodu, že je velmi stabilní, na druhé straně jeho kompaktní struktura nepřipouští jeho zkrácení bez újmy na biologické aktivitě. Syntéza funkčních analogů peptidu CART je tudíž poměrně obtížná. Pokud by takový analog měl být potenciálním antiobezitikem, musel by být navíc modifikován tak, aby byl schopen přechodu přes hematoencefalickou bariéru do oblastí jeho působení v mozku. Doposud

popsané analogy jsou totiž účinné pouze po centrálním podání.

Pro peptid CART zatím nebyl identifikován receptor, a to ztěžuje jeho farmakologický výzkum. Přesto výrazně anorexigenní vlastnosti peptidu CART a jeho potenciálně zanedbatelné vedlejší účinky jsou hnacím motorem pro jeho další výzkum.

Podpořeno záměrem ÚOCHB AV ČR RVO:61388963 a grantem GA ČR P303/10/1368.

LITERATURA

1. Douglass J., McKinzie A. A., Couceyro P.: J. Neurosci. 15, 2471 (1995).
2. Spiess J., Villarreal J., Vale W.: Biochemistry 20, 1982 (1981).
3. Thim L., Kristensen P., Nielsen P. F., Wulff B. S., Clausen J. T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 2722 (1999).
4. Thim L., Nielsen P. F., Judge M. E., Andersen A. S., Diers I., Egel-Mitani M., Hastrup S.: FEBS Lett. 428, 263 (1998).
5. Maixnerová J., Hlaváček J., Blokešová D., Kowalczyk W., Elbert T., Šanda M., Blechová M., Železná B., Slaninová J., Maletínská L.: Peptides 28, 1945 (2007).
6. Vrang N.: Peptides 27, 1970 (2006).
7. Kristensen P., Judge M. E., Thim L., Ribøl U., Christjansen K. N., Wulff B. S., Clausen J. T., Jensen P. B., Madsen O. D., Vrang N., Larsen P. J., Hastrup S.: Nature 393, 72 (1998).
8. Železná B., Maixnerová J., Matyšková R., Haugvicová R., Blokešová D., Maletínská L.: Physiol. Res. 58, 717 (2009).
9. Maletínská L., Maixnerová J., Matyšková R., Haugvicová R., Pirník Z., Kiss A., Železná B.: BMC Neurosci. 9, 101 (2008).
10. Pirník Z., Maixnerová J., Matyšková R., Koutová D., Železná B., Maletínská L., Kiss A.: Peptides 31, 139 (2010).
11. Maletínská L., Maixnerová J., Matyšková R., Haugvicová R., Šloncová E., Elbert T., Slaninová J., Železná B.: Eur. J. Pharmacol. 559, 109 (2007).
12. Jones D. C., Kuhar M. J.: Synapse 62, 122 (2008).
13. Vrang N., Tang-Christensen M., Larsen P. J., Kristensen P.: Brain Res. 818, 499 (1999).
14. Yermolaieva O., Chen J., Couceyro P. R., Hoshi T.: J. Neurosci. 21, 7474 (2001).
15. Blechová M., Nagelová V., Žáková L., Demianová Z., Železná B., Maletínská L.: Peptides 39, 138 (2013).
16. Rogge G., Jones D., Hubert G. W., Lin Y., Kuhar M. J.: Nat. Rev. Neurosci. 9, 747 (2008).

V. Nagelová, B. Železná, and L. Maletínská
(*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Anorexi-
genic Neuropeptide CART in Food Intake Regulation**

The cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide is a brain-born and brain-acting neuropeptide with anorexigenic properties. Production of the CART peptide in the brain is regulated by the anorexigenic hormone leptin. The CART peptide acts synergistically with the anorexigenic gut hormone cholecystokinin in attenuating food intake and neuron activation. A compact structure of the CART peptide with three disulfide bridges does not permit to make the biologically active molecule shorter; only one disulfide bridge can be omitted without losing biological activity. So far the CART peptide receptor has not been identified.

PRVNÍ PŮLSTOLETÍ STEROIDNÍ CHEMIE

ALEXANDER KASAL a HANA CHODOUNSKÁ

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
kudová@uochb.cas.cz

Došlo 23.10.13, přijato 31.10.13.

Obsah

1. Šormova epocha
2. Steroidy v době normalizace
3. Steroidy po pádu komunismu
4. Současnost steroidů – Amazonky

1. Šormova epocha

Historický pohled na oddělení steroidní chemie musíme zahájit vymezením pojmu: když zakladatel oddělení – Ing. Dr. Václav Černý, DrSc. vytvořil první steroidní tým na akademii, nemluvílo se o oddělení, ale o „sektoru“. Později se objevil pojem skupina a až nakonec oddělení. Po roce 1989 uvažovala vědecká rada o možnostech úspor a tehdy se ujal návrh Ing. Michala Lébla, DrSc. zviditelnit hospodárnost jednotlivých oddělení, která byla přejmenována na „vědecko-ekonomické jednotky“ (VEJ). Tehdy začala éra pokusů o vyjádření ceny jednotlivých vědeckých publikací.

Obsazení budovy a vytvoření Ústředního ústavu chemického v roce 1950 mělo ve vyprávění jeho účastníků charakter téměř vojenský: lidé kolem prof. Ing. Vlastimila Herouta, DrSc. dobyli strategicky výhodné přízemí v čele budovy. Václav Černý a spol. pak čestně uhájili prostory směřující od dvora a utěšovali se tím, že jim letní žár chromatografické sloupce netrhal.

V lednu 1953 byl Ústřední ústav chemický zařazen do vznikající ČSAV jako Ústav organické chemie. I toto jméno se po sedmi letech změnilo na současný Ústav organické chemie a biochemie. Třikrát a dost, a tak už v dalších letech ke změně názvu nedocházelo, ač změna obsahu byla někdy až revoluční. Veřejnost si na tento dlouhý název zvykla, kolegové z jiných ústavů mluvili o našem ústavu jako o „vochabu“, v čemž se možná projevovala nejen rivalita, ale i závist. Ředitel ústavu – prof. František Šorm – dokázal svému ústavu leccos vydobýt, už např. jedna volná sobota v měsíci byla kdysi velkým ústupkem státní byrokracie.

Zřízení lékařské a později i zubní ordinace v budově ústavu bylo diktováno snahou o ekonomii pracovního času a jistě dalo dost práce. Ředitel obecně dbal na dodržování pracovní doby a tak náš ústav údajně získal i další prezdivku – kartouza šormská.

V době zavřených hranic neměl ÚOCHB konkurenci a mládí nastupující do ústavu to vědělo. Den začínal a končil píchačkami a bylo záhodno být aspoň jednou týdně přistižen akademikem v laboratoři v deset hodin večer. Mládí je samozřejmě vždy tvořivé. Když tehdy akademik v noci nakoukl do laboratoře, zeptal se obvykle: Jste tu sám? Pokud dotázaný dostatečně věrohodně zalhal, že vedle je ještě ten a ten kolega, měli oba na ten týden tak říkajíc splněný plán.

V této situaci zařadit výjezd početné skupiny „terpenářů“ na konferenci do Paříže bylo opravdovým oříškem a už už se zdálo, že se to řediteli povedlo. Abstrakty přednášek byly odeslány, program zasedání hotov, ale nakonec přišel zákaz a na konferenci směl vyjet jen ředitel. Ten zůstal solidární a do Paříže nejel. Mezi účastníky se pak vžil pozdrav: „Tak co, Paříž, paříž?“, který býval odbyt tradičním „pařil bych, pařil, kdyby mě ty ... pustily.“

Steroidní tým mívával vynikající pověst. Za první steroidní práci považujeme publikaci autorů F. Šorma a H. Dykové „On B-norcholesterol“ (Coll. Czech. Chem. Commun. 13, 407 (1948)), vytvořenou ale ještě na dnešní VŠCHT. O mezinárodním uznání týmu svědčí i to, že když prof. Carl Djerassi chystal dodnes užívanou monografii *Steroid Reactions* (Holden-Day, 1963), byl náš *Collection* jedním ze sedmi časopisů, z nichž jeho studenti měli čerpat příklady steroidních reakcí.

Prof. Šorm nebyl jen autorem první steroidní publikace zdejšího týmu. On definoval pro celý tým základní postoj k práci. Mnozí naši současníci se domnívají, že provozování vědy je svobodné povolání, jehož nejvlastnějším cílem je demonstrovat autorovu výjimečnost. Šorm cítil, že i vědecká práce je službou, byť její výsledky nemusí být bezprostředně zřejmé. V oblasti chemie steroidů třeba cítil, jak bylo naše zdravotnictví závislé na embargovaných výchozích surovinách. Vladimír Páral o něm píše jako o akademikovi v knize „Mladý muž a bílá velryba“ a zmiňuje osobní účast jeho i kolegyně Dykové (Edita) na zavádění průmyslové izolace cholesterolu. Z levného cholesterolu toužil nalézt cestu k dalším steroidním prekurzorům. Tehdy dostupná metoda degradace postranního řetězce oxidací oxidem chromovým poskytovala jen 4 až 6% výťažky žádaného meziproduktu dehydroepiandrosteronu. Úkol nakonec vyřešil ve spřízněném Výzkumném ústavu přírodních látek, jeden z aspirantů Václava Černého, Dr. V. Schwarz, PhD. Podařilo se mu vypracovat podmínky mikrobiální degradace postranního řetězce cholesterolu i směsí dalších sterolů mutantem druhu *Mycobacterium*, ale místo slávy ho čekala krutá sprcha: státní plánovací komise pod tlakem vyšších sil úkol zrušila a problém byl i s materiálním zajištěním přesunut do jiné země sovětského bloku.

Otázka steroidních surovin trápila prof. Šorma i v další oblasti: ve světě byla rozpoznána terapeutická užitečnost 18-substituovaných kortikoidů, jako byl aldosteron. Všechny steroidní školy se pustily do soutěže a každá jiným způsobem. Šorm, jako odborník ceněný za přínos v oblasti přírodních látek, se rozhodl využít pro jejich výrobu alkaloidy z indické rostliny *Holarrhena antidysenterica*, francouzská škola plánovala využití žlučových kyselin, německá rozpracovala totální syntézy.

Šorm nebyl žádný troškař a tak jednoho dne do Prahy dorazila zásilka 800 kg sušené kůry indické Holarrheny, z níž jsme izolovali 5 kg krystalického konessinu a kilogram holarrhiminu. Švýcarská škola hodlala využít zcela novou chemickou disciplínu – fotochemii, ale nakonec to byl Sir Derek Barton, který svou fotolýzou 11 β -nitritů porazil všechny. Na jedné konferenci byl oceněn bonmot, že Bartonova fotochemická reakce dala steroidní chemii dalších deset let na výsluní.

I za Šorma jsme cítili tlak na získání praktických výsledků. Ten vedl podle tehdy módní praxe k založení „brigády socialistické práce“, která měla zavést do výroby feromon kance (5 α -androst-2-en-17-on). Dva pracovníci týmu ztratili asi rok své vědecké kariéry optimalizací přípravy, předváděním této přípravy kolegům z firmy Galea*, sepisováním zpráv o aktivitě brigády atd. Výroba feromonu pro použití ve velkochovu prasnic byla ale na konec ze státního plánu stejně odstraněna. Oficiálním důvodem bylo údajné ohrožení tak potřebného exportu zamořením výrobní linky, skutečným důvodem bylo to, že to lidem ve výrobě překvapivě smrdělo. Ke zrušení možná přispěla aféra s poškozením zdraví: jeden ze zaměstnanců ve výrobě neporozuměl zcela mechanismu očekávaného účinku feromonu a tak si onen nešťastník nastříkal jeho roztok v 96% ethanolu přímo na penis.

Svého času býval odkaz na tradici vítaným bonbonkem. Při přednáškách v cizině jsme vysvětlovali, proč stále ještě pracujeme se steroidy. Posluchači kvitovali s povděkem, že to přeci bylo v Praze, kde v roce 1888 Friedrich Reinitzer stanovil správné složení cholesterolu na základě elementární analýzy řady svých precizně přečištěných derivátů¹. Nevěděl, chudák, nic o impact faktorech, publikoval v lokálním rakouskouherském časopise *Monatshefte für Chemie*, a tak byl jeho náález nějakou dobu přehlížen mnohem slavnějšími, byť neúspěšnými konkurenty, ale nakonec se do učebnic stejně dostal².

Později jsme vídali ve filmech agenta 007 a v jeho chování jsme poznávali svého šéfa. Tak jako James Bond do telefonu jen zavrčel své „Bond, James Bond“, tak i prof. Šorm vstupoval do telefonického jednání s kolegy svým stručným „Šorm“. Když se nám třeba v laboratoři urodila sloučenina, o níž šéf předpokládal, že by mohla být fyziologicky užitečná, stačil telefon a spřízněný ústav už pospíchal, aby ověřil její aktivitu.

Nemohli jsme ovšem tenkrát očekávat, že by hvězdnou kariéru našeho Jamese Bonda náhle přerušila nevidaná válka, v níž by pět spojenců přepadlo šestého! Poslanec Šorm byl jedním z mála, kteří v památném zasedání hlasovali proti dočasnému umístění sovětských vojsk na našem území. Pojem *dočasný* rychle získal nový smysl a poslanec Šorm rychle ztratil všechny své občanské pozice.

V tu chvíli se ukázalo, jak izolovaní jsou jeho dosavadní chráněnci. Najednou všechny naše pokusy o meziústavní spolupráci narážely na zvláštní organizační překážky. Ústav dosud příliš spoléhal na schopnost svého šéfa zorganizovat biologické testování a tak se syntéza biologicky účinných látek bez možnosti jejich testování náhle dostala do vzduchoprázdna. Nutně následovala etapa studií, v nichž steroidní molekula byla jen rigidním modelem pro chemické reakce s dobře definovanými meziatomárními vzdálenostmi.

2. Steroidy v době normalizace

Ke změně muselo dojít už proto, že mnohé osobnosti z týmu zmizely: vedle prof. Šorma tým opustil Ludvík Lábler, který skončil ve Švýcarsku (CIBA) i Jiří Hora, který putoval přes Rakousko a po ročním působení v Anglii skončil v Holandsku. Nějakou dobu pokračovala steroidní chemie setrvačností, pak se část výzkumu soustředila na studium různých modifikací steroidního skeletu a reakcí pozměněných struktur.

Druhá část usilovala o nalezení vhodného biologického cíle. Nabízelo se sice pokračování programu výzkumu steroidních antiandrogenů, ale pravidelné posílání vzorků firmě Smith Kline & French Laboratorium v USA už nebylo v té době možné. S předběžnými výsledky nám vypočetl kolega Linet z Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii, stanovením účinku našich produktů na hmotnost semenných váčků, prostaty a svěrače řitního mladých krysích samečků, delší spolupráci s podobným biologickým testem jsme pak navázali s oddělením Dr. Stárky z Výzkumného ústavu endokrinologického. Spolupráce byla výhodná pro obě strany, protože my chemici jsme na oplátku pro endokrinology vyvinuli řadu haptenu pro selektivní imunologická i standardů pro analytické stanovení steroidních molekul v klinické praxi.

Studium látek potenciálně použitelných v lékařství bylo od počátku zatíženo velkým rizikem: pokud by se kterákoliv z našich látek měla dostat do komerčního použití, náklady na její zavedení do praxe by si tenkrát ústav nemohl dovolit. Je znám bonmot, který je jen přesným popisem situace ve farmacii: pokud by chtěla firma Bayer prosadit do výroby aspirin svého chemika a vynálezce Felixe Hoffmanna ve XX. století, nikdy by jí to za současných okolností neprošlo.

* Dříve GUSTAV HELL & Company z roku 1883, jedna z nejstarších farmaceutických firem ve střední Evropě.

3. Steroidy po pádu komunismu

V nových podmínkách jsme hledali steroid, který vykazuje biologickou aktivitu mimo farmacii. Tím se zdál být brassinolid a látky jemu podobné, rostlinné hormony zvyšující úrodu tím, že chrání kulturní rostliny před stresem, který jim působí nízká či vysoká teplota, sucho nebo zamokření, zasolená i jinak znečištěná půda, napadení škůdci a podobně. Bylo vyvinuto několik účinných analog, jejichž užitečnost byla prokázána i v polních testech. Patent se ale nakonec nepodařilo výhodně prodat.

Se změnou politických poměrů ale pokračoval vnitřní tlak proti existenci steroidních studií na ústavu. Ve veřejných diskusích měli vedoucí týmů obhajovat smysluplnost své tematiky před ostatními pracovníky. Ti často nerozuměli vědeckému argumentu a tak se chytali témat vedlejších. Protiargumentem se např. stala nikdy nevyřčená věta, že děláme vědu ze svého „muzea“ steroidních látek. To ani nebylo možné, protože množství jednotlivých vzorků v muzeu by tenkrát pro testování na určitý fyziologický cíl nestačila, ale byla to jednoduchá a snadno pochopitelná námitka.

V této etapě dozněla éra antiandrogenů i jiných biologicky zaměřených experimentů^{4–8}. Stejně tak končila etapa studia steroidů jako modelů pro obecné studium organických reakcí^{9–11}. Smělu měl další projekt, který sice skončil publikací v prestižním časopise a evropským patentem, ale ten pak nebyl řádně využit, když jeho hlavní autor – Georges Teutsch (Roussel Uclaf) odešel do penze^{12,13}.

Při hledání vhodného tématu jsme se krátce angažovali ve studiu role steroidů v léčbě osteoporózy, protože tam se rýsovala spolupráce s domácím odborníkem^{14,15}. Projekt byl ale předčasně ukončen, když si onen odborník uvědomil, že jiná spolupráce bude finančně výhodnější.

Tlak proti studiu steroidů dále sílil, když počty steroidních prací publikovaných ve světové literatuře nadále klesaly. Vysvětlení bylo nasnadě: komerční potenciál steroidů zahnal většinu steroidních expertů do laboratoří farmaceutických firem, které publikovaly své výsledky jen v případech látek zřetelně neúčinných. Mnohokrát jsme totiž z různých zdrojů zaznamenali zprávy o účincích látek, jejichž příprava nebyla nikdy samostatně publikována.

S nástupem grantového systému se změnil i přístup k historii. Praxe nás naučila nové módě při psaní grantů, např. v titulu už teď nemohlo být jedovaté slovo *steroid*, v literární rešerši jsme záměrně uváděli pouze nejčerstvější citace, abychom předešli oblíbenému klišé o zastaralosti tematiky. Oponenti museli být dle pravidel grantových agentur vybírání z ostatních ústavů, takže jejich znalosti steroidní tematiky zcela automaticky nemohly být aktuální. O steroidech se tito kolegové učili před více než dvaceti lety a mylně se tedy domnívali, že už tehdy skončil veškerý pokrok ve steroidní chemii.

Grantový systém nás tehdy trochu trápil a není divu, že jsme o tom mluvili i na mezinárodních setkáních. Např. na otázku, zda ve Francii je věda taky podporována granty, přišla zajímavá odpověď: „Ano, ale ne zásadně. Francie je totiž na grantový systém moc malá!“

Nakonec došlo k zásadní reorganizaci a z celého steroidního oddělení zůstala jen skupina tří vědeckých pracovníků a dvou laborantek jako tým cíleného výzkumu. Pro tým se vžila přezdívka Amazonky, třebaže se některé jeho členky klasifikací brání. V zájmu spravedlnosti je třeba připustit, že dosud tyto Amazonky žádného muže nezabily. Tým opustil tradiční prostory v přízemí severozápadního křídla, a jeho osud je načrtnut v příští kapitole.

4. Současnost steroidů – Amazonky

Výsledkem celosvětového hledání steroidů pro léčebné účely ve 40. a 50. letech minulého století vedlo ke snadné dostupnosti anabolických steroidů a tím i k jejich hojnému užívání. U uživatelů bylo ale možno pozorovat zvýšenou agresivitu, impulsivitu a celkový posun osobnostních charakteristik. Také kolísání hladiny steroidních hormonů v ženském těle začalo být dáváno do souvislosti se změnami nálad a chování. Zkoumání těchto jevů vedlo k objevu, že steroidy nejen v mozku působí růst tkáně, ale také rychle modulují přenos nervového signálu, tj. přenos informace neurotransmitery na synapsích. A dokonce, že si mozek vyrábí přesně definované molekuly steroidů sám pro svou vlastní potřebu. A takové sloučeniny – **neurosteroidy** – jsou nyní v centru zájmu našeho týmu. Mají totiž velice užitečné vlastnosti¹⁶. Některé mohou zlepšovat paměť a usnadňovat učení, jiné ochrání mozek před následky zranění, mrtvice, nedostatku kyslíku a další mohou zmírňovat pocit strachu, zlepšovat spánek, zabraňovat křečím, působit proti epilepsii, zmírňovat projevy stárnutí.

Kromě těchto žádoucích vlastností mají neurosteroidy i některé nevýhody. Například se působením enzymů velice rychle mění na neúčinné analogy, nebo dokonce látky, které působí proti původnímu prekurzoru. Tento rychlý katabolismus má svou roli v potřebě rychlé reakce mozku, ale pokud bychom chtěli takové sloučeniny používat k léčení nemocí, nebo příznivému ovlivnění některých procesů, například stárnutí, nebo rychlosti učení, tato rychlá metabolická deaktivace by byla nevýhodná.

Další nevýhodou pro pohodlnou aplikaci je malá rozpustnost steroidů ve vodě. Připravit derivát, který bude rozpustný ve vodě, v organismu přiměřeně stabilní, a přitom si zachová svoji biologickou aktivitu, to byl jeden z úkolů syntetického chemika. Občas i při cílené syntéze jsme narazili na zajímavou reakci, kterou jsme nemohli nechat nevyužitou a dovolili jsme si přepych prostudovat ji¹⁷.

Studium neurofyziologické aktivity se neobejde bez spolupráce s odborníky. Podařilo se nám vytvořit širokou síť výzkumníků z různých oborů, se kterými na studiu vztahů mezi steroidy a činností nervové soustavy spolupracujeme. Od čistě teoretických výpočtů až k složitě uspořádaným etologickým experimentům s laboratorními zvířaty.

V jednom takovém pokusu naši kolegové zkoumali, jak budou reagovat myši samci na vzájemný kontakt. Myši samce rozdělili podle chování na agresivní, bázlivé a přátelské. Při umístění referenčního přátelského samečka do jednoho boxu s pokusným bázlivým, nebo agresivním,

kterému byl předem aplikován náš produkt, sociálně problematictí živočichové se překvapivě začali chovat též přátelsky. Bez steroidu se ale bázliví krčili v koutě a agresivní útočili.

V současnosti sledují naši kolegové z řad fyziologů vliv našich cíleně připravených produktů na modelech deprese, mozkové mrtvice, neuropatické bolesti. Těto společné práce se občas dostávají i veřejného uznání. Např. v roce 2011 dostal za studii našich produktů stážista VŠCHT Lukáš Rambousek cenu Gaudeamus** v rámci akce Česká hlava. V roce 2006 jsme obdrželi, cenu J. E. Purkyně za významnou publikaci¹⁸ v prestižním zahraničním časopise.

Užitečným výsledkům se dnes především snažíme zajistit před zveřejněním patentovou ochranu. Ve spolupráci s TTO UOCHB jsme přihlásili několik vynálezů. Na některé již patenty byly uděleny, jiné jsou zatím v řízení.

LITERATURA

1. Reinitzer F.: *Monatsh. Chem.* 9, 421 (1888).
2. Fieser L. F., Fieser M.: *Steroids*, str. 36. Reinhold, New York 1959.
3. Kasal A., Linet O.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 34, 3479 (1969).
4. Stárka L., Hampl R., Kasal A., v knize: *Receptor Mediated Antisteroid Action* (M. K. Agarwal, ed.), str. 17. Walter de Gruyter, Berlin 1987.
5. Kolena J., Kasal A.: *Biochim. Biophys. Acta* 979, 279 (1989).
6. Pokorná J., Kasal A.: *J. Steroid Biochem.* 35, 155 (1990).
7. Linhart O., Kvasnička P., Flajšhans M., Kasal A., Ráb P., Paleček J., Šlechta V., Hamáčková J., Prokeš M.: *Aquaculture* 132, 239 (1994).
8. Kasal A.: *Chem. Listy* 87, 223 (1993).
9. Schraml J., Čermák J., Kasal A.: *Magn. Reson. Chem.* 31, 689 (1993).
10. Schraml J., Jakoubková M., Kvíčalová M., Kasal A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1 (1994).
11. Kasal A., Schraml J., Čermák J.: *Magn. Reson. Chem.* 32, 394 (1994).
12. Lesuisse D., Berjonneau J., Ciot C., Devaux P., Doucet B., Gourvest J. F., Khemis B., Lang C., Legrand R., Lowinski M., Maquin P., Parent A., Schoot B., Teutsch G., Chodounska H., Kasal A.: *J. Nat. Prod.* 59, 490 (1996).
13. Gourvest J.-F., Kasal A., Lesuisse D., Teutsch J.-G.: EP 944 025 75.8
14. Kasal A., Nováček A.: *Osteol. Bull. (Praha)* 1, 17 (1996).
15. Nováček A., Živný P., Kasal A., Palička V., Řehořková P., Slaninová J.: *Osteol. Bull. (Praha)* 2, 52 (1997).
16. Rambousek L.: *Vesmír* 87, 364 (2008).
17. Šťastná E., Cerný I., Pouzar V., Chodounska H.: *Steroids* 75, 721 (2010).
18. Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., Vyklický L. Jr.: *J. Neurosci.* 25, 8439 (2005).

** L. Rambousek: Preklinický vývoj nových syntetických anionických medicínálních steroidů (VZP).

VONNÉ A CHUŤOVÉ SLOŽKY SLADŮ

KAREL CEJPEK

*Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
cejpekk@vscht.cz*

Došlo 5.10.13. přijato 5.12.13.

Klíčová slova: slad, vonné látky, chuťové látky, Maillardova reakce, oxidace lipidů

Obsah

1. Úvod
2. Fyzikální a chemické změny zrna během hvozdění
3. Prekurzory vonných a chuťových látek
 - 3.1. Sacharidy
 - 3.2. Aminosyseliny a bílkoviny
 - 3.3. Lipidy
4. Vonné a chuťové látky
 - 4.1. Streckerovy aldehydy
 - 4.2. Vicinální diketony a octová kyselina
 - 4.3. Furanové a pyranové deriváty
 - 4.4. Dusíkaté heterocykly
 - 4.5. Dimethylsulfid
 - 4.6. Chuťové látky
5. Závěr

1. Úvod

Slady se vyrábějí klíčením ječmene, případně jiných obilovin, a jeho následným sušením, tzv. hvozděním. Slady jsou jednou ze základních surovin pro výrobu piva. Připravují se z nich také další sladové nápoje, whisky nebo sladové výtažky. Mají význam i jako ochucovadla pro výrobky pečárenského průmyslu nebo snídaňových cereálií¹. Pro dosažení typického sladového aroma se zde používají zejména karamelové slady.

Slady dodávají pivu hlavní podíl extraktivních látek, které ovlivňují jeho základní fyzikálně-chemické, biochemické a organoleptické vlastnosti. Pro výrobu světlých piv slouží zejména světlé slady plzeňského typu, pro piva tmavá pak tmavé slady mnichovského typu. Kromě těchto základních varních sladů se pro zvýraznění některých vlastností tzv. speciálních piv používají další druhy – karamelové, barvicí, nakuřované, diastatické aj. Různé druhy sladů s typickými vlastnostmi se získávají různými režimy technologie máčení, klíčení (stadium zeleného sladu)

a hvozdění, tj. sušení a případného dalšího tepelného opracování obilného zrna (pražení). Rozsah tvorby vonných a chuťových látek nebo jejich bezprostředních prekurzorů, které se transformují na aromatické látky až během vaření piva, je dán zejména postupem hvozdění zeleného sladu. Pro porovnávání vlastností sladů se využívá konvenční (kongresní) metoda; slady se pak klasifikují zejména podle hodnoty barvy tzv. kongresní sladiny² (v jednotkách °EBC). Dosažení žádoucí vůně a chuti se během hvozdění kontroluje obtížně, i když jejich intenzita a charakter do značné míry souvisejí se stupněm zbarvení sladu.

2. Fyzikální a chemické změny zrna během hvozdění

Cílem prvního stadia hvozdění – předsoušení – je řízeným a velmi šetrným sušením snížit obsah vody v zeleném sladu. V této fázi ještě dobíhají biochemické procesy. Ve druhém kroku – fázi zvyšování teplot a dohřívání sladu – je pak třeba dosáhnout žádoucího stupně tvorby nebo změny senzorycky, fyziologicky a redoxně aktivních látek prostřednictvím několika typů reakcí, kterými jsou:

- a) Transformace redukcí sacharidů bez účasti aminosloučenin (karamelizace). Ve vyšších rychlostech probíhá až při poměrně vysokých teplotách a nízkých hodnotách aktivity vody (a_w). To jsou podmínky přípravu některých speciálních sladů.
- b) Maillardova reakce, tj. reakce redukcí sacharidů s aminosloučeninami. Aminosloučeniny zde plní roli nejen reaktantu, ale zejména katalyzátoru transformace sacharidů. Vzniká širší spektrum produktů než při karamelizaci, mezi nimi také produkty s dusíkem a příp. sírou v molekule, a to za podstatně mírnějších podmínek. U některých potravin včetně sladu se kromě bílkovin a aminosločin na Maillardově reakci do jisté míry podílejí rovněž aminy³.
- c) Ostatní reakce neenzymového hnědnutí. Do reakcí redukcí sacharidů a jejich degradačních produktů s aminosločinami a jejich degradačními produkty (aminy, amoniakem, aldehydy aj.) vstupují další reaktivní sloučeniny. Těmi jsou např. karbonylové sloučeniny přítomné ve sladu jako primární látky nebo jako sekundární produkty oxidace lipidů (opět zejména aldehydy), dále oxidované fenolové látky (zejména *o*-chinony), ionty kovů aj.
- d) Oxidace lipofilních složek.

Hlavními faktory, které ovlivňují průběh uvedených reakcí neenzymového hnědnutí, jsou teplota, doba reakce, pH prostředí, aktivita vody (a_w), druh a dostupnost reaktantů. Vzhledem ke komplexnosti reakce není optimalizace

jejího průběhu snadným úkolem. Ztěžuje ji zejména skutečnost, že jednotlivé proměnné jako je teplota, a_w , pH aj. nepůsobí odděleně, ale jsou na sobě do jisté míry závislé. Tím je odhad vlivu změny jednotlivých faktorů na průběh reakce značně ztížen.

Reakční pochody probíhající při hvozdění zeleného sladu jsou závislé na mnoha faktorech, zejména na (a) kvalitě ječmene a stupni rozluštění zeleného sladu, (b) vlhkosti zeleného sladu a rychlosti a podmínkách jejího snižování, (c) teplotě sladu při dané vlhkosti a stupni ventilace a (d) době, po kterou je slad ošetřován při určité teplotě.

Slady určené pro vaření piva jsou prakticky vždy sušeny na 6 % vlhkosti nebo méně⁴. Světlé slady pro výrobu spodně kvašených piv jsou obvykle předsušeny při teplotách vstupujícího vzduchu nanejvýš 55 °C a při dostatečném tahu ventilátorů. Rychlost sušení stoupá s klesající relativní vlhkostí vzduchu, který vstupuje do procesu. Světlé základní slady jsou běžně dotahovány při teplotách až 85 °C. Pro světlé slady používané pro výrobu svrchně kvašených piv je obvyklá dotahovací teplota asi 105 °C. Sušení sladu zaručuje takové chemické změny, které pak umožňují vtisknout pivu jedinečný charakter a snížit pravděpodobnost vzniku chladového nebo permanentních nebiologických zákalů.

Během hvozdění dochází k poklesu pH extraktu, klesá též hodnota horkého i studeného extraktu a rozpustného dusíku, zatímco množství extrahovatelných fenolových látek roste⁵. Ve finální fázi hvozdění se při teplotách nad 60 °C zpomalují nebo zastavují enzymové reakce v zrně. Dochází k inaktivaci enzymů, ať již v důsledku úbytku vody v zrně nebo vnějším tepelným zásahem. Ztráta aktivity enzymů je tím větší, čím více vody zrno při vysokých teplotách obsahuje.

Aktivita endopeptidas se zvyšuje do 50 °C a neztrácí se zcela ani při zvyšování teplot během tzv. dotahování sladu. Aktivita exopeptidas nejprve výrazně vzrůstá, ale v hotovém sladu je přibližně stejná jako ve sladu zeleném. Aktivita endo- β -glukanasy a lipas klesá během hvozdění jen málo, naopak u fosfatas klesá až na 50 %. Polyfenoloxidas a peroxidasy jsou výrazně inaktivovány při teplotách nad 80 °C. Jejich aktivita v době uhvozděném zeleném sladu bývá nevýrazná; ve slabě dotahovaných sladech je však ještě zřejmá. Důležité jsou změny enzymů, které odbourávají škrob: obsah α -amylasy se během předsušení zvyšuje až o 30 %, ale při dotahování klesá na svou původní hodnotu v zeleném sladu. β -Amylasy je na teplotu citlivější a její aktivita v hotovém sladu činí 40–50 % aktivity sladu zeleného⁵.

Pro tvorbu produktů reakcí neenzymového hnědnutí ve sladu je vhodný ječmen s vyšším obsahem aminosloučenin (bílkovin, peptidů a zejména volných aminokyselin), dokonale rozluštěný, tj. s vysokým obsahem redukujících sacharidů, nejlépe ve druhé fázi klíčení v atmosféře se zvýšeným obsahem CO₂, hvozděný v první fázi při vyšší vlhkosti a nižší teplotě a ve druhé fázi dotahovaný při vyšších teplotách.

Při výrobě karamelových a tmavých sladů jsou využity takové režimy s kombinací teplot, času a aktivity vody, že produkce aromatických, barevných a dalších látek probíhá intenzivně. Tmavý, značně aromatický slad lze získat zahříváním zeleného sladu na teplotu 120–130 °C a výše (tzv. karamelové slady). Při vyšších teplotách pražení a nižších hodnotách aktivity vody vzniká karamelizací samotných cukrů poněkud odlišné aroma.

Vliv teploty na chemické reakce bývá vyjadřován jako aktivační energie reakce. Hodnoty aktivační energie Maillardovy reakce, lépe řečeno jednotlivých reakcí spadajících pod toto komplexní schéma, se pohybují v širokém rozmezí od 10 do 160 kJ mol⁻¹. Ze závislosti reakčních rychlostí jednotlivých reakcí na teplotě, Arrheniových křivek, vyplývá, že při vysokých teplotách, jakých je dosaženo při pražení, je preferován např. vznik pyrazinů, nositelů pražného a oříškového aroma. Při nižších teplotách pražení (100–150 °C) dominuje tvorba látek s karamelovou vůní typu cyklotenů, např. 2-hydroxy-3,5-dimethylcyklopent-2-en-1-onu⁶. Za skladovacích teplot (do 30 °C) tyto látky prakticky nevznikají, ale tvoří se látky typu 5-hydroxymethylfuran-2-karbaldehydu, který se podílí např. na aroma zvětralého piva. V reakčních směsích glukosy s prolinem získaných za teplot pražení jsou mezi hlavními těkavými produkty také 2-acetyltetrahydropyridin, 5-acetyl-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolizin a maltoxazin. Zatímco aktivační energie vzniku pyrrolizinu byla stanovena na 188 kJ mol⁻¹, u zbylých dvou látek byla mnohem nižší⁷ (25–63 kJ mol⁻¹). Relativně nízká hodnota aktivační energie pro maltoxazin je v souladu s jeho hojným výskytem ve sladech. Aktivační energie Maillardovy reakce bývá ve srovnání s oxidací lipidů zhruba dvojnásobná. Rychlost Maillardovy reakce je závislá na teplotě více než oxidační reakce lipidů. U většiny potravin s nízkou hodnotou a_w je při skladovacích teplotách (20 °C) hlavní reakcí oxidace lipidů, zatímco Maillardova reakce je podstatně pomalejší. Jakmile teplota prostředí vzrůstá, Maillardova reakce zrychluje ve srovnání s oxidací lipidů 2–3krát rychleji.

Aktivační energie je značně závislá také na aktivitě vody (a_w). Se snižující se hodnotou aktivity vody rychlost vzniku produktů Maillardovy reakce obecně roste, zejména v oblasti středních hodnot aktivity vody (0,3–0,7), až dosahuje maxima. Další snižování aktivity vody vede k poklesu rychlosti reakce. Tento pokles souvisí s charakterem zbývajících vody ve sladu. Podle rovnic sorpčních isoterm dle modelu Brunauer-Emmett-Teller (BET), případně Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB), představuje pro rozsah teplot 15–35 °C voda pevně vázaná v monomolekulární vrstvě 4,25–4,39 % (rovnice BET), případně 4,6–5,1 % (rovnice GAB) hmotnosti sladu⁸. Tyto hodnoty odpovídají aktivitě vody v rozsahu 0,16–0,19 (BET), případně 0,19–0,21 (GAB). U klíčových meziproduktů Maillardovy reakce, Amadoriho sloučenin, je aktivační energie vzniku na a_w v oblasti středních a vyšších hodnot a_w prakticky nezávislá, zatímco po přechodu do oblasti nízkých hodnot a_w prudce roste. V suchých potravinách tak Amadoriho produkty vznikají podstatně obtížněji než v roztocích.

3. Prekurzory vonných a chuťových látek

3.1. Sacharidy

Má se za to, že za vznikem aroma sladů stojí zejména Maillardova reakce. Za primární prekurzory aromatických látek sladu lze proto považovat redukující sacharidy a volné aminokyseliny. Kromě monosacharidů se Maillardovy reakce při sladování přímo účastní maltosa, isomaltosa nebo maltotriosy. Obsah mono- a oligosacharidů (cukrů) v klíčovém zrna je funkcí dynamické rovnováhy, dané zejména rozsahem hydrolyzy, respirace a syntézy⁹. Během klíčení ječmene na zelený slad se štěpí asi 20 % škrobu obsaženého v ječmeni¹⁰. Hydrolyza škrobu pokračuje během předsušení zeleného sladu. Vlivem řady amylolytických, celulolytických a transglykosylačních enzymů nastávají při sladařském zpracování ječmene výrazné změny v celkovém obsahu a poměrném složení sacharidových složek. Část vzniklých glukooligosacharidů a monosacharidů pak v dalších procesech slouží jako substrát pro kvasinky, část vstupuje do reakcí neenzymového hnědnutí během hvozdní sladu, rmutování a dalších fází výroby piva.

Hlavním faktorem, který ovlivňuje koncentraci cukrů v mladínách připravených ze sladů, je způsob a intenzita tepelného ošetření při hvozdní a pražení sladů. Ve fázích předsušení dochází vlivem dozrívající amylolytické aktivity k významnému nárůstu koncentrace redukujících sacharidů⁹. Následně pak významné množství těchto redukujících sacharidů při dotahovacích teplotách hvozdní vstupuje do reakcí neenzymového hnědnutí, ve kterých se tvoří vonné a chuťové látky¹¹. Během hvozdní světlého sladu zůstává obsah sacharosy prakticky nezměněn nebo mírně roste, zatímco obsah redukujících sacharidů se oproti zelenému sladu sníží – glukosy na 62 %, fruktosy na 66 %, maltosy na 38 %, maltotriosy na 41 % a vyšších oligosacharidů na 51 %.

Obsah jednotlivých cukrů v mladínách připravených z různých sladů je uveden¹² v tabulce I. Množství celkových cukrů v mladínách roste v pořadí: pražený ječmen < čokoládový slad < barvicí slad < ječmen < zelený slad < krystalový slad < karamelový slad < světlý slad. Stejně pořadí platí i pro většinu jednotlivých cukrů. Maltosa, nejvíce zastoupený redukující sacharid, se podílí na celkovém obsahu cukrů v mladínách s přídavkem karamelového a krystalového sladu z více než 50 % a v mladínách připravených z ječmene, zeleného a světlých sladů z více než 70 %. V mladínách z intenzivně pražených sladů (praženého ječmene, černého a čokoládového sladu) je celková koncentrace cukrů nižší než 1,3 g/100 g; jsou zde detegovatelné pouze maltosa a maltotriosy, nikoliv ale glukosa, fruktosa nebo sacharosa.

3.2. Aminokyseliny a bílkoviny

Partnery redukujících sacharidů v Maillardově reakci jsou aminosloučeniny. V procesu sladování až do tzv. enzymové fáze sušení (do 60 °C) dochází působením proteolytických enzymů karboxypeptidas, exo- a endopeptidas ke štěpení bílkovin a zvýšení rozpustnosti dusíkatých látek ječmene zrna⁵. Sušina světlého sladu obsahuje asi 3,5 % bílkovin¹³, z nichž se do roztoku během rmutování uvolní asi 40 % v závislosti na metodě a teplotě rmutování. Tyto bílkoviny a peptidy pak v pivu působí jako tlumivé složky, přispívají k plnosti chuti, ovlivňují charakter a stabilitu pěny a podílejí se na koloidních zákalech piva¹⁴.

V Maillardově reakci se s výhodou uplatňují volné aminokyseliny. Pro rozvoj a charakter reakce je důležitý jak celkový obsah aminosloučenin a peptidů, tak jejich relativní zastoupení. Slady vyrobené odlišnými sladovací-

Tabulka I

Obsah jednoduchých sacharidů v mladíně připravené z různých sladů (v g/100 g sladu)^a, vlhkost sladu a barva kongresní sladiny¹²

Zdroj sacharidů	Glukosa	Fruktosa	Sacharosa	Maltosa	Maltotriosy	Celkem	Vlhkost [%]	Barva [°EBC ²]
Ječmen	0,24	nd ^b	0,96	10,70	1,05	12,95	13,7	nd
Zelený slad	1,74	0,39	nd	11,94	0,91	14,97	46,0	nd
Světlý slad I	3,15	0,34	2,69	42,02	7,65	55,85	4,7	5
Světlý slad II	3,71	0,40	3,68	42,82	6,69	57,30	4,8	5
Karamelový slad	5,40	0,23	2,73	19,46	6,33	34,15	7,9	16
Krystalový slad	3,99	0,52	2,64	13,91	4,81	25,87	4,6	180
Barvicí slad	nd	nd	nd	0,18	0,38	0,56	1,2	1400
Čokoládový slad	nd	nd	nd	0,49	0,77	1,26	1,1	830
Pražený ječmen	nd	nd	nd	0,10	0,26	0,36	0,8	1200

^a Vztaženo na sušinu, ^b nd – nedetegováno

mi programy nebo z různých odrůd ječmene obsahují různá množství a poměry aminokyselin. Obsah a složení aminokyselin ovlivňuje zkvasitelnost, neboť aminokyseliny patří mezi základní živiny. V případech, kdy se vyrábějí piva s použitím nedostatečného množství sladů (tj. používají se surogáty, jako je kukuřičný škrob, sirupy, rýže apod.), vznikají velké problémy s kvašením piva v důsledku nízké koncentrace dusíkatých látek.

V ječném světlém sladu je nejčtenější aminokyselinou prolin, který představuje kolem 12 % obsahu aminokyselin v celkovém proteinu a asi 20 % (15–24 %) v hlavním zásobním proteinu hordeinu. Hordeiny se kromě vysokého obsahu prolinu vyznačují také vysokým obsahem glutamové kyseliny⁴ (23–45 %). Prolin je také zdaleka nejčtenější volnou aminokyselinou v naklíčeném ječmeni. Část prolinu se uvolňuje ze zásobních bílkovin obsažených ve škrobnatém endospermu prostřednictvím kombinovaného působení kyselých proteas a karboxypeptidas, zatímco další část se uvolňuje ve formě malých peptidů ze štítiku (scutellum), ze kterých je pak prolin uvolněn aminopeptidasami a dipeptidasami¹⁵.

Celkový obsah aminokyselin zeleného sladu se při hvozdění do teploty 65 °C podstatně nemění, avšak zastoupení některých aminokyselin je proměnlivé. Množství a vzájemný poměr jednotlivých aminokyselin v mladině pak ovlivňují aktivitu kvasinek, dobu fermentace a také stabilitu aroma piva¹⁶. Některé aminokyseliny, zejména methionin, fenylalanin, valin, leucin, a isoleucin, jsou prekurzory Streckerových aldehydů, které se uplatňují jako významné složky aroma sladu. Z těchto důvodů je potřebné mít proces sladování pod kontrolou, aby bylo možné vhodně snížit výskyt nepříliš žádoucích aminokyselin ve sladince a zároveň dosáhnout stability aroma piva. Např. příliš vysoký obsah prolinu ve sladu je nežádoucí, protože kvasinky ho nemohou asimilovat¹⁷.

Celková hladina aminokyselin ve sladech je nepřímo úměrná míře tepelného zpracování (a také Maillardovy reakce) a roste v pořadí: pražený ječmen ≤ čokoládový slad ≤ barvicí slad ≤ krystalový slad < karamelový slad < světlý slad¹². Koncentraci volných aminokyselin kromě toho ovlivňují změny endospermu ječmene během klíčení způsobené aktivitou proteas. Zatímco v zeleném sladu je volných aminokyselin celkem asi 1,1 g kg⁻¹ sušiny, v mladině připravené ze světlého sladu (2–3 °EBC) už kolem 1,5 g kg⁻¹. S rostoucím stupněm tepelného namáhání sladu obsah volných aminokyselin klesá až na 40 mg kg⁻¹ sušiny v čokoládovém sladu. Nejvíce zastoupenou volnou aminokyselinou v mladinách všech vzorků sladu, s výjimkou těch pražených do vysokého stupně, je prolin. Světlé slady obsahují kolem 300 mg prolinu/kg sušiny. Hojně zastoupený je zde také glutamin (kolem 150 mg kg⁻¹ sušiny). Koncentrace volných aminokyselin ve sladech závisí na odrůdě ječmene, pěstebních podmínkách, době sklizně, sladovnických podmínkách (způsobu máčení, klíčení a hvozdění) i na způsobu extrakce volných aminokyselin.

3.3. Lipidy

V ječmeni se nacházející lipidová frakce představuje různorodou skupinu látek od uhlovodíků v kutikulárních voscích až po polární glyceridy se strukturálními funkcemi v buňkách. Celkový obsah lipidů v ječmeni je kolem 3,5 % v sušině. Asi třetina neutrálních lipidů je obsažena v klíčku, zbytek většinou v aleuronové vrstvě. Při sladování jsou důležité změny zejména v triacylglycerolové frakci. Část těchto lipidů je hydrolyzována lipasami na glycerol a volné mastné kyseliny. Nenasycené mastné kyseliny, resp. metabolické produkty oxidace esenciálních mastných kyselin lipoxygenasami mohou přispívat ke zvětralé chuti piva⁵ a dalších defektů aroma při stárnutí piva. Jedná se zejména o aldehydy, ketony, případně též o uhlovodíky a nižší mastné kyseliny; jejich vznik je popsán jinde^{3,24,26}.

4. Vonné a chuťové látky

Během hvozdění sladu vznikají za podmínek reakce neenzymového hnědnutí značně složité směsi nízkomolekulárních látek, zodpovědné za charakteristickou chuť a vůni sladu. Některé tyto látky se ve sladech sice vyskytují v koncentracích nižších, než je jejich prahová hodnota, ale vzhledem k tomu, že se vyskytují a působí ve směších, je jejich skutečný význam při projevu aroma někdy obtížné posoudit. Koncentrace vonných složek ve sladu závisí obecně na rychlostech jejich vzniku, transformace a odpaření během hvozdění¹⁸. Část aromatických látek se později stává prekurzory vstupujícími do dalších reakcí během vaření sladiny a při chmelovaru nebo je metabolizována kvasinkami, a tak se v aroma piva nakonec neuplatní.

Kromě vzniku žádoucí vůně a chuti dochází při hvozdění k odstranění nežádoucího aroma zeleného sladu. Experimentální piva, která byla připravena z nehvozděného zeleného sladu, vykazují nepříjemnou dlouhotrvající pachut', pokud nebyly během chmelovaru dotyčné látky z mladiny odstraněny speciálním stripovacím krokem⁵.

Mezi látky, které přispívají k chuti a vůni sladu, patří kyseliny, alkoholy, aldehydy, ketony, estery a heterocyklické sloučeniny, které obsahují kyslík, dusík nebo síru. Kromě produktů Maillardovy reakce se na aroma sladů podílejí také produkty jiných reakcí, ať už to jsou vonné apokarotenoidy s velmi nízkými podnětovými prahy ((*E*)-β-2,4-damascenon) nebo β-dioxopiperaziny s hořkou nebo hořko-kovovou chutí¹⁹ vznikající z lineárních dipeptidů nebo aminokyselin. Za podmínek hvozdění jsou částečně oxidovány a degradovány mastné kyseliny lipidů za vzniku celé řady látek, včetně nenasycených aldehydů, alkoholů, laktónů a jiných kyselin, obvykle s nežádoucím charakteristickým aroma.

Při výrobě světlých základních sladů se Maillardova reakce navenek téměř neprojevuje. Ve větší míře zde vznikají pouze senzoricky indiferentní meziprodukty, které se na aromatické látky mohou transformovat teprve během vaření piva. K takovým meziproductům patří např. ketosaminy (Amadoriho produkty). Různé typy sladů obsahují

rozdílná množství a relativní zastoupení Amadoriho produktů. Tmavé slady obsahují vzhledem k vyšším použitým teplotám (nad 100 °C) vyšší množství Amadoriho sloučenin než světlé slady, a to s charakteristickým složením²⁰. Na druhou stranu, u barvicích sladů připravených při až 200 °C jsou již všechny Amadoriho produkty zdegradovány. Při rmutování a vaření piva se pak asi polovina Amadoriho produktů transformuje na další produkty Maillardovy reakce. Obsah Amadoriho produktů (aminodeoxycukrů) ve světlých sladech činí 13–188 mg kg⁻¹ s typickou distribucí – nejvíce z 10 nalezených Amadoriho produktů bylo *N*-deoxyfruktosylglutamové kyseliny (Fru-Glu), *N*-deoxyfruktosylvalinu (Fru-Val) a *N*-deoxyfruktosylleucinu (Fru-Leu). U tmavého a tmavého karamelového sladu dosahují nejvyšších hodnot Fru-Leu (255 mg kg⁻¹), Fru-Val, *N*-deoxyfruktosyl- γ -aminomáselná kyselina (Fru-GABA) a Fru-Glu²⁰. Amadoriho sloučeniny vznikají pochopitelně i s aminoskupinami zbytkových aminokyselin vázaných v peptidových řetězcích; příkladem je ϵ -*N*-deoxyfruktosyllysin.

Mnoho vonných látek obsahují speciální slady, které se sice při výrobě speciálních piv používají v omezeném množství, ale v jejich aroma se prosazují výrazně. Již v roce 1964 identifikovali Damm a Kringstad²¹ hlavní aldehydy karamelového sladu – 2- a 3-methylbutanal. Od té doby byla provedena řada studií, které se týkaly složení těkavých frakcí různých typů sladu. Celkový počet těkavých látek zjištěných ve sladech je odhadován²² na přinejmenším 250.

Vandecan a spol.³ stanovili metodou headspace GC-MS po mikroextrakci na tuhou fázi (SPME) 14 významných vonných látek typických pro speciální, tj. barvicí, pražené a karamelové slady (tab. II). Nejvyšší

koncentrace alkyldiazinů nacházíme v praženém sladu, neboť reakce, které k nim vedou, jsou upřednostňovány právě při vysokých teplotách²⁴. Naopak furaneol a norfuraneol se v praženém sladu nacházejí v podstatně nižších hladinách než ve sladu karamelovém a barvicím. Při tepelném ošetření sladu nebo ječmene je v suchém prostředí (180 °C) upřednostněn vznik pyrazinů a furan-2-karbaldehydu, zatímco při zvýšené vlhkosti vzduchu vzniká víc Streckerových aldehydů. Protože cykloteny mohou vznikat jak v Maillardově reakci, tak i za podmínek blízkých pyrolyze cukrů²⁵, nacházejí se v relativně vysokých hladinách ve všech těchto sladech. (*E*)- β -2,4-Damascenon a γ -nonalaktone se nacházejí zejména v barvicím sladu. (*E*)- β -2,4-Damascenon může vznikat např. degradací 9'-*cis*-neoxanthinu²⁶. γ -Nonalaktone vzniká z linolové kyseliny. 5-Methyl-2-fenyl-2-hexenal, 4-methyl-2-fenyl-2-pentenal a 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal jsou obsaženy zejména v karamelovém sladu. 5-Methyl-2-fenyl-2-hexenal a 4-methyl-2-fenyl-2-pentenal vznikají aldolovou kondenzací fenylacetaldehydu s 3-methylbutanalem, resp. 2-methylpropanalem. 2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal vzniká kondenzací dvou molekul 3-methylbutanalu¹¹.

Některé speciální slady obsahují navíc jiné skupiny látek. Při přípravě sladů používaných pro výrobu nakuřovaných piv nebo sladové whisky se využívá rašelinový kouř. Mezi látkami, které kondenzují na povrchu sladu, je sice také furan-2-karbaldehyd a příbuzné látky, nejvýznamnější ale jsou fenolové látky, a to zejména fenol, guajakol, *o*-kresol, *m*-kresol, *p*-kresol, některé isomery xylenu a *p*-ethylfenol. Dalšími sloučeninami přítomnými v rašelinovém kouři jsou alkany, alkeny, uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, organické kyseliny a pyraziny⁵.

Tabulka II

Obsah vonných látek ve speciálních sladech²³ [mg kg⁻¹]

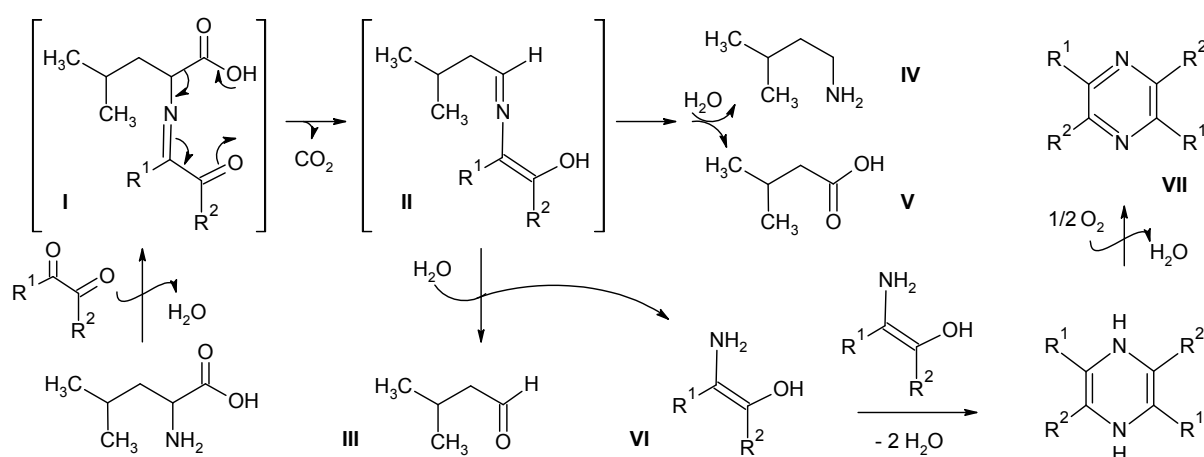
Vonná látka	Slad		
	barvicí	karamelový	pražený
Cykloten	1,2	1,9	2,0
Norfuraneol	1,6	2,2	0,5
Furaneol	15,1	14,3	4,0
Maltol	11,8	76,4	28,2
2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	0,5	0,5	0,1
2-Fenyl-2-butenal	0,3	0,4	0,5
4-Methyl-2-fenyl-2-pentenal	0,1	0,1	0,03
5-Methyl-2-fenyl-2-hexenal	0,5	0,6	n.q.
2,3,5-Trimethylpyrazin	0,5	0,3	0,5
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	0,5	0,2	1,5
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,1	0,03	0,2
2-Acetylpyrrol	11,6	10,3	1,2
γ -Nonalaktone	0,1	0,1	0,05
(<i>E</i>)- β -2,4-Damascenon	1,8	1,4	1,1

Tabulka III
Nejintenzivnější složky aroma karamelového sladu²⁷

Vonná látka	Charakter vůně	Zředovací faktor
3-Methylbutanal	sladová	2048
Methional	vařené brambory	1024
2- a 3-Methylbutanová kyselina	zatuchlá, po potu	1024
Dimethyltrisulfid	sírná	512
2-Methyl-3-(methylthio)furan	po vařeném mase	512
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon (furanol)	karamelová	1024
3-Hydroxy-2-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-on (maltol)	karamelová	256
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon (sotolon)	po ochucovadle	256
Octová kyselina	kyselá	512
3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd (vanillin)	vanilková	1024
4-Ethenyl-2-methoxyfenol	kořená	512
(<i>E,E</i>)-2,4-Dekadienal	olejovitá, voskovitá	1024
1-Okten-3-on	po houbách	1024
(<i>E</i>)-β-2,4-Damascenon	sladká; vařená jablka	512

Pouhé stanovení množství vonných látek ve sladu neumožňuje zjistit jejich význam pro celkové aroma; důležitými údaji jsou kromě tenze par zejména prahové hodnoty vnímání vůně jednotlivých látek. Tak např. furaneol lze ve vzduchu rozpoznat²⁷ již při koncentraci 1 ng l⁻¹, zatímco dihydromaltol při 10 ng l⁻¹ a maltol dokonce až při >1000 ng l⁻¹. Použitím metody zředovací analýzy (série ředění frakce 1:1 (v/v), n = počet ředění až do neurčení rozdílu v trojúhelníkovém testu, zředovací faktor $FD = 2^n$) byly jako olfaktometricky nejintenzivnější složky aroma vydestilovaného extraktu z karamelového sladu (Caramalt) vnímány 3-methylbutanal, 1-okten-3-on, methional, (*E,E*)-2,4-dekadienal, vanilin (vzniká oxidací vinylguajakolu, produktu dekarboxylace ferulové kyseliny), 2- a 3-methyl-

butanová kyselina a furaneol (tab. III). Mezi významnými velmi těkavými aromatickými látkami karamelových sladů jsou také dimethylsulfid (aroma vařeného zelí či zeleniny) a 2-methylpropanal (sladové). K celkovému aroma karamelového sladu výrazně přispívají i (*E*)-β-2,4-damascenon, 2-methyl-3-(methylthio)furan, octová kyselina, 4-ethenyl-2-methoxyfenol, maltol a sotolon (aroma bílkovinného hydrolyzátu)²⁷. Naopak např. 2-methylbutanal, biacetyl, cykloten ($FD = 16$), 2-acetyl-1-pyrrolin, norfuranol ($FD = 32$) nebo 2-methoxy-3-isopropylpyrazin ($FD = 64$) se v celkovém aroma karamelového sladu tolik neuplatňují. Klíčovými reakcemi pro aroma karamelového sladu jsou tak Streckerova degradace aminokyselin a peroxidace lipidů.



Obr. 1. Významné produkty Streckerovy degradace leucinu α-dikarbonylovými sloučeninami (III–VII); meziprodukty nestabilní ve vodném prostředí (I a II)²⁸ jsou uvedeny v závorkách

4.1. Streckerovy aldehydy

Dekarboxylace a deaminace aminokyselin způsobená atakem oxidačních činidel, tzv. Streckerova degradace, je při tepelném zpracování potravin obvykle součástí komplexu Maillardovy reakce. Jedná se o významnou transaminační reakci, která se mj. podílí na inkorporaci dusíku do melanoidinů. Hlavní produkty této reakce – Streckerovy aldehydy (**III**) – jsou důležitými vonnými látkami řady potravin²⁸ (obr. 1). K aldehydům s nízkým podnětovým prahem, které se na aroma potravin podílejí nejvýrazněji, patří methional (po vařených bramborách; prahová hodnota ve vodě $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$), fenylacetaldehyd (květinová, po medu; $4 \mu\text{g l}^{-1}$), 3- a 2-methylbutanal a 2-methylpropanal^{11,29} (všechny po sladu; $0,2\text{--}0,35$; 4 a $1 \mu\text{g l}^{-1}$). 3-Methylbutanal (**III**) vykazuje kromě sladového a karamelového aroma i tóny čokoládové a mandlové, aroma 2-methylbutanal je popisováno jako sladové s tóny syra a jablečných esterů³⁰. Četné další vonné a také chuťové látky vznikají následnými reakcemi těchto aldehydů a dalších produktů Streckerovy degradace (obr. 1), zejména α -aminokarbonylových sloučenin (**VI**), amoniaku, aminů (**IV**) a mnoha heterocyklických i sirných sloučenin (sulfan, 1-pyrrolin, cysteamin apod.). Karboxylové (Streckerovy) kyseliny (**V**) vznikají za oxidačních podmínek v přítomnosti stop kovů s proměnnou valencí, více v alkalickém prostředí a lépe účinkem α -dikarbonylových fragmentů než deoxyglykosulos. Spektrum produktů se často ještě zvyšuje v důsledku redoxních reakcí vznikajících meziproduktů. Fotooxidační degradaci methioninu vzniklý methional a také jeho degradační produkt methanthiol (sirné aroma) jsou společně s 3-methyl-2-buten-1-thiolem nositelem sluneční neboli letinkové příchuti piva³¹.

Zvláště účinnými oxidačními činidly při Streckerově degradaci aminokyselin jsou α -dikarbonylové sloučeniny, zejména jednoduché sloučeniny vznikající degradací cukrů aj. složek potravin³ (glyoxal, methylglyoxal a glykosulose). Tyto sloučeniny, podobně jako α -hydroxykarbonyly typu glykolaldehydu, acetolu nebo acetoinu, se v běžných koncentracích nevyznačují výraznými organoleptickými vlastnostmi. Jsou však prekurzory mnoha důležitých vonných a chuťových sloučenin, zejména heterocyklických, které vznikají v Maillardově reakci, a uplatňují se v mnoha redoxních a adičních reakcích.

Některé studie poukazují na to, že řada vonných látek, např. Streckerových aldehydů, vzniká z přítomných prekurzorů při kontaktu s vodou během aplikace laboratorních postupů pro izolaci vonných látek. Streckerovy aldehydy pak vznikají jako artefakty, které vedou k falešně pozitivnímu výsledku. Např. během simultánní destilace a extrakce použité při izolaci těkavých látek sladu (karamelové a mnichovský) vznikají z příslušných prekurzorů (látky **I** a **II**, obr. 1) Streckerovy aldehydy v množstvích až 100krát větších, než je skutečně ve sladu přítomno²⁸. Podobný proces vzniku těchto vonných látek z prekurzorů přítomných ve sladu lze předpokládat i během rmutování a vaření pív.

4.2. Vicinální diketony a octová kyselina

Vicinální diketony (biacetyl a pentan-2,3-dion) vznikají retroaldolizací nebo štěpením intaktních řetězců transformovaných cukrů³. Při pražení sladů vykazuje křivka jejich koncentrace v čase poměrně ostré maximum, které odpovídá sladu s barvou asi 390 °EBC (získaný např. po 105 min pražení při 157 °C). Maximum koncentrace octové kyseliny nastává při ještě vyšších teplotách (např. 172 °C) a hodnotě kongresní barvy sladu 560 °EBC (cit.³²). Octová kyselina vzniká fragmentačními mechanismy z monosacharidů, u disacharidů byla pozorována pouze tvorba mravenčí kyseliny³³. Následné snížení koncentrace obou diketonů a octové kyseliny jde na vrub vytékání nebo konverzi na jiné sloučeniny včetně inkorporace do struktury melanoidinů. K masivnějšímu vzniku vicinálních diketonů pak může dojít během kvašení mladiny. V pivu jsou však tyto látky spíše nežádoucí, neboť jsou indikátorem oxidace nebo nežádoucí bakteriální kontaminace. Biacetyl může vznikat rovněž z diacetylformoinu po jeho redukci, dehydrataci a hydrolýze. Pokud biacetyl reaguje aldolovou reakcí s formaldehydem, dehydratuje se a redukuje, vzniká pentan-2,3-dion; ten vzniká také aldolizací hydroxyacetonu a acetaldehydu s následnou dehydratací³⁴. Biacetyl má podnětový práh^{22,29} $4 \mu\text{g l}^{-1}$, octová kyselina 22 000 $\mu\text{g l}^{-1}$.

4.3. Furanové a pyranové deriváty

Furanony jsou ve významnějších koncentracích nacházeny pouze v karamelových (krystal) sladech, zatímco ve světlých základních sladech se obvykle neprojevují. Jak prokazují Mackie a Slaughter³⁵, základní světlé slady obsahují významná množství blíže nespecifikovaných prekurzorů – meziproduktů Maillardovy reakce, ze kterých pak tyto furanony vznikají ve větší míře při vaření a kvašení piva. Charakteristické příjemné aroma má furan-2-karbaldehyd vznikající z pentos, případně L-askorbové kyseliny, a 5-methylfuran-2-karbaldehyd, který vzniká z 6-deoxyhexos³. Zřejmě nejvýznamnějšími furany ve většině komodit jsou isomaltol a 4-hydroxy-3(2H)-furanony³.

Pyranony vyskytující se v potravinách jsou hypoteticky odvozeny od α -pyronu nebo γ -pyronu. Bezesporně nejvýznamnějším γ -pyronem je maltol, systematickým názvem 3-hydroxy-2-methylpyran-4-on. Maltol, ale také δ -lakton 3-hydroxy-2-pyron, cyklopentenolony (základní člen homologické řady je 2-hydroxy-3-methyl-2-cyklopenten-1-on, tzv. cykloten) a 4-hydroxy-3(2H)-furanony se vyznačují planárním uspořádáním molekuly a stejnou konfigurací enolové hydroxyskupiny a oxoskupiny. Aroma všech sloučenin s touto strukturou připomíná více či méně karamel nebo slad. Některé furanony a pyranony mají srovnatelně silné aroma se Streckerovými aldehydy – např. podnětový práh furaneolu je $0,6 \mu\text{g l}^{-1}$, jiné jej ovšem mají daleko slabší (norfuraneol 2100 $\mu\text{g l}^{-1}$, maltol 9000 $\mu\text{g l}^{-1}$)^{22,29}. Norfuraneol s karamelovým aroma a někdy vnímanými tóny po mase se ve sladech vyskytuje obvykle

v podprahových koncentracích³⁵. Jeho homolog 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon neboli furaneol vůni připomíná jahody, ve vyšších koncentracích sladký karamel. Ve světlých sladech se vyskytuje minimálně (obvykle $<0,01 \text{ mg l}^{-1}$ horkého vodného extraktu), více je ho ve sladech tmavých³⁵ (krystal $4,2 \text{ mg l}^{-1}$).

4.4. Dusíkaté heterocykly

Jako prekurzor dusíkatých vonných látek sladu má zvláštní význam prolin, neboť jeho Streckerova degradace vede ke specifickým těkavým produktům s nízkými prahovými hodnotami, ve kterých je pyrrolidinový kruh zachován (např. 2-acetyl-1-pyrrolin) nebo rozšířen (např. 2-acetyltetrahydropyridin – ten je směsí 2-acetyl-3,4,5,6-tetrahydropyridinu a 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridinu). 2-Acetyl-1-pyrrolin je významná vonná látka s prahovým a sladkým aroma a velmi nízkou prahovou hodnotou²⁹ ($0,1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$). 6-Acetyltetrahydropyridin má rovněž prahové aroma, ale poněkud vyšší prahovou hodnotu ($1,6 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$). Přítomnost 2-acetyl-1-pyrrolinu a 2-acetyltetrahydropyridinu má na aroma pečených či pražených cereálních výrobků, a tedy i speciálních sladů, zásadní vliv. Bylo zjištěno, že na aroma vznikajícím v modelových směsích glukosy s prolinem se podílí především 2-acetyl-3,4,5,6-tetrahydro-1*H*-pyridin (63 %), 2-acetyl-1-pyrrolin (19 %) a 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydro-1*H*-pyridin (13 %), dále pak furaneol (4 %) a biacetyl (0,5 %). Přestože byl 5-acetyl-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolizin co do množství hlavní těkavou látkou, podílel se na celkovém aroma jen 0,3 %. Jiný významný produkt prolinu, maltoxazin, se na aroma sladů nepodílí prakticky vůbec³⁶.

Důležitými prekurzory těchto látek jsou kromě prolinu také ornithin, arginin a lysin. Bezprostřední prekurzor 2-acetyl-1-pyrrolinu z ornithinu je 4-aminobutanal, který vzniká Streckerovou degradací. Tento aldehyd kondenzuje dále s hydroxyacetone a cyklizací a dehydratací produktu vzniká 2-acetyltetrahydropyridin³.

Deriváty pyrazinu (alkyl-, acyl-, alkoxy-pyraziny aj.) se vyskytují prakticky ve všech tepelně zpracovaných potravinách. Jsou nositeli charakteristického pražného, oříškového apod. aroma. Vznikají Maillardovou reakcí nebo pyrolýzou některých aminokyselin. Obecné schéma vzniku pyrazinů (**VII**) jako vedlejších produktů Streckerovy degradace aminokyselin s α -dikarbonylovými sloučeninami je uvedeno na obr. 1. Produktem reakce aminokyselin s glyoxalem je pyrazin, při reakci aminokyselin se směsí glyoxalu a methylglyoxalu vzniká methylpyrazin, reakcí se samotným methylglyoxalem vzniká 2,5-dimethylpyrazin atd. Z jednoduchých alkylpyrazinů vznikají jejich methyl- a ethylsubstituované deriváty také reakcí s formaldehydem a acetaldehydem. Jednoduché alkylpyraziny mohou vznikat také pyrolýzou netěkavých polyhydroxyalkylsubstituovaných pyrazinů³, které jsou produkty reakcí redukujících cukrů s aminokyselinami. K nejvýraznějším vonným látkám patří 2-ethyl-3,5-dimethyl- (prahová hodnota $0,04 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) a 2,3-diethyl-5-methylpyrazin²⁹ ($0,09 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$).

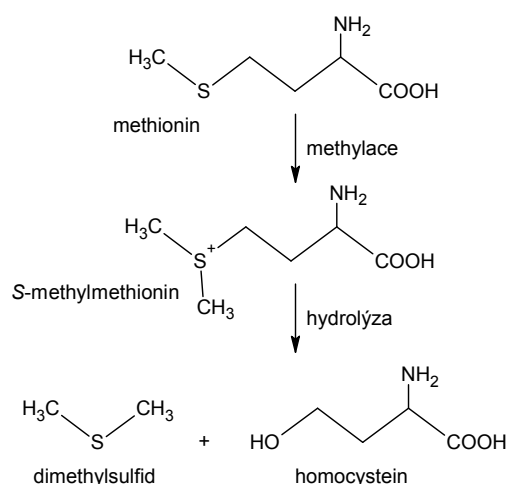
4.5. Dimethylsulfid

Při výrobě některých typů ležáků vznikají z prekurzorů přítomných ve sladech patrná množství těkavého dimethylsulfidu (DMS) s charakteristickým aroma (obr. 2). DMS ve vyšších koncentracích způsobuje v pivu nepříjemný přípach po vaření zelenině. Údaje o množstvích DMS a jeho prekurzoru někdy bývají součástí specifikace sladů pro výrobu pív vyráběných spodním kvašením. DMS se tvoří během hvozdní rozkladem termolabilního *S*-methyl-L-methioninu (SMM). Ten je přirozenou složkou rostlin, kde slouží jako zdroj methylových skupin²⁶. Slad s vysokým obsahem SMM se vyrábí z odrůd ječmene, které jsou bohaté na dusík a které jsou během klíčení velmi dobře rozluštěny. Použití abraze a gibberellové kyseliny zvyšuje stupeň rozluštění sladu, a tím i obsah SMM. Aby se zabránilo rozkladu SMM, je třeba hvozdní provádět nejkratší možnou dobu a zároveň při co nejnižší teplotě. Např. prodloužení doby hvozdní o 5 hodin při teplotě $75 \text{ } ^\circ\text{C}$ vede ke snížení hladiny SMM o 50 %. Množství SMM ve světlém sladu je desetinové ve srovnání se zeleným sladem, zatímco koncentrace DMS rostou přinejmenším o dva řády³⁷ (obvykle na jednotky mg kg^{-1}).

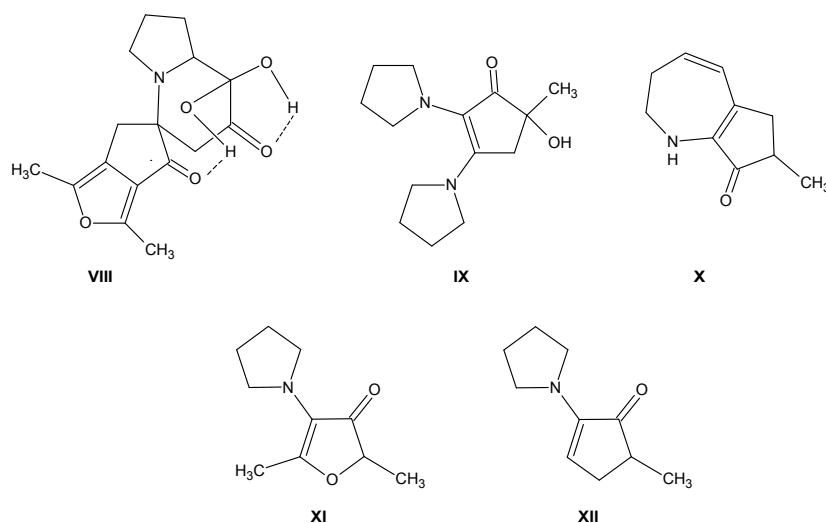
Dalším prekurzorem DMS, který se vyskytuje v některých sladech, je dimethylsulfoxid (DMSO). Vzniká pravděpodobně oxidací DMS nebo SMM. DMSO je netěkavý a může být během kvašení redukován na DMS kvasinkami. DMS může vznikat také při spontánní oxidaci methanthiolu, který vzniká Streckerovou degradací methioninu.

4.6. Chuťové látky

Některé produkty Maillardovy reakce vznikající během hvozdní a pražení sladů se uplatňují více při vnímání chuti než vůně. Mezi ně patří především některé produkty



Obr. 2. Vznik dimethylsulfidu z *S*-methyl-L-methioninu



Obr. 3. Hořké (VIII–X) a chladivé (XI, XII) látky v praženém sladu; (VIII) spirodiolonový derivát, (IX) bispyrrolidinohexosový reduktion, (X) 7-methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopenta[b]azepin-8(1*H*)-on, (XI) 2,5-dimethyl-4-(pyrrolidinyl)furan-3(2*H*)-on nebo 5-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyklopent-2-en-1-on

reakce prolinu s cukry. V reakčních směsích hexos a prolinu jsou nositeli hořké chuti kromě výrazného spirodiolonového derivátu (VIII) také bispyrrolidinohexosové reduktiony a cyclopenta[b]azepin-8(1*H*)-ony (IX a X, obr. 3). V přítomnosti cysteinu však prekurzor těchto hořkých látek, diacetylformoin, reaguje přednostně právě s ním, a tak cystein blokuje prolinem indukovanou tvorbu těchto hořkých látek³⁸. Jiné produkty prolinu, jako jsou 2,5-dimethyl-4-(1-pyrrolidinyl)furan-3(2*H*)-on nebo 5-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)cyclopent-2-en-1-on (XI a XII, obr. 3), způsobují přetrvávající vjem chladivé a svěží chuti v ústní dutině. Tyto látky byly nalezeny také v pražených sladech³⁹ (Caraffa, Melanoidin). Např. koncentrace 5-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)cyclopent-2-en-1-onu ve sladu Caraffa je asi 100 µg kg⁻¹.

5. Závěr

Při vzniku látek, které se výrazně uplatňují v aroma sladů, se uplatňuje jak Maillardova reakce společně s dalšími reakcemi neenzymového hnědnutí, tak oxidace lipofilních složek sladovaného zrna. K oxidaci lipidů dochází poměrně snadno, neboť v průběhu sladování se významně snižuje aktivita vody zrna. Při vaření piva ale mnoho vonných produktů oxidace lipofilních látek vytěká nebo degraduje. Protože jejich prekurzory do roztoku vesměs nepřecházejí, tak na aroma piva nakonec takový vliv obvykle nemají. Naproti tomu při vaření piva vznikají aromatické látky Maillardovou reakcí v intenzitě srovnatelné s výrobou světlých sladů.

Zatímco tmavé a některé speciální slady obsahují bohatou směs aromatických látek, nejběžnější varné světlé

slady jich obsahují jen málo. V těchto případech je totiž rychlost Maillardovy reakce natolik nízká, že výrazněji probíhají většinou jen přeměny úvodní, „indukční“ části Maillardovy reakce. Vzniká tak určité množství senzoricky neaktivních bezprostředních prekurzorů, které pak při vaření piva poskytují chuťové a vonné látky již relativně snadno. Na chuti piva se podílí nejen chmel, ale také slad, a to nejen na sladké nebo kyselé, ale i na chuti hořké nebo chladivé.

Pro hodnocení látek odpovědných za aroma sladů mají výsledky tradičních metod pouhého stanovení aromatických látek nízkou vypovídací schopnost. Vhodnější je využití olfaktometrických metod založených na zředovací analýze aroma za použití takových extrakčních metod, které vylučují vznik artefaktů, a nezkrslují tak skutečný profil a význam aromatických látek ve sladu.

LITERATURA

1. Dence C.: Food Trade Rev. 58, 26 (1988).
2. Basařová G., Čepička J.: *Sladařství a pivovarství*. SNTL, Praha 1985.
3. Velišek J.: *The Chemistry of Food*. Wiley-Blackwell, New York 2014.
4. Moštek J.: *Sladařství. Biochemie a technologie sladů*. SNTL, Praha 1975.
5. Briggs D. E.: *Malts and Malting*. Blackie Academic and Professional, London 1998.
6. Reineccius G. A., v knize: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology* (Finot P. A. a spol., ed.), str. 157. Birkhauser Verlag, Basel 1990.

7. Stahl H. D., Parliment T. H., v knize: *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes* (Parliment T. H., Morello M. J., McGorin R. J., ed.), str. 251. American Chemical Society, Washington, DC 1994.
8. Barreiro J., Fernandez S., Sandoval A. J.: *Lebensm.-Wiss. Technol.* 36, 37 (2003).
9. MacLeod A. M., Travis D. C., Wreay D. G.: *J. Inst. Brew.* 59, 154 (1953).
10. Hall R. D., Harris G., McWilliam I. G.: *J. Inst. Brew.* 62, 232 (1956).
11. Coghe S., Benoot K., Delvaux F., Vanderhaegen B., Delvaux F. R.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 602 (2004).
12. Samaras T. S., Gordon M. H., Ames J. M.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4938 (2005).
13. Kolbach P.: *Brauerei* 12, 77 (1959).
14. Kotlíková B., Jelinek L., Karabín M., Dostálek P.: *Chem. Listy* 107, 362 (2013).
15. Mikola L., Mikola J.: *Planta* 149, 149 (1980).
16. Lekkas C., Stewart G. G., Hill A. E., Taidi B., Hodgson J.: *J. Inst. Brew.* 113, 3 (2007).
17. Nie C., Wang C., Zhou G., Dou F., Huang M.: *Afr. J. Biotechnol.* 9, 9018 (2010).
18. Woffenden H. M., Ames J. M., Chandra S.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 5524 (2001).
19. Wimmer Z., Opletal L., Čopíková J., Moravcová J., Abdulmanea K. S. O., Lapčík O., Drašar P.: *Chem. Listy* 106, 926 (2012).
20. Wittmann R., Eichner K.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 188, 212 (1989).
21. Damm E., Kringstad H.: *J. Inst. Brew.* 70, 38 (1964).
22. Maarse H., Visser C. A., Willemsens L. G., Nijssen L. M., Boelens M. H.: *Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data: Malt*. 7. vyd. Nutrition and Food Research Institute Zeist 1996.
23. Vandecan S. M. G., Saison D., Schoupe N., Delvaux F., Delvaux F. R.: *Anal. Chim. Acta* 671, 55 (2010).
24. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P.: *Food Chemistry*. 3. vyd. Springer, Berlin 1999.
25. Wnorowski, A., Yaylayan, V. A.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3549 (2000).
26. Velišek J., Cejpek K.: *Biosynthesis of Food Components*. OSSIS, Tábor 2008.
27. Fickert B., Schieberle P.: *Nahrung* 42, 371 (1998).
28. Buhr K., Pammer C., Schieberle P.: *Eur. Food Res. Technol.* 230, 375 (2010).
29. Rychlik M., Schieberle P., Grosch W.: *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants*. Institut für Lebensmittelchemie, TU München 1998.
30. Beal A. D., Mottram D. S.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2880 (1994).
31. Stingl S., Kreissl J., Schieberle P.: *Bericht 2011*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Garching 2011.
32. Coghe S., Gheeraert B., Michiels A., Delvaux F. R.: *J. Inst. Brew.* 112(2), 148 (2006).
33. Berg H. E., van Boekel M. A. J. S.: *Neth. Milk Dairy J.* 48, 157 (1994).
34. Nursten H.: *The Maillard Reaction. Chemistry, Biochemistry and Implications*. RSC, Cambridge 2005.
35. Mackie A. E., Slaughter J. C.: *J. Inst. Brew.* 106, 209 (2000).
36. Roberts D. D., Acree T. E., v knize: *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes* (Parliment T. H., Morello M. J., McGorin R. J., ed.), str. 71. ACS, Washington, D.C 1994.
37. Scherb J., Kreissl J., Haupt S., Schieberle P.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 9091 (2009).
38. Frank O., Ottinger H., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 231 (2001).
39. Ottinger H., Soldo T., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 5383 (2001).

K. Cejpek (*Department of Food Analysis and Nutrition, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Aroma and Taste Components of Malts**

One of the main objectives of malt production is getting a characteristic aroma. This review presents comprehensive information on individual components of malt flavor, their intensity, the actual portion of the total aromatic expression and the conditions of their formation. The formation of the compounds depends on the type and amount of available precursors and suitable conditions of their transformation into flavoring agents. In kilning barley malts, a wide range of aromatic compounds is formed. The key reactions for the aroma formation are the Maillard reaction, the Strecker degradation of amino acids, and caramelization, depending on the temperature and water content of the grain. Oxidation products of lipids and other lipophilic components of the grain are also important.

KONJUGÁTY PORFYRINŮ

PAVLA TOMANOVÁ a MICHAL JURÁŠEK

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, 166 28 Praha 6
paja.tomanova@seznam.cz, michal.jurasek@gmail.com

Došlo 23.10.13, přijato 22.11.13.

Klíčová slova: porfyrin, malý konjugát, fotodynamická
terapie, fluorescenční značení

Obsah

1. Úvod
2. Porfyriny
 - 2.1. Magnetická rezonance (MRI)
 - 2.2. Fotodynamická terapie (PDT)
 - 2.3. Vliv buněčné lokalizace konjugátu na iniciaci apoptózy
 - 2.4. Konjugáty porfyrinů
 - 2.4.1. Konjugáty porfyrinů se sacharidy
 - 2.4.2. Konjugáty porfyrinů s peptidy
 - 2.4.3. Konjugáty porfyrinů se steroidem
 - 2.4.4. Konjugát porfyrinu s dendrimerem a dimerní konjugáty porfyrinu
 - 2.4.5. Konjugáty porfyrinů s retinoidy
 - 2.4.6. Konjugát porfyrinu s dalším chromoforem
3. Závěr

1. Úvod

Porfyriny jsou přirozeně se vyskytující látky, které mají ve své základní struktuře tetrapyrrolový makrocycklus. Jsou to barevné sloučeniny s absorpčním maximem nejčastěji kolem 405 nm (tzv. Soretův pás) a dalšími intenzivními absorpčními pásy v oblasti 400 až 800 nm (cit.¹). Po konjugaci s biologicky aktivní látkou tak umožňují využití fotochemických vlastností, které jsou vlastní porfyrinovému skeletu, např. k vizualizaci transportu konjugátu a jeho lokalizace uvnitř buňky.

2. Porfyriny

Porfyriny nacházejí velké uplatnění v klinické praxi a to díky skutečnosti, že mají vlastnosti tzv. fotosenzitizerů (PS). Důležitou roli hrají nejen porfyriny samotné, ale i ve

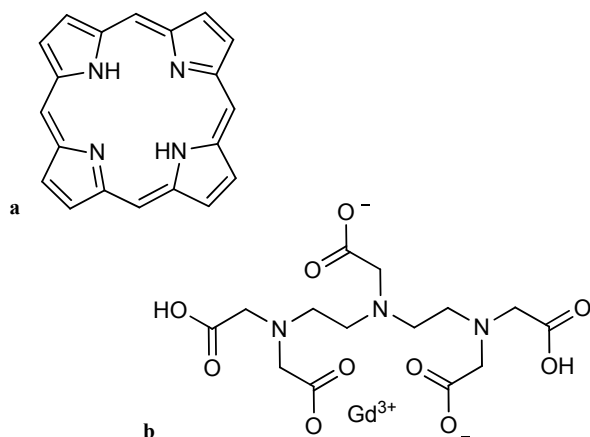
formě konjugátů s polymerními látkami, sacharidy, peptidy a dalšími sloučeninami. Jejich unikátní vlastnosti umožňují široké využití především v oblasti diagnózy a léčby rakoviny. Jsou netoxické a stabilní a mají absorpční maximum pro světlo o vysoké energii (a krátké vlnové délce), které je na rozhraní infračerveného a viditelného spektra. Mají schopnost se selektivně akumulovat v nádorových tkáních^{2,3}, což umožňuje jejich využití při terapii ozařováním i pro cílené směřování léčiva do místa terapeutického působení³.

Existují PS první a druhé generace. První skupina zahrnuje deriváty hematoporfyrinu. Tyto látky nejsou přesně definované a jejich aplikace vyvolává citlivost kůže na sluneční záření. V současné době jsou komerčně dostupné pod různými firemními názvy, např. Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo). Výhodou druhé generace PS je, že nezpůsobují kožní fotosenzitivitu. Jsou to plně definované chemické sloučeniny, mezi které patří především barviva porfyrinového typu, např. ftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny, benzochloriny a purpuriny⁴.

Užívá se několik metod ozařování, v této práci se budeme zabývat dvěma nejvíce diskutovanými – fotodynamickou terapií (PDT – angl. PhotoDynamic Therapy) a magnetickou rezonancí (MRI – angl. Magnetic Resonance Imaging). PDT je metoda sloužící k léčbě zhoubných nádorů citlivých na záření. MRI je metodou diagnostickou, která umožňuje pomocí aktivace fotosenzitizerů zobrazit umístění nádoru v tkáni. V tomto případě mají PS funkci kontrastních látek a jako takové se využívají porfyrinové komplexy manganu (Mn) a gadolinia (Gd) díky své schopnosti efektivně relaxovat vodíky ve vodě⁵.

2.1. Magnetická rezonance (MRI)

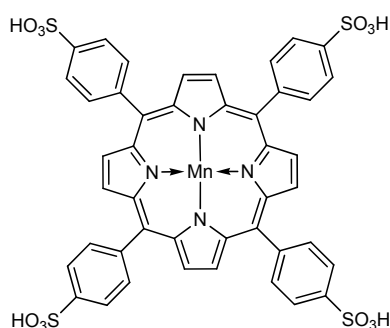
Magnetická rezonance je jednou z nejpobulárnějších diagnostických technik používaných v medicíně, která umožňuje zobrazování vybraných částí těla bez jakéhokoli narušení⁶. Její hlavní nevýhodou jsou vysoké provozní a pořizovací náklady a určité nebezpečí hrozí u pacientů s kardiostimulátory a kovovými materiály v těle. Velmi výhodné je vysoké rozlišení a nepřítomnost ionizujícího záření (na rozdíl od vyšetření CT). Využívá rozdílných intenzit signálů mezi různými měkkými tkáněmi a tím poskytuje morfologické a fyziologické informace o sledovaném objektu⁶. MRI funguje na stejném principu jako nukleární magnetická rezonance (NMR)⁷. Ve chvíli, kdy impuls radiového záření přestane působit a atomy vodíku se začnou vracet do původního stavu, přičemž postupně vyzařují energii, kterou při ozaření absorbovaly, nastává relaxační fáze a právě při ní probíhá měření. Kontrastní látky interagují s vodíky v roztoku a tím zkracují relaxační dobu⁷. Ideální kontrastní látka by měla splňovat několik



Obr. 1. Struktury kontrastních látek (a) porfyrinu; (b) Gd-DTPA

požadavků – urychlovat relaxaci vodíků v tkáni, mít nízkou toxicitu a vysokou specifitu vůči poškozeným tkáním, nebýt z organismu ihned vyloučena (problém u malých molekul), zajistit kontrast i při malých dávkách⁸. Dříve byl nejvíce používanou a komerčně dostupnou kontrastní látkou gadolinium-diethylenetriamin-pentaacetát (Gd-DTPA), který ovšem není selektivní vůči rakovinným tkáním, na rozdíl od porfyrinových chelátorů⁹.

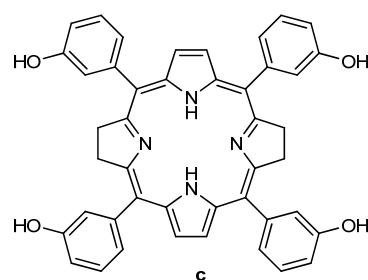
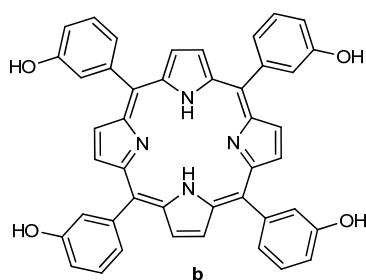
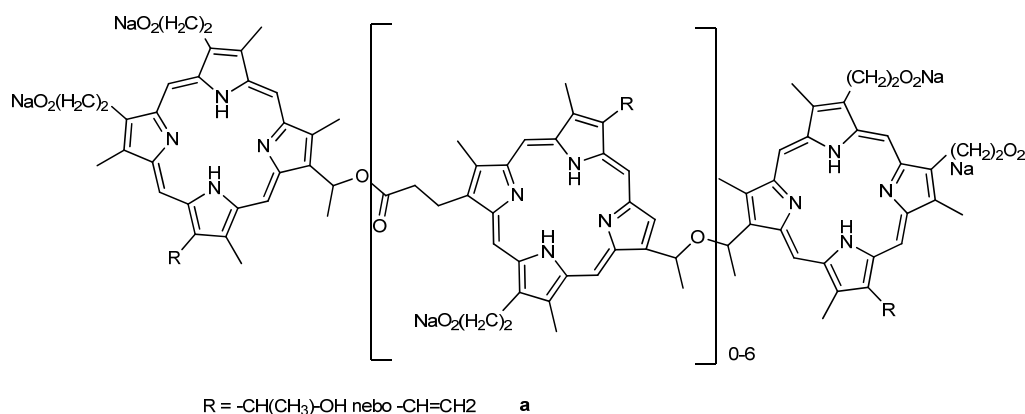
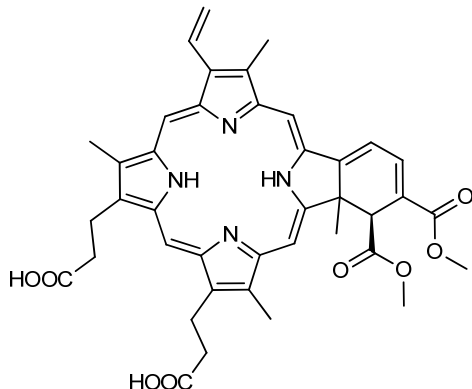
Navíc byl u této látky problém s rychlým vyloučením z organismu vzhledem k její malé molekulové hmotnosti. Nevýhodou Gd-DTPA a podobné kontrastní látky tetraazacyklododekantanetraoctové kyseliny (DOTA) je i jejich polarita a v důsledku malá prostupnost přes buněčnou membránu. Proto se často tyto látky inkorporují do lysosomů nebo uhlíkových nanotrubic¹⁰. Porphyrinové komplexy nemají vzhledem k jejich hydrofobicitě s přechodem přes buněčnou membránu problém. Dnes jsou nejvíce využívány komplexy Gd a Mn. Významnou nevýhodou Gd je jeho toxicita a fakt, že Gd^{3+} může vést k nefrogenní systémové fibróze⁶, dalším problémem je velikost iontu. Gadolinium se nevejde do porfyrinového makrocyklu a po vstupu do organismu se rozpadá a tím ztrácí svou účinnost¹¹. Přesto se kontrastní látky s tímto kovem stále vyvíjejí. Příkladem

Obr. 2. Mn(III)-*meso*-tetrakis(*p*-sulfofenyl)porfyrin

toho je konjugát Gd-DTPA s polyaspartamidem, který se používá jako polymerní nosič léčiv, a porfyrinem, který je přednostně přijímán nádorovými buňkami. Příčina lokalizace porfyrinů v nádorech není známa. Uvažuje se, že možným důvodem je jejich příjem endocytózou za účasti LDL-receptorů, které se vyskytují na povrchu rakovinných buněk více než jinde⁸. Výhodou Mn je jeho přirozený výskyt v těle. Navíc vytváří s porfyriny stabilní komplexy¹¹. Příkladem takového porfyrinového komplexu je Mn(III)-*meso*-tetrakis(*p*-sulfofenyl)porfyrin (obr. 2)¹⁰.

2.2. Fotodynamická terapie (PDT)

Výhody fotodynamické terapie jsou především její selektivita vůči rakovinným buňkám (závisí na použitém PS)¹², nulová toxicita fotosenzitizujících látek a fakt, že se řadí mezi neinvazivní metody. Nevýhodou je omezená použitelnost, protože světlo aktivující PS proniká jen pod povrch tkáně a je tedy možné tuto terapii aplikovat pouze na některé typy rakoviny¹³. Tento problém ale v současné době nachází řešení v použití endoskopické laserové technologie¹⁴. Princip fotodynamické terapie je založen na dopravení fotosenzitivní látky přednostně do rychle se množících rakovinných buněk. V minulosti bylo vyzkoušeno více sloučenin, které by mohly zastávat úlohu PS (kyaninová barviva, tetracykliny, fluorescein, eosin), ale nesplňovaly podmínku selektivní lokalizace¹². Vhodnými fotosenzitivními látkami se ukázaly být porfyriny, které jsou za běžných podmínek neškodné, ale po excitaci paprskem určité vlnové délky produkují velmi toxické molekuly. V případě PDT se jedná o vlnovou délku 650 až 900 nm, při které jsou postižené tkáně nejvíce transparentní. V prvním kroku PS absorbuje záření o vhodné vlnové délce a jeden z elektronů ze základního stavu PS je excitován do energeticky bohatšího orbitálu a vzniká tak první excitovaný stav. Ten není příliš stabilní a trvá velmi krátkou chvíli ($\sim 10^{-9}$ s). Ke ztrátě nově nabitě energie může dojít emisí světla (fluorescencí) nebo přeměnou energie na teplo. Třetím způsobem je tzv. mezisystémový přechod, při kterém dochází ke změně spinu excitovaného elektronu. Pokud je spin excitovaného elektronu opačný k jeho párovému elektronu v základním stavu, jedná se o singletový excitovaný stav. V případě shodnosti spinu obou elektronů z páru jde o tripletový excitovaný stav, který má delší dobu trvání ($\sim 10^{-6}$ s). Když je PS v tripletovém excitovaném stavu, mohou nastat dvě situace. V jednom případě může PS získat nebo darovat elektron jakékoli molekule ve své blízkosti. V druhém přenesení energii na molekulu, která je v základním stavu tripletem a obě molekuly přejdou do singletového stavu. Jednou z mála tripletních molekul v základním stavu je molekula kyslíku hojně se vyskytujícího v každé buňce. Kyslík je přeměněn na reaktivní formu excitovaného singletového kyslíku, která je toxická i pro rakovinnou tkáň¹⁵. Toxické tedy nejsou přímo porfyrinové konjugáty, ale vznikající reaktivní formy kyslíku (singletový kyslík, superoxidový a hydroxylový radikál, peroxid vodíku)¹⁶. V poslední době jsou nejvíce používány PS Photofrin® (směs porfyrinových derivátů)

Obr. 3. Struktury Photofrinu® (a), Foscanu® (b), 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyfenyl) bakteriochlorinu¹⁷ (c)

Obr. 4. Struktura Verteporfinu

a Foscan® (syntetický chlorin), avšak tato oblast je stále předmětem aktivního bádání.

Momentálně jsou například prováděny klinické testy bakteriochlorinů¹⁷, které vykazují zvýšenou absorpci při vlnové délce 650–900 nm. Navíc jsou schopny produkce nejen reaktivního singletového kyslíku, ale i superoxidového radikálu, který se také podílí na spuštění apoptózy rakovinných buněk².

Dalším PS schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je verteporfin (Visudyne®).

Tato látka ve spojení s proteinem zajišťujícím selektivitu konjugátu vykazuje silný účinek proti rakovině prsu *in vivo* i *in vitro*. Očekává se její potenciální účinek i proti dalším tumorům přístupným použitému záření, které mají na svém povrchu receptory interagující s příslušným proteinem¹⁸. Samotný verteporfin je ve fázi klinických testů – zkoumají se jeho účinky proti glaukomu^{19,20}. Ukázalo se, že verteporfin příznivě působí proti cévní neovaskularizaci (CNV) a věkem podmíněné makulární degeneraci (AMD), která se léčí PDT s využitím tohoto PS.

2.3. Vliv buněčné lokalizace konjugátu na iniciaci apoptózy

Existují dva druhy buněčné smrti – apoptóza a nekróza. Pro léčbu rakoviny je preferována apoptóza, což je plánovaná a samotnou buňkou řízená buněčná smrt. Druhým typem je nekróza, smrt způsobená vnitřními autolytickými procesy v důsledku narušení některé ze základních buněčných funkcí. Poměr apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci PS a dávce ozáření. Nižší dávky PS a záření způsobují apoptózu, vyšší nekrózu, ovšem při každé aplikaci dochází k oběma typům smrti buněk. Dále má na typ buněčné smrti vliv preferovaná lokalizace PS uvnitř buňky, např. akumulace PS v mitochondrii nebo endoplazmatickém retikulu (ER) vede primárně k apoptóze²¹.

V případě PDT je nejvhodnější lokalizace v organelách, které hrají zásadní roli při spouštění a regu-

laci buněčné smrti. Takovými organelami jsou jádro, mitochondrie nebo ER. Výhodou kumulace přímo v jádře je přímá destrukce DNA a RNA, která vede jednoznačně k usmrcení celé buňky²². Mitochondrie je jednou z nejžádanějších buněčných organel pro zacílení farmak proti rakovině a to především proto, že má zásadní roli ve vyvolání apoptózy. Změny této organely vedoucí k apoptóze jsou způsobeny ztrátou elektrochemického gradientu na mitochondriální membráně z důvodu otevření transportních pórů a uvolnění určitých proteinů do cytosolu (např. cytochrom c, apoptózu indukující faktor, kaspázy)²³. Pouze několik málo studií věnovalo pozornost vlivu zničení ER na inaktivaci rakovinných buněk. Tato organela je v buňce umístěna v blízkém okolí jádra, hraje významnou roli v biosyntéze a transportu bílkovin a lipidů a podílí se na vylučování vápníku²⁴. Pokud je tato schopnost ER narušena, je vyvolána apoptóza buňky.

Lokalizace PS v buňce je jedním z nejdůležitějších faktorů určující biologickou účinnost. Je to místo, kde dochází k prvotnímu poškození buňky a udává mechanismus buněčné smrti²².

2.4. Konjugáty porfyrinů

Obecně se porfyriny konjugují s jinými organickými sloučeninami za účelem zlepšení jejich přechodu přes buněčnou membránu, který je často komplikovaný až nemožný vzhledem k jejich fyzikálně chemickým vlastnostem. Dalším důvodem bývá přeměna hydrofobní molekuly na více polární nebo amfifilní²⁴. Účinek takového konjugátu může být zesílen biologickou aktivitou připojené neporfyrinové části²⁵. V neposlední řadě má připojená část porfyrinového konjugátu vliv na selektivitu lokalizace v buňce po dodání do organismu.

2.4.1. Konjugáty porfyrinů se sacharidy

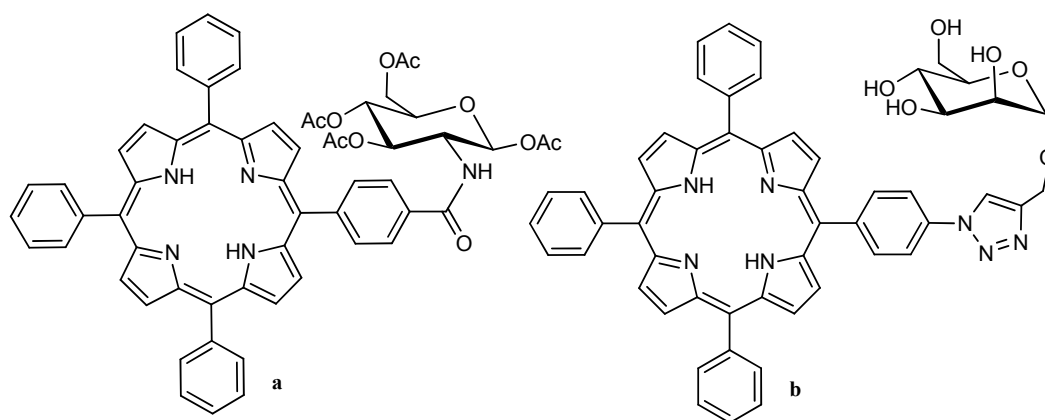
Glykosylace porfyrinů je jednou z mnoha metod, snažících se o zacílení PS do rakovinných buněk. Je způsobem, jak změnit molekulu hydrofobního porfyrinu na amfifilní sloučeninu, která je schopná projít buněčnou mem-

bránou²⁴. Je známo, že na povrchu rakovinných buněk se nachází velké množství lektinů, proteinů, které umí s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat cukry²⁶. S ohledem na interakce mezi sacharidy a lektiny a významnou roli sacharidů v buněčném rozpoznávání se předpokládá, že konjugáty porfyrinů s těmito biomolekulami budou vynikat v cíleném směřování látky do rakovinných tkání v porovnání s jinými PS (cit.²⁷).

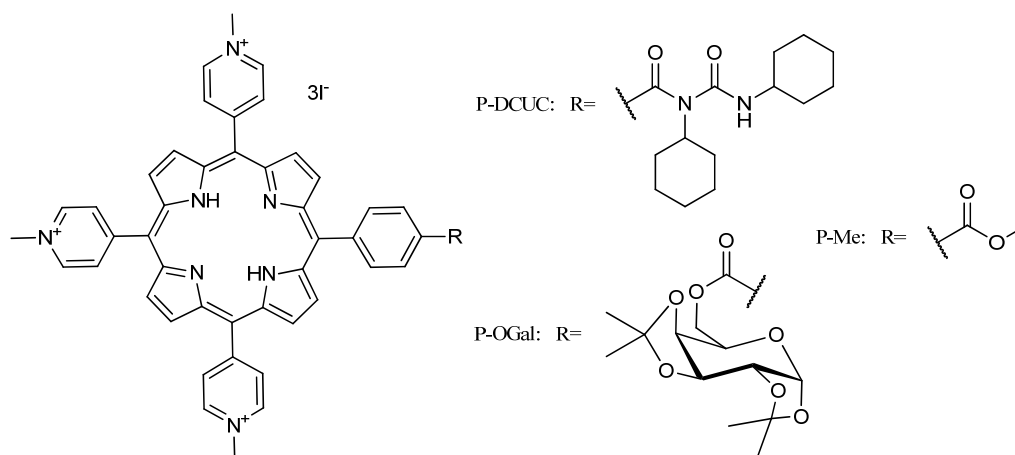
Studie uvádějí, že na lokalizaci glykosylovaného porfyrinu má vliv symetrie celé molekuly a dále počet a povaha navázaných cukerných jednotek. Konjugáty mající cukerné jednotky vázané přímo na porfyrinový kruh (obr. 5) se často kumulují v membráně liposomů, která může být složena z nasycených²⁸ i nenasycených²⁹ mastných kyselin. Různé konjugáty se kumulují v rozdílné hloubce membrány, což závisí v případě nenasycených kyselin na pozici navázaného porfyrinu (vzdálenosti od dvojné vazby v nenasycené kyselině) a symetrii²⁹. Symetrický konjugát se lokalizuje blíže k povrchu membrány, kdežto asymetrický substituovaný se nachází hlouběji.

U liposomálních membrán z nasycených kyselin má vliv celkový náboj. Obecně lze říci, že záporně nabitě liposomy usnadňují interakci se symetrickými konjugáty, oproti tomu nesymetrické konjugáty jsou schopné vazby i na nenabité liposomy, což je důsledkem jejich vyšší lipofility²⁸. V jiné studii se přímo vázané konjugáty kumulují v lysosomech nebo endoplazmatickém retikulu²⁴.

Vědecká skupina Silva a spol. připravila sérii konjugátů porfyrinu, které byly mezi sebou porovnávány z hlediska buněčného příjmu a fotocytotoxicity. Byl zvolen kladně nabitý porfyrin, u kterého se předpokládal snadný přechod do buňky a následně do organel preferovaných pro PDT. Mezi nejúčinnější konjugáty (obr. 6) patřil porfyrin s di-*O*-isopropyliden-(D-galaktopyranosou) (P-OGal) a srovnatelné účinky měl methylester (P-Me) a *N,N'*-di-cyklohexylureidooxykarbonylový derivát (P-DCUC) příslušného porfyrinu. Tyto konjugáty byly buňkami NCTC 2544 (rakovinné buňky kůže) snadno přijímány a docházelo u nich k lokalizaci uvnitř endo- a pinocytotických váčků, což vypovídá i o mechanismu jejich příjmu³⁰.



Obr. 5. Konjugát porfyrinu s acetylovanou 2-amido-2-deoxy- β -D-glukopyranosou (a) a α -D-mannopyranosou (b)

Obr. 6. Série konjugátů porfyriu³⁰

Glykosylované porfyrinové konjugáty jsou v porovnání s jednoduše substituovanými porfyrinovými jádry při PDT často účinnější a v důsledku velkého množství glukosových transportérů, které se v rakoviných buňkách vyskytují více než ve zdravých, se vyznačují i zvýšeným buněčným příjmem³¹.

Konjugát porfyriu s dextranem byl připraven za účelem použití v MRI. Výsledky ukázaly, že syntetizovaná sloučenina disponovala dlouhou relaxační dobou a zvýšenou afinitou vůči rakovinným buňkám. Konjugace s dextranem umožnila lokalizaci v buněčné membráně, kde tato cukerná část interagovala s glykolipidy¹¹.

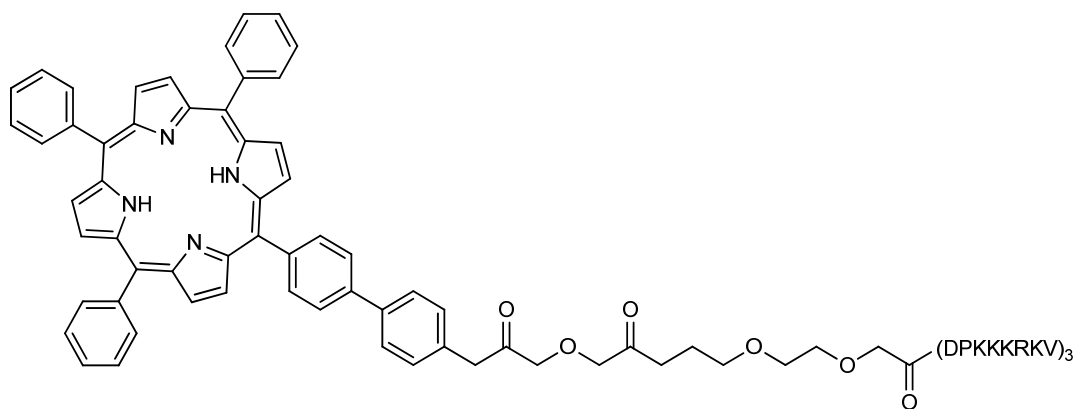
Glykosylované konjugáty porfyriu, a to především nesymetrické, jsou nejen vhodnými fotosenzitizéry pro PDT, ale našly využití i jako kontrastní látky v MRI a byla potvrzena jejich zvýšená afinita ve prospěch rakovinných buněk.

2.4.2. Konjugáty porfyriu s peptidy

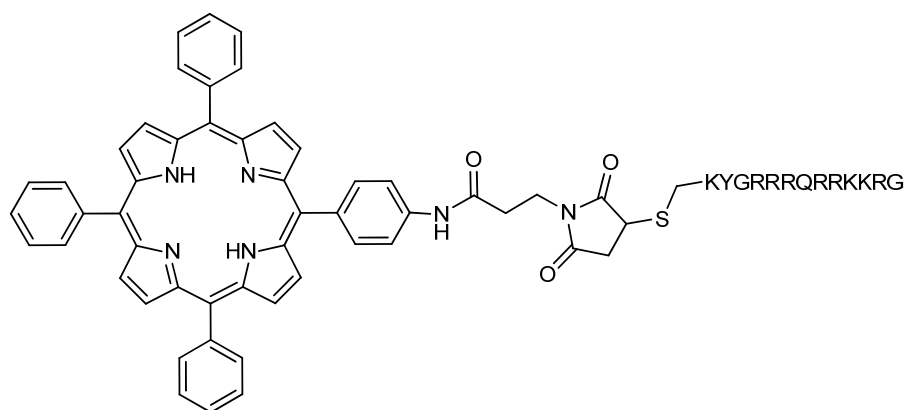
Pro zvýšení vstřebání léčiv do buňky se stalo atraktivním použití peptidových signálních sekvencí, a to pře-

devším pro jednoduchost syntézy peptidu a modifikace jeho struktury. Biologicky účinnější konjugáty porfyriu pro PDT jsou takové, které se po podání lokalizují v organelách pro buňku nejdůležitějších, např. jádře, mitochondriích nebo ER. Ozáření konjugátů PS v preferovaných organelách vede k nevratnému poškození rakovinné tkáně²³. Kumulace ve prospěch těchto buněčných organel může být ovlivněna zvolenou sekvencí peptidu. Existují tzv. jaderné lokalizační sekvence (NLS, angl. Nuclear Localization Sequence)³² nebo mitochondriální lokalizační sekvence (MLS, angl. Mitochondria Localization Sequence)²³. Podle publikovaných studií však ani toto opatření pro kumulaci v požadované organelě často nestačí a konjugát PS je dopraven místo do cílené organely do lysosomů³². Příkladem konjugátu obsahujícího jadernou lokalizační sekvenci je sloučenina na obr. 7, u které byla navzdory mimojaderné lokalizaci pozorována silná fototoxicita.

Peptidový řetězec v molekule konjugátu může být navázán na porfyrin přímo, nebo přes spojovací molekulu polyethylenglykolu (PEG). Tato konjugace nejen zvyšuje



Obr. 7. Konjugát porfyriu s peptidovou sekvencí spojený přes PEG



Obr. 8. Konjugát porfyriu s CPP

rozpuštěnost celého konjugátu ve vodě, ale také snižuje možnost agregace a dalších nežádoucích interakcí mezi makrocylem porfyriu a připojenou peptidovou sekvencí²³. Agregaci a nevazebným interakcím mezi porfyriem a delšími peptidovými řetězci můžeme zabránit i využitím lipidového nosiče, který má schopnost dopravit peptidové konjugáty do mitochondrií²².

U velkého množství farmak se setkáváme s nedostatečnou biologickou dostupností v důsledku jejich neschopnosti procházet buněčnými membránami nebo nízké rozpustnosti ve vodě. Tento problém lze řešit pomocí konjugace léčiv s peptidy zajišťujícími přestup přes buněčnou membránu (CPP, angl. Cell Penetrating Peptides). Tyto konjugáty (obr. 8) jsou cíleny do vnitrobuněčných váček³³.

Biologická aktivita a dostupnost porfyrin-peptidových konjugátů závisí na sekvenci aminokyselin v peptidovém řetězci, substituentech navázaných v periferních oblastech porfyrinového cyklu, celkovém náboji a amfifilitě konjugovaného systému³⁴.

Konjugáty obsahující v peptidu jednu až čtyři kladně nabitě aminokyseliny mají tendenci se akumulovat

v lysosomech a disponují nízkou fototoxicitou²², kdežto peptidy bohaté na arginin nacházíme převážně v endoplazmatickém retikulu. Velmi účinným konjugátem při PDT je také např. porfyrin-guanidin, vzhledem k jeho preferované lokalizaci v mitochondriích a ER²³.

PS se symetricky rozmístěnými NLS vykazují sníženou fototoxicitu a jsou do buněk přijímány v menší míře a to pravděpodobně v důsledku snížené amfifility a hydrofóbnosti³².

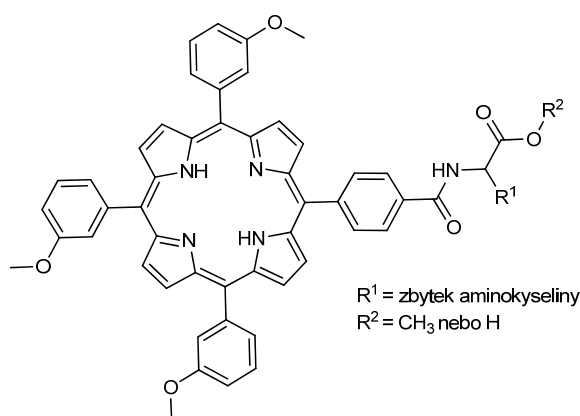
Stejně tak při porovnání samotného porfyriu s konjugovaným lze pozorovat vyšší příjem a fototoxicitu konjugátu a to v důsledku výše zmíněných důvodů. Přestože je zvolený porfyrin nabitý pro snadnější přestup přes buněčnou membránu a lepší rozpustnost ve fyziologickém prostředí, lokalizoval se jen v cytoplasmě. Oproti tomu poly-S-lysinový konjugát byl zacílen do lysosomů³⁵.

Jiná studie³⁶ byla zaměřena na přípravu konjugátů porfyriu pouze s aminokyselinami (obr. 9). Tyto nové konjugáty se lokalizují v lysosomech a plazmatické membráně. Jsou schopny produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, angl. Reactive Oxygen Species), což je základním požadavkem všech PS.

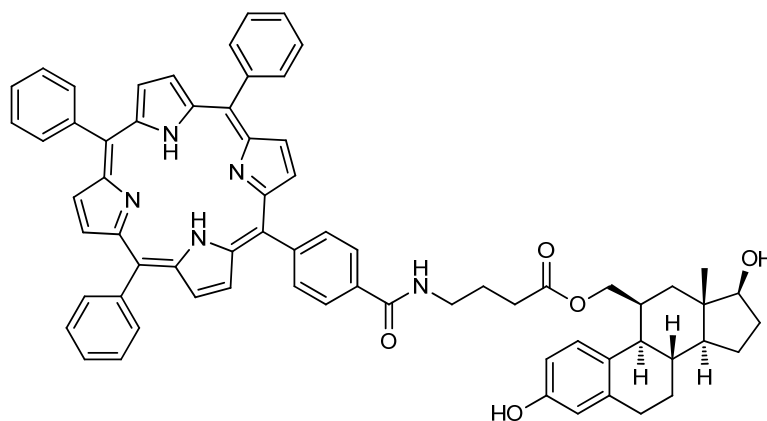
Lze předpovědět, že vhodnou volbou peptidového řetězce a nosiče se podaří syntetizovat konjugát schopný přechodu buněčné membrány a lokalizace ve specifické organelle³⁴. Velkou výhodou těchto konjugátů je především jejich snadná příprava a selektivní lokalizace v nádorových buňkách³⁶.

2.4.3. Konjugát porfyriu se steroidem

V současné době se vědci často zabývají specifickými postupy léčení nádorů a roste snaha o přípravu speciálních cytotoxinů, které by po podání zacílily a usmrtily přímo rakovinnou buňku. Problémem je nedostatek receptorů v poškozených buňkách, které by byly výhradně rozpoznány zmíněnými toxiny. Vědcům z USA se podařilo navrhnout a syntetizovat konjugát porfyriu s cytotoxinem a hormonem estradiolem³ (obr. 10). Vzhledem ke skutečnosti, že tento hormon je výlučně produkován v prsou



Obr. 9. Konjugát porfyriu s aminokyselinou



Obr. 10. Konjugát porfyriu s 17-β-estradiolem

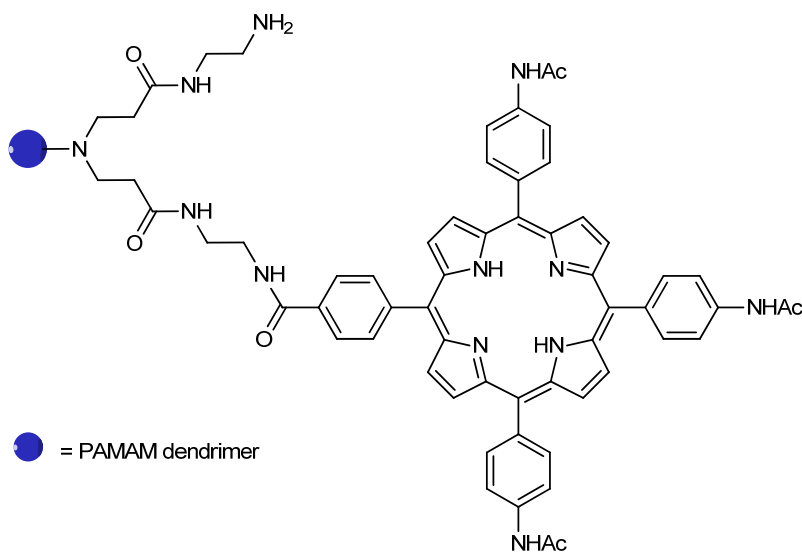
a vaječnicích, obsahují tyto orgány zvýšené množství estrogenních receptorů a předpokládá se, že jsou schopny vychytat z krevního řečiště léčivou látku, pokud je konjugována s tímto hormonem. Na základě této hypotézy byla navržena potenciálně atraktivní metoda pro léčbu rakoviny prsu, vaječníků a dělohy. Testování hypotézy bylo provedeno na prsní tkáni. Tento konjugát se akumuloval v buněčném jádře a byl úspěšně selektivně dopraven do tkáně produkující hormon estradiol.

V rámci jiné studie byl připraven konjugát $C_{17\alpha}$ -alkynylestradiolu s porfyriem pyrofeoforbidem. Tento konjugát se také úspěšně lokalizoval především v rakovinné tkáni a snímky z fluorescenčního mikroskopu potvrdily jeho lokalizaci uvnitř buňky. V porovnání se samotným porfyriem vykazoval konjugát vyšší fototoxicitu³⁷.

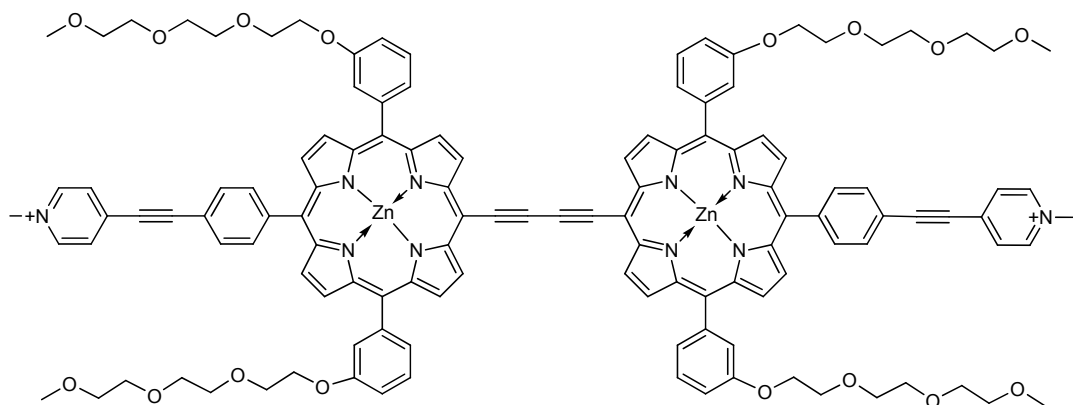
2.4.4. Konjugát porfyriu s dendrimerem a dimerní konjugáty porfyriu

Genová terapie je slibnou strategií pro léčbu a prevenci genetických poruch a nemocí. Vhodnými vektory, tedy přenašeči genetické informace do buňky, jsou např. viry a plazmidy. S ohledem na určité bezpečnostní pochybnosti u oslabených jedinců v souvislosti s možností sekundárních projevů infekčnosti viru se vědci snaží vyvinout nevirální nosiče (např. na bázi polymerů). Mezi takové vektory patří polyamidoamin dendrimer (PAMAM), který byl v tomto případě konjugován s hydrofobním porfyriem. Vzniklý konjugát (obr. 11) se lokalizoval v buněčných lysosomech a endosomech a po ozáření byl schopen transfekce genu a vykazoval vlastnosti potenciálního biomateriálu pro genovou terapii^{38,39}.

V rámci přípravy nových dimerních konjugátů porfyriu byla zkoumána jejich fotocytotoxicita, selektivní lokalizace v nádorových tkáních, intracelulární lokalizace



Obr. 11. Konjugát porfyriu s PAMAM dendrimerem



Obr. 12. Příklad dimerního konjugátu porfyriu

a potřebná dávka záření. Přestože se tyto konjugáty neložují v organelech preferovaných pro PDT, jsou celkem účinnými PS. Produkce ROS je srovnatelná s produkcí PS již klinicky schválených (např. Visudyne®)⁴⁰. Porphyrinové dimery byly schopny přechodu přes buněčnou membránu a byly zacíleny do cytoplazmy⁴⁰, nebo buněčných liposomů⁴¹.

2.4.5. Konjugáty porfyriu s retinoidy

Dále byla zkoumána fototoxicita a buněčná lokalizace u konjugátů porfyriu s retinoly (obr. 13) obsahující *all-trans* nebo *13-cis*-retinoid. Deriváty vitaminu A jsou vázány na tetrafenylporfyrin přímo do *para* polohy fenylů, nebo přes spojovací jednotku PEG. S ohledem na přítomnost receptorů pro kyselinu retinovou v jádře by se dala předpokládat akumulace retinoidních konjugátů právě v této organelle. Všechny konjugáty se ale přednostně lokalizují v buněčných vezikulech a lysosomech, malé množství konjugátů obsahujících PEG se nachází i v ER. Tyto PS se pravděpodobně nekumulují v jádře kvůli makrocycly porfyriu, který s ohledem na svou velikost není schopen projít jadernou membránou.

K nejvyššímu příjmu buňkou dochází v případě konjugátu porfyriu s *13-cis*-retinovou kyselinou připojenou k PS pomocí PEG, ale fototoxicita je vyšší u konjugátů,

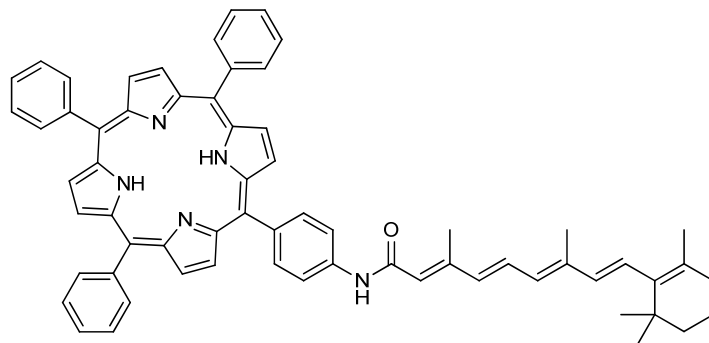
kteří jsou na porfyrinový cyklus navázány přímo. To, že jsou tyto konjugáty toxičtější navzdory nižšímu příjmu buňkou a kumulaci v méně preferovaných částech buňky naznačuje, že se jedná o nový a jiný mechanismus indukce buněčné smrti. Tento mechanismus však není doposud znám⁴².

2.4.6. Konjugát porfyriu s dalším chromoforem

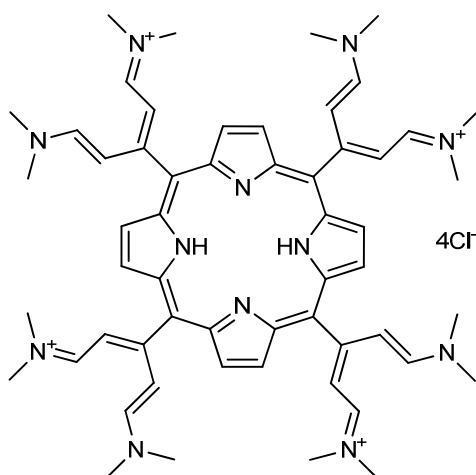
Dalším přístupem v syntéze nových konjugátů porfyriu jako PS je spojení dvou chromoforů – porfyriu s pentamethinem. Vznik více konjugovaného systému umožňuje nižší dávkování PS do organismu a připojená nabitá část usnadňuje přestup přes buněčnou membránu. Předběžné testy *in vivo* na buňkách HL-60 ukázaly selektivní lokalizaci v nádorové tkáni a po ozáření došlo k regresi tumoru. Konkrétní lokalizace uvnitř buňky nebyla v publikaci zmíněna⁴³.

3. Závěr

Syntéza nových konjugátů porfyriu je efektivní metodou pro přípravu účinných PS pro diagnostické (MRI) i terapeutické (PDT) ozařovací metody. Konjugací již dříve používaných porfyriu se zlepšují jejich vlastnosti a tím se



Obr. 13. Konjugát porfyriu s retinoidem



Obr. 14. Konjugát porfyrinu s pentamethinem

zvyšuje jejich účinnost. U PDT je důležitá intracelulární lokalizace a to přednostně v organelách, jejichž poškození způsobené ozářením vede k indukci apoptózy. U MRI je důležité, aby byl PS schopen přestupu přes buněčnou membránu. V současné době je výzkum zaměřen na cílení těchto konjugátů výhradně do rakovinné tkáně a dále na vývoj látek působících proti druhu rakoviny, kterou nelze léčit běžnými cytostatiky.

LITERATURA

- Khan T. K., Bröring M., Mathur S., Ravikanth M.: *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2348 (2013).
- Silva E. F. F., Serpa C., Dabrowski J. M., Monteiro C. J. P., Formosinho S. J., Stochel G., Urbanska K., Simoes S., Pereira M. M., Arnaut L. G.: *Chem. – Eur. J.* **16**, 9273 (2010).
- Swamy N., James D. A., Mohr S. C., Hanson R. N., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3237 (2002).
- Pavelková A.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010.
- Matthews S. E., Pouton C. W., Threadgill M. D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1809.
- Winter M. B., Klemm P. J., Phillips-Piro C. M., Raymond K. N., Marletta M. A.: *Inorg. Chem.* **52**, 2277 (2013).
- Matsumoto Y., Jasanoff A.: *FEBS Lett.* **587**, 1021 (2013).
- Yan G.-P., Li Z., Xu W., Zhou C.-K., Yang L., Zhang Q., Li L., Liu F., Han L., Ge Y.-X., Guo J.-F.: *Int. J. Pharm.* **407**, 119 (2011).
- Shahbazi-Gahrouei D.: *J. Res. Med. Sci.* **11**, 217 (2006).
- Lee T., Zhang X.-A., Dhar S., Faas H., Lippard S. J., Jasanoff A.: *Chem. Biol.* **17**, 665 (2010).
- Zhang Z., He R., Yan K., Guo Q.-N., Lu Y.-G., Wang X.-X., Lei H., Li Z.-Y.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6675 (2009).
- Tita S. P. S., Perussi J. R.: *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1331 (2001).
- Tuncel S., Trivella A., Atilla D., Bennis K., Savoie H., Albrieux F., Delort L., Billard H., Dubois V., Ahsen V., Caldefie-Chezet F., Richard C., Boyle R. W., Ducki S., Dumoulin F.: *Mol. Pharmaceutics* **10**, 3706 (2013).
- Mukai H., Wada Y., Watanabe Y.: *Ann. Nucl. Med.* **27**, 625 (2013).
- Mroz P., Bhaumik J., Dogutan D. K., Aly Z., Kamal Z., Khalid L., Kee H. L., Bocian D. F., Holten D., Lindsey J. S., Hamblin M. R.: *Cancer Lett.* **282**, 63 (2009).
- Drabkova M., Marsalek B., Admiraal W.: *Environ. Toxicol.* **22**, 112 (2007).
- van Duijnhoven F., Rovers J., Engelmann K., Krajina Z., Purkiss S., Zoetmulder F. N., Vogl T., Terpstra O.: *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 808 (2005).
- Hu Z., Rao B., Chen S., Duanmu J.: *BMC Cancer* **10**, 235 (2010).
- Scott L. J., Goa K. L.: *Drugs Aging* **16**, 139 (2000).
- Fenton C., Perry C. M.: *Drugs Aging* **23**, 421 (2006).
- Kralova J., Dvorak M., Koc M., Kral V.: *Oncogene* **27**, 3010 (2008).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Fronczek F. R., Hammer R. P., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* **16**, 852 (2005).
- Sibrian-Vazquez M., Nesterova I. V., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* **19**, 705 (2008).
- Di Stasio B., Frochot C., Dumas D.: *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1111 (2005).
- Kumar D., Mishra B. A., Chandra S. K. P., Kumar A., Akamatsu K., Kusaka E., Ito T.: *Chem. Commun.* **49**, 683 (2013).
- Daly R., Vaz G., Davies A. M., Senge M. O., Scanlan E. M.: *Chem. – Eur. J.* **18**, 14671 (2012).
- Vedachalam S., Choi B.-H., Pasunooti K. K., Ching K. M., Lee K., Yoon H. S., Liu X.-W.: *MedChemComm* **2**, 390 (2011).
- Voszka I., Galántai R., Maillard P., Csík G.: *J. Photochem. Photobiol., B* **52**, 92 (1999).
- Voszka I., Budai M., Szabó Z., Maillard P., Csík G., Gróf P.: *Chem. Phys. Lipids* **145**, 63 (2007).
- Silva J. N., Galmiche A., Tomé J. P. C., Boullier A., Neves M. G. P. M. S., Silva E. M. P., Capiod J.-C., Cavaleiro J. A. S., Santos R., Mazière J.-C., Filipe P., Morlière P.: *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1373 (2010).
- Csík G., Balog E., Voszka I., Tölgyesi F., Oulmi D., Maillard P., Momenteau M.: *J. Photochem. Photobiol., B* **44**, 216 (1998).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1160 (2010).
- Wang J. T. W., Giuntini F., Eggleston I. M., Bown S. G., MacRobert A. J.: *J. Controlled Release* **157**, 305 (2012).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *J.*

- Med. Chem. 51, 2915 (2008).
35. Nuno S. J., Haigle J., Tome J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tome A. C., Maziere J.-C., Maziere C., Santus R., Cavaleiro J. A. S., Filipe P., Morliere P.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 126 (2006).
 36. Serra V. V., Zamarrón A., Faustino M. A. F., Cruz M. C. I.-D. L., Blázquez A., Rodrigues J. M. M., Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., Juarraz A., Sanz-Rodríguez F.: *Bioorg. Med. Chem.* 18, 6170 (2010).
 37. Sadler S., Persons K. S., Jones G. B., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4638 (2011).
 38. Shieh M.-J., Peng C.-L., Lou P.-J., Chiu C.-H., Tsai T.-Y., Hsu C.-Y., Yeh C.-Y., Lai P.-S.: *J. Controlled Release* 129, 200 (2008).
 39. Peng C. L., Lai P. S., Chiu C. H., Chang C. C., Lai T. Y., Shieh M. J.: *Sborník abstraktů přednášek, díl 2, Nano Science and Technology Institute*, 384, Nano Science and Technology Institute Cambridge, Boston 2006.
 40. Dahlstedt E., Collins H. A., Balaz M., Kuimova M. K., Khurana M., Wilson B. C., Phillips D., Anderson H. L.: *Org. Biomol. Chem.* 7, 897 (2009).
 41. Khurana M., Ulrich S., Kim A., Moriyama Y., Netchev G., Akens M. K., Anderson H. L., Wilson B. C.: *Photochem. Photobiol.* 88, 1531 (2012).
 42. Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* 18, 1185 (2007).
 43. Bříza T., Králová J., Cígler P., Kejík Z., Poučková P., Vašek P., Moserová I., Martásek P., Král V.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 82 (2012).

P. Tomanová and M. Jurášek (*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Porphyrin Conjugates**

Due to their photophysical and pharmacokinetic properties, porphyrin conjugates are used as photosensitisers in clinical practice, especially in photodynamic therapy (PDT) and magnetic resonance imaging (MRI). The use of porphyrins alone is limited because of their hydrophobicity, low cellular uptake and low selectivity. To suppress the disadvantages their conjugates with various natural products (saccharides, proteins, polymers or steroids) were tested. Porphyrin conjugates can be visualised after cellular uptake by fluorescence microscopy. Determination of their precise localization in the cell is crucial for further biological scenario control. This review summarizes the obtained results.

PŘÍRODNÍ LÁTKY SVÍRAVÉ A TRPKÉ CHUTI

JANA ČOPÍKOVÁ^a, ZDENĚK WIMMER^{b,c},
OLDŘICH LAPČÍK^c, LUCIE CAHLÍKOVÁ^d,
LUBOMÍR OPLETAL^d, JITKA MORAVCOVÁ^c
a PAVEL DRAŠAR^c

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav experimentální botaniky AV ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^c Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^d Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Došlo 15.7.14, přijato 30.9.14.

Klíčová slova: přírodní látka, trpké, svíravé, doplněk stravy, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Adstringentní komponenty vína
3. Třísloviny, fenolické a polyfenolické látky
4. Ostatní látky trpce svíravé chuti
5. Látky souvisejících vlastností
6. Závěr

1. Úvod

Článek si klade za cíl posloužit jako učební pomůcka v jazyce českém, tak jako několik předchozích statí v tomto časopise^{1–10}.

Trpká/svíravá chuť nepatří mezi základních pět podobě uznávaných chuťových principů (sladký, slaný, kyselý, hořký a umami)¹¹ možná proto, že tuto vlastnost někteří autoři zařazují ne mezi chutě ale mezi pocity¹². O chutích se v současnosti hodně bádá a tak např. se soudí, že může existovat i chuť „vápníková“¹³, zřejmě se na tomto polu dovíme ještě mnoho zajímavého. Pokud se týče trpké a svíravé chuti, jde o potravinářskou kategorii, pokud se týče pocitu a účinku na tkáň a kůži, je taková vlastnost využitelná například v kožním lékařství a kosmetice.

Nicméně staří Indové trpkou chuť řadili mezi šest chuťových principů Ajurvědy (pocházejících ze starověké Indické medicíny): sladký, slaný, kyselý, hořký, ostrý (pungent) a svíravý/trpký (astringent). Svíravé trpké chuťový vjem je velmi obtížně popsatelný. Podle Ajurvědy jsou trpce svíravé potraviny suché, hrubé a chladné. Pomá-

hají odstraňovat z organismu vodu a způsobují pocit „suchého“ jazyka¹⁴. Na straně druhé pomáhají zastavit průjmy a krvácení a omezují pocení tím, že mj. způsobují stažení cév a srážení krve neb se řada z nich váže na bílkoviny. Mohou též působit protidráždivé, protizánětlivé a urychlují hojení; bývají sedativní a působí zklidnění a lehce znecitlivují. Mezi typickými příklady trpce svíravých potravin a látek jsou například čaj, víno, trnky, šalvěj, třezalka, nezralé banány, betel, churma, brusinky, granátová jablka, myrha, vodilka, kurkuma, okra, muškát, petržel, šafrán a kamenec. Častou příčinou svíravé trpké chuti jsou třísloviny (taniny), patřící mezi „polyfenoly“. Trpce svíravá chuť má své nezastupitelné místo v chuťových vjemech vín z celého světa.

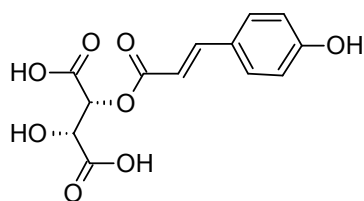
Navzdory tomu, že trpkost je předmětem každodenní smyslové zkušenosti, povaha jejího vnímání není jasná. Někteří autoři předpokládají^{15,16}, že trpkost vyvolává u člověka dráždění trojklaného nervu, a adstringentní látka může u myši aktivovat receptor spážený s G proteinem v gangliových buňkách trojklaného nervu.

Přehledů na toto téma je několik, většinou však diskutují pouze třísloviny. Základní informaci poskytne i Mercův Index¹⁷. Některé práce se zabývají i fyziologií^{18–20}, jiné použitím v kosmetice²¹. Většinou se však přehledové práce systematicky chemickému složení a popisu vlastností jednotlivých komponent nevěnují.

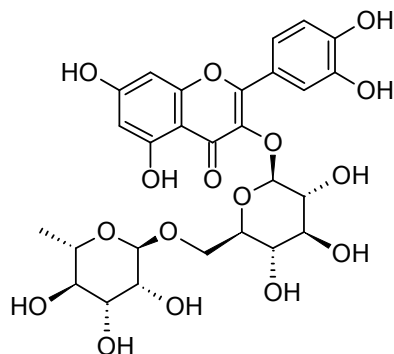
2. Adstringentní komponenty vína

Podívejme se nejprve na nápoj, který lidstvo kultivuje po tisíce let, víno. Odborníci budou hodnotit jeho sametově trpkou, suchou a svíravou chuť, různé stupně hořkosti, a to zvláště ve víně z červených hroznů. Byla izolována řada netěkavých složek ovlivňujících chuť vína, mezi jinými série hydroxybenzoových kyselin, hydroxykyselin, flavon-3-olové glykosidy, dihydroflavon-3-olové rhamnosidy a strukturně nedefinovaná polymerní frakce (>5 kDa), jako typičtí zástupci sloučenin s trpce svíravou chutí. Různé skupiny tříslovin jsou popisovány jako důležité přispěvovatele k hořké a svíravé chuti vína²². Na rozdíl od série ethylesterů kyselin hydroxybenzoových a hydroxykyselin²³, flavan-3-oly nebyly shledány zásadními přispěvovateli k adstringentní a hořké chuti; je zajímavé, že po prvotním pocitu trpkosti u vína se zpravidla objevuje následná nasládllost, navozená přítomností monomerních katechinů, která přispívá ke „kulatosti“ tohoto dobrého moku. Recentně se adstringentními komponentami vína zabývalo několik přehledů^{24,25}.

Nízkomolekulární polyfenoly se obecně považují za látky odpovědné za pocit plnosti v ústech, kde mezi adstringentními látkami lze vidět koutarovou kyselinu a kvercetin-3-O-rutinosid (rutin, rutosid, soforin).



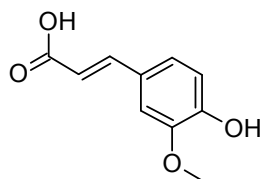
koutarová kyselina



rutin

Vinaři dokonce trpce svíravou (puckery) chuť kvantifikují v rámci hrubosti od „sametu“ (velvet) po „smírek“ (emery)²⁶; uvádí se i jazyk „vysušující“ pocit. Tyto vjemy se připisují opět většinou obsahu polyfenolů, aniž dále látky specifikují. Zdá se však, že tento chuťový vjem je závislý i na kyselosti vína (zejména obsahu a poměru kyseliny jablečné a vinné), obsahu anthocyanů (dříve anthokyaninů) ale i ethanolu. Svíravá chuť je naopak hodnocena u jiných výrobků jako závažný defekt^{27,28}.

V japonských vínech sake a mirin byla jako zdroj nepříjemné svíravě hořké „egumi“ chuti kyselina ferulová²⁹.

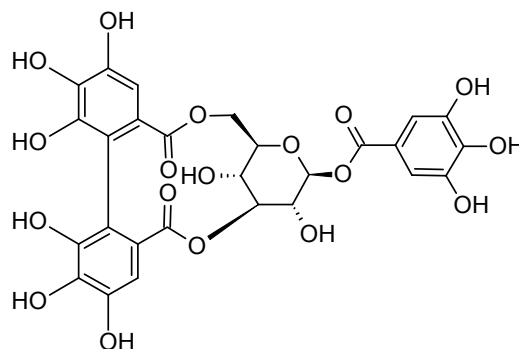


kyselina ferulová

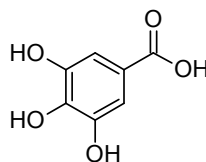
3. Třísloviny, fenolické a polyfenolické látky

Kyselina tříslová (tříslovina, tanin, tannic acid, gallo-tannin, gallotannic acid, nesprávně pak též digallic acid) je komečně využívanou surovinou a jako taková obvykle obsahuje kolem 10 % vody. Vyskytuje se v kůře a ovoci celé řady rostlin, najmě pak v kůře různých dubů (*Quercus* sp., Fagaceae), ve škampě (*Rhus* sp., Anacardiaceae) a myrobalanu (*Prunus cerasifera*, Rosaceae). Vyrábí se z duběnek, tj. dubových hálek, obvykle původem z Turec-

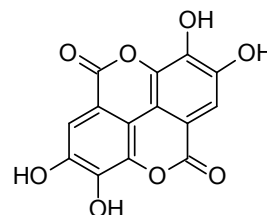
ka nebo Číny; duběnky obsahují až 70 % třísloviny. Chemicky je tanin heterogenní a komplexní směs. Obvykle se dělí na dvě skupiny: (a) deriváty flavanolů, tzv. kondenzované třísloviny a (b) hydrolyzovatelné třísloviny (významnější skupina), které jsou estery sacharidů, obvykle glukosy, s jednou nebo více molekul kyseliny trihydroxybenzenkarboxylové (gallové) či jejím dimerem, kyseliny ellagové. Struktura, kterou uvádíme, je tanin zvaný korilagin³⁰ (C₂₇H₂₂O₁₈). Pro tříslovinu se obvykle udává sumární vzorec C₇₆H₅₂O₄₆ (cit.³¹).



korilagin



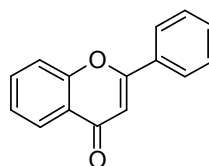
kyselina gallová



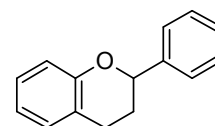
kyselina ellagová

Kaki tannin je komplexní sloučenina skládající se z epikatechinu, katechin-gallátu, gallo-katechinu a gallo-katechin-gallátu kondenzovaných přes C-4, C-6 anebo C-8 do polymeru. Kaki-tannin je odpovědný za svíravou chuť plodů tomelu japonského (persimon, *Diospiros kaki*, Ebenaceae).

Strukturním základem „polyfenolických“ látek je flavon či flavanol (hydroxyderivát flavanu). Může však jít i o jiné nenasycené, oxidované cykly. V této skupině patrně bude mnoho adstringentních látek, ale literatura je na přesnější údaje o jejich chuti skoupá.

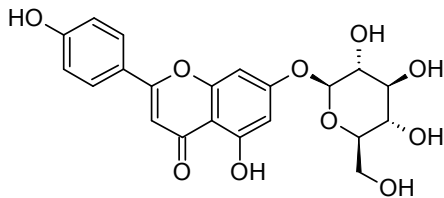


flavon (flavanon)

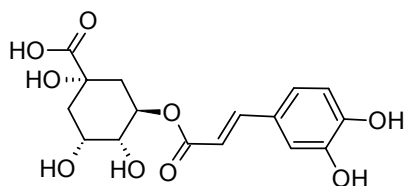


flavan

Trpký apigetrin je izolován z květenství *Anthemis nobilis* L., (Asteraceae)³² a petržele (*Petroselinum crispum*, Apiaceae)³³. Adstringentní chlorogenová kyselina se nachází v pražené kávě.

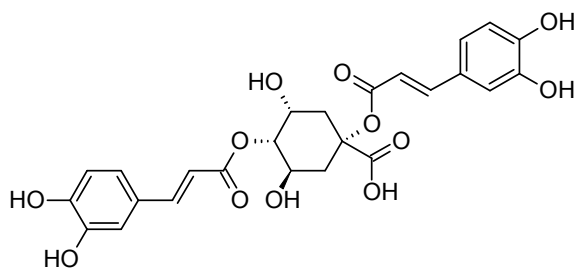


apigetrin

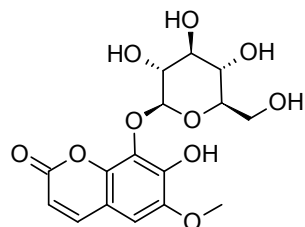


chlorogenová kyselina

Dikaffeylchinová kyselina (cynarin) se nachází v pražené kávě a listech artyčoku (*Cynara scolymus* L., Asteraceae). Tato adstringentní látka dokonce snižuje hodnoty LDL a cholesterolu v séru a játrech u myši premedikovaných ethanolem³⁴. Fraxin (fraxoside, paviin) je izolován z kůry evropského jasanu (*Fraxinus excelsior*, Oleaceae)³⁵, jírovce (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae) a zanice (*Diervilla* sp., Caprifoliaceae).

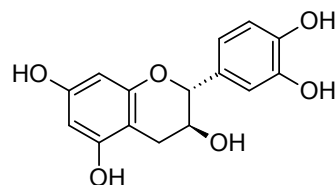


cynarin



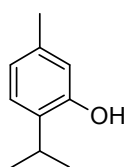
fraxin

D-(+)-Katechin (katechinová kyselina, biokatechin, cianidol, gallokatechin) je jedna z trpkých komponent jedné ze složek betelu semen arekové palmy (*Areca catechu*, Arecaceae).

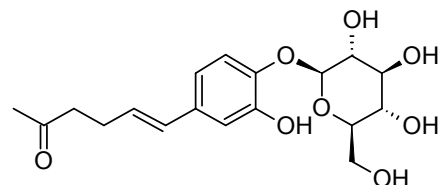


katechin

Aromatická komponenta mateřídoušky, oregana (dobromysli), čubriky a dalších koření, thymol, je pro své svíravé účinky dokonce používána ve výrobě přípravků pro dentální hygienu³⁶.

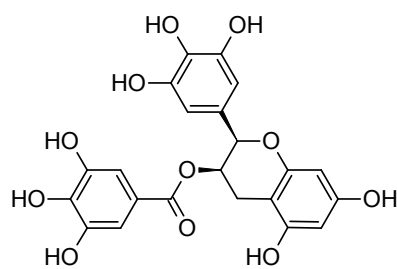


thymol



dihydromyricetin

Dihydromyricetin a jeho nenasycený analog myricetin, s další dvojnou vazbou vedle karbonylu (konfigurace *E*), původem z červeného rybízu (*Ribes rubrum*, Grossulariaceae) se používají jako adstringentní přísady do potravin³⁷.

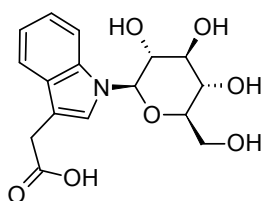


(-)-epigallokatechin-gallát

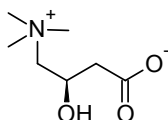
(-)-Epigallokatechin-gallát byl shledán jako hlavní adstringentně-hořká komponenta zeleného, černého i oolong čaje^{38–40}.

4. Ostatní látky trpce svíravé chuti a svíravých vlastností

Jako adstringentní je popisován polohydrát síranu vápenatého⁴¹. 3-(Karbomethyl)-1-(β-D-glukopyranosyl)-1*H*-indol a jeho deriváty byly shledány na základě senso-metabolické analýzy jako sloučeniny, m.j. spoluzodpovědné za adstringentní vlastnosti plodů rybízu červeného (*Ribes rubrum*, Grossulariaceae)⁴². L-(-)-Karnitin je používán pro své adstringentní vlastnosti v kosmetice.

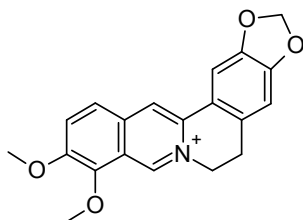


3-(karboxymethyl)-1-(β-D-glukopyranosyl)-1H-indol



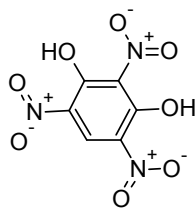
L-(-)-karnitin

Adstringentní berberin je obsažen v řadě zdrojů, ať je to vodilka (*Hydrastis canadensis*, Hydrastidaceae) nebo v různých druzích dřeví (Berberis sp., Berberidaceae).



berberin

Styfnová kyselina (styphnic acid) je sice fenolem, ale značně podivným. Byla izolována z extraktu dřeva sapanu (pernambuco, *Caesalpinia echinata*, Fabaceae) a štítosemenky kebračo (*Aspidosperma quebracho*, Apocynaceae) působením kyseliny dusičné a jde tudíž o izolační artefakt⁴³. Nicméně se tato látka vyrábí průmyslově a používá při výrobě výbušnin, jak lze tušit ze strukturního vzorce.

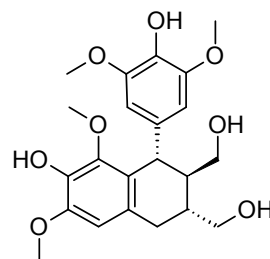


styfnová kyselina

5. Látky souvisejících vlastností

Zajímavé je, že trpce svíravá chuť potravin a nápojů například whisky, způsobená extrakty (taniny) z dubového dřeva může být potlačena přidávkou (+)-lyoniresinolu, který způsobí, že chuť je poté vnímána jako uhlazená. (+)-

Lyoniresinol je obsažen v opáleném dřevě španělského dubu (*Quercus texana*, Fagaceae).



(+) -lyoniresinol

6. Závěr

Přehled přírodních látek trpké a svíravé chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiversity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, například 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 a grantu NAZV č. QI111A166.

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).
- Cejpek K.: Chem. Listy 108, 426 (2014).
- Čopíková J., Moravcová J., Wimmer Z., Opletal L., Lapčík O., Drašar P.: Chem. Listy 107, 867 (2013).
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Voldřich M.: Chem. Listy 106, 903 (2012).
- Jelínek L., Karabin M., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Chem. Listy 107, 209 (2013).
- Krejzová E., Bělohav Z.: Chem. Listy 108, 17 (2014).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
- Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: Chem. Listy 101, 1002 (2007).
- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy, 101, 895 (2007).
- Chandrashekar J. Hoon M. A., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: Nature 444, 288 (2006).
- Noble A. C.: Chemistry of Wine Flavor, ACS Symposium Series 714, 156 (1998).
- Tordoff M. G.: Physiol. Rev. 81, 1567 (2001).
- Guest S., Essick G., Young M., Phillips N., McGlone F.: Physiol. Behavior 93, 889 (2008).
- Jiang Y., Gong N. H. N. Matsunami H.: Chem. Senses 39, 467 (2014).

16. Schobel N., Radtke D., Kyereme J., Wollmann N., Cichy A., Obst K., Kallweit K., Kletke O., Minovi A., Dazert S., Wetzel C. H., Vogt-Eisele A., Gisselmann G., Ley J. P., Bartoshuk L. M., Spehr J., Hofmann T., Hatt H.: *Chem. Senses* 39, 471 (2014).
17. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
18. Schiffman S. S., Suggs M. S., Simon S. A.: *Brain Res.* 595, 1 (1992).
19. Rossetti D., Yakubov G. E., Stokes J. R., Williamson A.-M., Fuller G. G.: *Food Hydrocolloids* 22, 1068 (2008).
20. Dorr W.: *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 531 (2003).
21. Johnson W.: *Int. J. Toxicol.* 24, 75 (2005).
22. McRae J. M., Schulkin A., Kassara S., Holt H. E., Smith P. A.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 719 (2013).
23. Hufnagel J. C., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 1376 (2008).
24. Ferrer-Gallego R., Hernández-Hierro J. M., Rivas-Gonzalo J. C., Escribano-Bailón M. T.: *Food Res. Int.* 62, 1100 (2014).
25. Challacombe C. A., Abdel-Aal E. S. M., Seetharaman K., Duizer L. M.: *J. Cereal Sci.* 56, 181 (2012).
26. Gawel R., Francis L., Waters E. J.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 2683 (2007).
27. Lemieux L., Simard R. E.: *Lait* 74, 217 (1994).
28. Lehtinen P., Laakso S.: *Agric. Food Sci.* 13, 88 (2004).
29. Hashizume K., Ito T., Shimohashi M., Ishizuka T., Okuda M.: *Food Sci. Technol. Res.* 19, 705 (2013).
30. Schmidt O. T., Lademann R.: *J. Liebigs Ann. Chem.* 571, 232 (1951).
31. Schmidt O. T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 74, 48 (1962).
32. Power F. B., Browning H.: *J. Chem. Soc., Trans.* 105, 1833 (1914).
33. Nordström, Swain, *Chem. & Ind. (London)* 1953, 85; *J. Chem. Soc.* 1953, 2764.
34. Wojcicki J.: *Drug Alcohol Depend.* 3, 143 (1978).
35. Salm-Horstmar O.: *Pogg. Ann.* 100, 607 (1857).
36. Lee S. P., Buber M. T., Yang Q., Cerne R., Cortes R. Y., Sprous D. G., Bryant R. W.: *Brit. J. Pharmacol.* 153, 1739 (2008).
37. Schwarz B., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 1394 (2007).
38. Yu P. G., Yeo A. S. L., Low M. Y., Zhou W. B.: *Food Chem.* 155, 9 (2014).
39. Hayashi N., Ujihara T., Chen R. G., Irie K., Ikezaki H.: *Food Res. Int.* 53, 816 (2013).
40. Ujihara T., Hayashi N., Ikezaki H.: *Food Sci. Technol. Res.* 19, 1099 (2013).
41. Sedmalis U., Sperberga I., Sedmale G.: *Latvijas Kimijas Zurnals* 2007, 222.
42. Hofmann T.: Abstracts of Papers, 236th ACS Natl Meeting, Philadelphia, PA, US, August 17–21, AGFD-275 (2008).
43. Einbeck H., Jablonski L.: *Ber.* 54, 1084 (1921).

J. Čopíková^a, Z. Wimmer^{b,c}, O. Lapčík^c, L. Opletal^d, J. Moravcová^c, and P. Drašar^c
^{(^aDepartment of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^bInstitute of Experimental Botany AS CR, Isotope Laboratory, Prague, ^cDepartment of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague, ^dDepartment of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové): **Naturally Occurring Astringent Compounds**}

A brief survey of the naturally occurring astringent compounds aims to show the importance of this group of renewable materials to contribute to the knowledge of the biodiversity of secondary metabolites that can be utilized among others, in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of this group of mostly secondary metabolites are illustrated. The article is also aimed as teaching tool for teachers and students.

ZMENY CELULÓZY PRI VODNEJ HYDROLÝZE DREVA VŘBY BIELEJ (*Salix alba* L.)

VIERA KUČEROVÁ a EVA VÝBOHOVÁ

Katedra chémie a chemických technológií, Drevárska fakulta, Technická univerzita vo Zvolene, T.G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovenská republika
kuceroav@tuzvo.sk, vybohova@tuzvo.sk

Došlo 7.3.14, prijaté 5.6.14.

Kľúčové slová: celulóza, vrba, hydrolýza, kryštalinita, FTIR, priemerný polymerizačný stupeň (PPS), polydisperzita (PD), GPC

Úvod

Dendromasa, či už vo forme dreva rýchloraštúcich drevín alebo vo forme odpadovej biomasy z lesníctva a drevospracujúceho priemyslu (konáre a pne, odrezky, piliny a pod.), je perspektívnym zdrojom surovín lignocelulózového charakteru. Môže mať uplatnenie nielen pre energetické účely, ale aj pre výrobu chemikálií. Drevo predstavuje zložitý komplex heterogénnych makromolekulových látok s bunkovou štruktúrou. Hlavnými zložkami dreva sú celulóza, hemicelulózy a lignín a sprievodnými zložkami sú extraktívne látky (sacharidy, glykozidy, tuky, vosky, živice, farbivá a anorganické látky).

Jedným zo spôsobov využitia biomasy je výroba alkoholových palív. V procese výroby etanolu sa biomasa najskôr hydrolyzuje na zmes hexózových a pentózových sacharidov a následne sa tieto fermentujú mikroorganizmami na etanol. V podmienkach kyslej hydrolýzy dochádza súčasne popri konverzii polysacharidov na monoméne sacharidy aj k ich degradácii, čo je nežiaduce. Z tohto dôvodu sa ako výhodnejšia javí enzymatická hydrolýza. Lignifikovaná bunková stena ani kryštalická oblasť makromolekuly celulózy však nie sú dostatočne prístupné pre enzýmy, preto je potrebné biomasu pred samotnou enzymatickou hydrolýzou predupraviť. Cieľom predúpravy je čiastočná delignifikácia suroviny, odstránenie hemicelulóz a dekryštalizácia celulózy zložky. Jednou z možných metód zvýšenia akcesibility celulózy lignocelulózových materiálov je ich hydrotermická predúprava (vodná predhydrolýza). Cieľom tohto typu predúpravy je pri energetickej a technologicky prijateľných podmienkach odstrániť ľahko hydrolyzovateľnú časť polysacharidov (škrob a časť hemicelulóz), vodorozpustný lignín a extraktívne látky^{1–4}.

V technologickom procese predúpravy lignocelulózovej biomasy sa najčastejšie využíva teplotný rozsah 150 až 230 °C. Pri týchto teplotách sa reakčné prostredie oboha-

cuje o H_3O^+ ióny, ktoré vznikajú autoprotolýzou vody a disociáciou nascentných slabých organických kyselín (mravčej a octovej), ako aj odštiepovaním funkčných skupín z hemicelulóz^{5,6}. H_3O^+ ióny slúžia ako katalyzátor pri hydrolýze hemicelulóz na rozpustné sacharidy a štiepia celulózu na kratšie reťazce. Depolymerizácia celulózy je energeticky náročnejšia ako rozklad hemicelulóz, preto prebieha pri vyšších teplotách. Je to spôsobené fyzikálno-chemickým charakterom celulózy – lineárnou vysokosporiadanou štruktúrou polymérnych reťazcov, vysokým polymerizačným stupňom a vysokým podielom kryštalickej celulózy⁷.

Na sledovanie zmien štruktúry makromolekúl drevných polymérov sa s výhodou využíva gélová permeačná chromatografia (GPC)^{8–10} a infračervená spektroskopia (FTIR)^{11,12}. V prípade GPC celulózy možno aplikovať derivatizáciu na trikarbaniláty celulózy (CTC), ktorej prednosťou je, že proces úplnej trisubstitúcie prebieha v jednom reakčnom kroku a bez degračného účinku na celulózu. Pomocou tejto metódy možno určiť priemerný polymerizačný stupeň celulózy (PPS), distribúciu mólových hmotností (MWD) a priemery viacerých mólových hmotností (mólová hmotnosť číselná M_n , mólová hmotnosť hmotnostná M_w , mólová hmotnosť z-tová M_z , mólová hmotnosť priemerná M_{z+1} , mólová hmotnosť viskozitná M_v). FTIR analýzou izolovanej celulózy možno sledovať zmeny jej kryštalinity.

V práci sme sledovali zmeny štruktúry celulózy po vodnej hydrolýze dreva vrby bielej (*Salix alba* L.) metódou gélovej permeačnej chromatografie a FTIR spektroskopie.

Experimentálna časť

Na experimenty bolo použité drevo 15ročnej vrby bielej pochádzajúcej z okolia mesta Zvolen.

Vzorky boli spracované na hranoly (2×2×10 mm) v smere vlákien a podrobené vodnej hydrolýze vo vysokotlakovom reaktore PARR 4561 s použitím hydromodulu 1:4 (w/v). Hydrolýza prebiehala pri teplote 180 °C a časoch 30, 60, 120 a 240 minút. Na naše experimentálne práce sme použili tuhé zvyšky po hydrolýze (vzorky s označením 30, 60, 120, 240) a drevo neupravené hydrolýzou (vzorka s označením 0). Experimenty boli uskutočnené pri každej teplote a čase várky paralelne.

Chemické analýzy

Po toluén-etanolovej extrakcii¹³ bola vo vzorkách stanovená celulóza podľa Seiferta¹⁴. Vzorky izolovaných celulóz boli analyzované spektroskopickou metódou FTIR, za účelom zistenia zmien štruktúry a indexov kryštalinity celulózy. Za účelom sledovania zmien jej priemerného polymerizačného stupňa (PPS), polydisperzity (PD) a mólových hmotností metódou gélovej permeačnej chromatografie bola derivatizovaná na trikarbanilát celulózy¹⁵.

GPC trikarbanilátov celulózy

Vysušené trikarbaniláty celulózy boli rozpustené v tetrahydrofuráne a následne analyzované metódou gélovej permeačnej chromatografie¹⁶.

Na kalibráciu kolóny boli použité štandardy polystyrénov. Ich mólové hmotnosti boli v rozsahu 500 až 6 035 000 g mol⁻¹. Z retenčných časov polystyrénových štandardov bola zostrojená kalibračná závislosť $\log(M) = f(t_R)$. Údaje z detektora boli vyhodnocované programom HSM-HPLC Software Manager (Hitachi), hodnoty mólových hmotností a PPS boli vypočítané zo štyroch meraní pre každú vzorku, a to po konverzii dát v programe Clarity (DataApex).

FTIR analýza celulózy

Merania boli uskutočnené na prístroji Nicolet iS 10 (Thermo Scientific) technikou ATR-FTIR. Vzorky boli analyzované na kryštáli ZnSe v rozsahu 4000–400 cm⁻¹ pri rozlíšení 4 cm⁻¹, pri každej vzorke bolo vykonaných 64 skenov. Získané spektrálne záznamy boli vyhodnocované spektroskopickým softvérom OMNIC 8. Na vyhodnocovanie sa používali priemerné spektrá, ktoré sa zhotovili zo spektier ôsmich meraní vzoriek.

Výsledky a diskusia

Chemické analýzy dreva

Výsledky chemických analýz poukazujú na zvyšovanie podielu extraktívnych látok a celulózy po hydrotermickej úprave dreva oproti pôvodnej vzorke (tab. I). Výťažok extraktívnych látok sa zvyšuje jednak o produkty termického rozkladu lignínovej makromolekuly, ako aj relatívne v dôsledku odbúrania hemicelulóz. Pri čase 240 minút sme pozorovali výrazné zuhoľnatie dreva, čo spôsobilo pokles extraktívnych látok z dôvodu kondenzačných reakcií, a tým menšej rozpustnosti extraktívnych látok v organických rozpúšťadlách.

Výťažky celulózy môžu vzrastať s časom hydrotermickej úpravy relatívne, alebo môžu byť zapríčinené zmenami

v štruktúre celulózy, pričom dochádza k zuhoľnatiu a zosieťovaniu^{17,18}.

Gélová permeačná chromatografia trikarbanilátov celulózy

Analýza trikarbanilátov celulózy metódou gélovej permeačnej chromatografie poskytuje údaje o číselnej mólovej hmotnosti (M_n), hmotnostnej mólovej hmotnosti (M_w), zetovej mólovej hmotnosti (M_z), priemernej mólovej hmotnosti (M_{z+1}), priemernom polymerizačnom stupni a polydisperzite celulózy. Zmeny týchto charakteristík celulózy sme pozorovali pri vodnej hydrolyze dreva vrbie bielej pri teplote 180 °C.

Z distribučných kriviek trikarbanilátov celulózy izolovanej z pôvodného dreva a z tuhého zvyšku po hydrolyze (obr. 1) vidno, že vplyvom úpravy nastala depolymerizácia celulózy oproti pôvodnej vzorke. K výraznej zmene dochádza už počas prvých 30 minút hydrolyzy. Postupne, so zvyšujúcim sa časom hydrolyzy až po čas 240 minút, degradácia celulózy pokračuje, ale zmeny nie sú také výrazné. Poukazuje na to posun maxim distribučných kriviek k nižším hodnotám log M (obr. 1).

Výsledky mólových hmotností (tab. II) tiež potvrdzujú najväčšie zmeny makromolekulových vlastností celulózy v prvých 30 minútach hydrotermického pôsobenia. Hodnota hmotnostnej mólovej hmotnosti M_w klesla v tomto čase približne 1,7násobne. Pokles mólových hmotností možno odôvodniť depolymerizáciou celulózovej makromolekuly, pričom minimálna hodnota M_w bola zaznamenaná v čase 240 minút.

Celulóza je zmesou makromolekúl s rôznym počtom monomérnych jednotiek o rôznej dĺžke. Priemerný polymerizačný stupeň (PPS) je priemerom polymerizačných stupňov jednotlivých makromolekúl. Kritériom šírky distribúcie je polydisperzita (PD), ktorá sa vypočíta ako pomer mólových hmotností M_w k M_n .

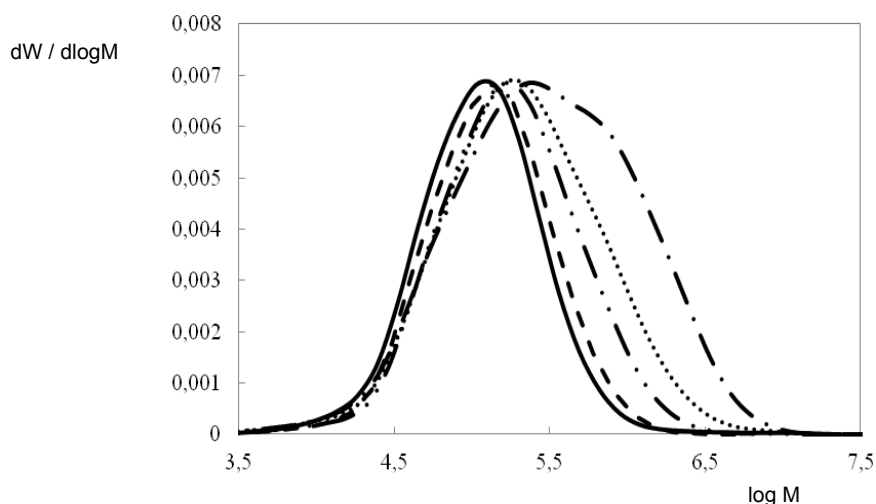
So zvyšujúcim sa časom úpravy sme pozorovali klesajúci trend hodnôt PPS, pričom jeho najnižšiu hodnotu sme vypočítali v čase úpravy 240 minút (tab. III). Podobný klesajúci trend sme zaznamenali aj v prípade polydisperzity. Pokles polydisperzity celulózy môže byť spôsobený

Tabuľka I

Obsah celulózy izolovanej z neupraveného (0) a hydrotermicky upravovaného (30, 60, 120 a 240) vrbového dreva (%)

Čas hydrolyzy [min]	Extraktívne látky ± RSD ^a	Celulóza ± RSD ^a
0	5,27±0,18	37,90±0,12
30	22,20±0,35	52,49±0,68
60	24,00±0,28	61,21±1,34
120	24,04±0,90	65,75±1,08
240	19,86±0,38	80,32±1,88

^a RSD – relatívna smerodajná odchýlka bola vypočítaná z dvoch meraní



Obr. 1. MWD trikarbanilátů celulózy izolované z neupraveného (0) a hydrotermicky upravovaného (30, 60, 120 a 240) vrbového dřeva, 0 —·, 30 ·····, 60 —·, 120 —, 240 —

Tabuľka II

Výsledné hodnoty M_n , M_w , M_z , M_{z+1} , celulózy izolované z neupraveného (0) a hydrotermicky upravovaného (30, 60, 120 a 240) vrbového dřeva

Čas hydrolýzy [min]	$M_n \pm \text{RSD}^a$	$M_w \pm \text{RSD}^a$	$M_z \pm \text{RSD}^a$	$M_{z+1} \pm \text{RSD}^a$
0	33 744 $\pm$ 238	205 133 $\pm$ 318	695 572 $\pm$ 3894	1 623 414 $\pm$ 6836
30	28 626 $\pm$ 415	123 710 $\pm$ 218	443 162 $\pm$ 4571	1 267 767 $\pm$ 6875
60	28 467 $\pm$ 377	91 539 $\pm$ 221	298 312 $\pm$ 4323	1 198 602 $\pm$ 7427
120	25 210 $\pm$ 268	58 805 $\pm$ 340	122 508 $\pm$ 1543	233 964 $\pm$ 1409
240	20 968 $\pm$ 432	50 353 $\pm$ 879	116 905 $\pm$ 2198	293 683 $\pm$ 2337

^a RSD – relativna smerodajná odchýlka bola vypočítaná zo štyroch meraní

depolymerizáciou vysokomolekulových frakcií celulózy, resp. odbúraváním jej amorfných oblastí¹⁹.

FTIR analýza celulózy

Interpretáciou FTIR spektra celulózy možno identifikovať prítomné funkčné skupiny a získať informácie o štruktúre celulózovej makromolekuly. FTIR spektrálny záznam celulózy izolovanej z neupraveného dřeva vrby bielej je na obr. 2. Vlnočty jednotlivých absorpčných pásov sme priradili príslušným funkčným skupinám na základe údajov z literatúry^{12,20–24}.

V oblasti charakteristických skupinových vibrácií od 3700 do 3000 cm^{-1} je v FTIR spektre celulózy vrby bielej dominantný široký absorpčný pás s maximom pri 3336 cm^{-1} . Tento pás sa priradzuje valenčným vibráciám -OH skupín v celulóze, a tiež intra- a inter-

molekulovým vodíkovým väzbám v makromolekule celulózy, ktoré sú vytvárané hydroxylovými skupinami celulózy. Stredne silný absorpčný pás pri 2893 cm^{-1} je prejavom valenčných vibrácií -CH skupín v celulóze. Pri vlnočte 1643 cm^{-1} sa nachádza absorpčný pás, ktorý sa pripisuje adsorbovanej vode.

V oblasti spektra 1500–1300 cm^{-1} sa nachádzajú absorpčné pásy, ktoré sú veľmi dôležité na určenie pomerného zastúpenia kryštalického a amorfného podielu celulózy (index kryštalinity). Pri vlnočte 1428 cm^{-1} sa prejavujú deformačné vibrácie -CH₂ skupín v celulóze, pri 1366 cm^{-1} deformačné vibrácie -CH kryštalickej celulózy, pri 1335 cm^{-1} rovinné deformačné vibrácie -OH v amorfnej celulóze a pri 1315 cm^{-1} vejárové deformačné vibrácie -CH₂ v kryštalickej celulóze.

Charakteristické pásy celulózy zodpovedajúce C-O-C vibračným módom glukózových cyklických foriem

Tabuľka III

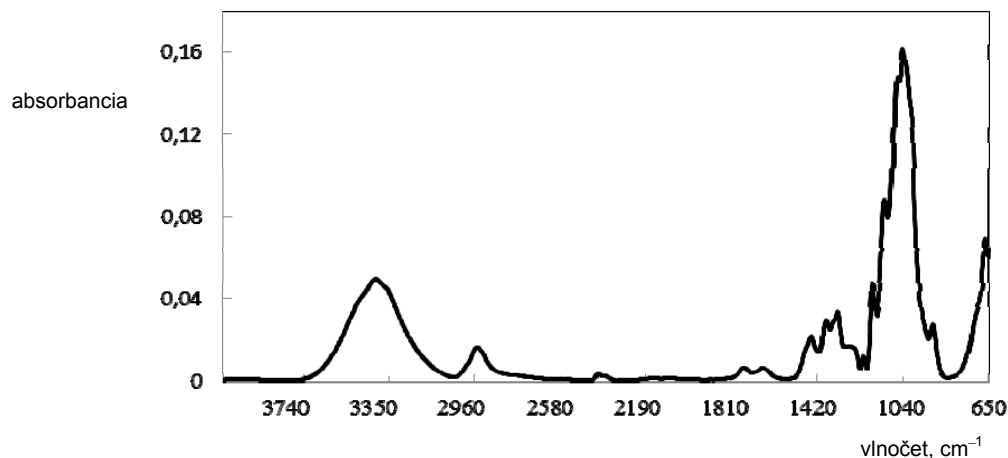
Hodnoty priemerného polymerizačného stupňa a polydisperzity celulózy z neupraveného (0 min) a hydrotermicky upraveného (30, 60, 120 a 240 min) vrbového dreva

Čas hydrolýzy [min]	PPS±RSD ^a	PD±RSD ^a
0	1266±1,96	6,02±0,12
30	764±7,51	4,39±0,03
60	565±1,36	3,23±0,05
120	363±2,10	2,33±0,03
240	311±5,42	2,41±0,04

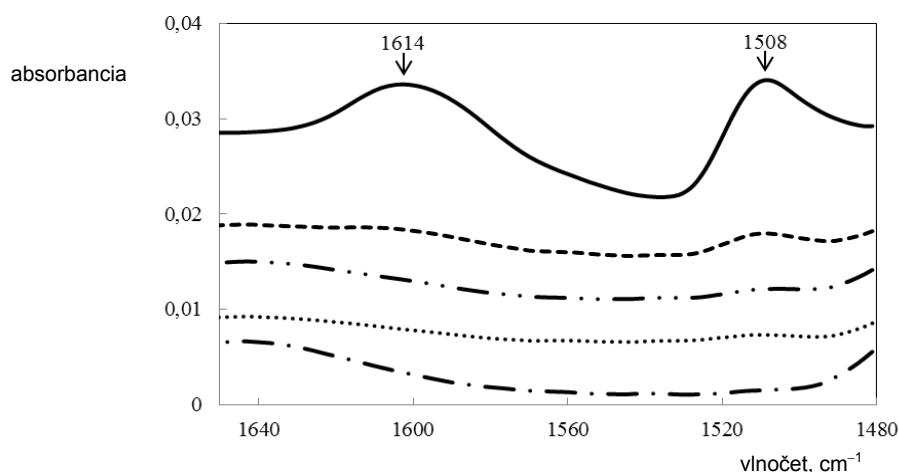
^a RSD – relatívna smerodajná odchýlka bola vypočítaná zo štyroch meraní

a valenčným CO vibráciám, sa nachádzajú pri 1158 cm⁻¹, resp. 1102 cm⁻¹. Najintenzívnejší pás FTIR spektra celulózy izolovanej z vrby bielej, ktorý sa nachádza pri 1026 cm⁻¹, je vyvolaný C-O valenčnými vibráciami. Pri vlnócte 898 cm⁻¹ sa nachádza ďalší pás, ktorý je dôležitý z hľadiska posudzovania kryštalinity celulózy. Zodpovedá asymetrickým mimorovinným vibráciám β-(1,4)-glykozidovej väzby v amorfnom podiele celulózy.

Porovnaním spektrálnych záznamov celulózy pred hydrolýzou a po jednotlivých časoch hydrolýzy (obr. 3) možno pozorovať viaceré zmeny v štruktúre celulózy. Pri vyšších časoch hydrolytického pôsobenia, t.j. nad 120 minút, možno v spektrách celulózy pozorovať pribudnutie absorpčných pásov pri 1614 a 1508 cm⁻¹. Najvýraznejšie sú v spektre celulózy po 240 minútach hydrotermickej úpravy a možno ich priradiť deformačným vibráciám



Obr. 2. FTIR spektrum celulózy izolovanej z neupraveného dreva vrby bielej



Obr. 3. Oblast' 1660–1480 cm⁻¹ FTIR spektier celulózy izolovanej z neupraveného (0) a hydrotermicky upravovaného (30, 60, 120 a 240) dreva vrby bielej, 0 —, 30 ·····, 60 — — —, 120 — · —, 240 — — —

Tabuľka IV

Vyjadrenie indexov kryštalinity celulózy a percentuálnych zmien ich hodnôt medzi neupravenou (0 min) a hydrotermicky upravenými vzorkami vřbového dreva (30, 60, 120 a 240 min)

Čas hydrolýzy [min]	TCI H_{1366}/H_{2900}	Δ TCI [%]	LOI H_{1428}/H_{898}	Δ LOI [%]
0	0,54	0	0,93	0
30	0,56	3,36	1,11	19,47
60	0,55	1,55	1,14	22,11
120	0,61	13,43	1,52	63,44
240	0,61	12,61	2,58	176,96

aromatického skeletu. Predpokladáme, že pri daných podmienkach dochádza k reakciám celulózy s degradačnými produktmi hydrolýzy. Vznik aromatických štruktúr počas vodnej hydrolýzy čistej celulózy pozorovali aj iní autori²⁵. Výskyt absorpčných pásov aromatického skeletu v spektrách celulózy môže byť v menšej miere spôsobený aj prítomnosťou zvyškového lignínu v izolovanej celulóze.

Na vyjadrenie zmien kryštalinity celulózy sme vypočítali hodnoty indexu celkovej kryštalinity TCI (Total Crystallinity Index), ktorý je určený podielom výšok absorpčných pásov H_{1370}/H_{2900} a indexu laterálneho usporiadania LOI (lateral order index), ktorý je vyjadrený podielom výšok absorpčných pásov H_{1428}/H_{898} (tab. IV). Index celkovej kryštalinity TCI zahŕňa prejav celulózy I aj celulózy II a je úmerný stupňu kryštalinity celulózy. Index laterálneho usporiadania LOI sa týka výlučne celulózy I a koreluje s celkovým stupňom usporiadania v celulóze^{21,26}.

V priebehu hydrotermickej úpravy sa prednostne odbúrava amorfný podiel celulózy, čo má za následok relatívne zvýšenie podielu kryštalickej celulózy. Z tohto dôvodu je zistené zvyšovanie hodnôt indexu kryštalinity s narastajúcim časom hydrotermickej úpravy relatívne.

Záver

Z experimentálnych výsledkov sledovania zmien vybraných charakteristík celulózy počas vodnej hydrolýzy dreva vřby bielej pri 180 °C možno vyvodit' nasledovné závery:

- percentuálny podiel celulózy sa s narastajúcim časom hydrolýzy zvyšuje,
- priemerný polymerizačný stupeň a stupeň polydisperzity celulózy sa znižujú vplyvom hydrolýzy, pričom výrazné zmeny nastávajú do 120 minút úpravy,
- hodnoty indexu celkovej kryštalinity (TCI) a indexu laterálneho usporiadania (LOI) sa s narastajúcim časom úpravy zvyšujú, pričom sa pravdepodobne jedná o relatívny nárast kryštalinity spôsobený odbúraním amorfného podielu celulózy.

Z hľadiska akcesibility celulózy k následnej enzymatickej hydrolýze je optimálny čas vodnej hydrolýzy dreva vřby bielej pri teplote 180 °C v rozsahu 60 až 120 minút.

LITERATÚRA

1. Demirbaş A.: *Energy Convers. Manage.* 42, 1357 (2001).
2. Gnansounou E., Dauriat A.: *J. Sci. Ind. Res.* 64, 809 (2005).
3. Kumar P., Barrett, D. M., Delwiche M. J., Stroeve P.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713 (2009).
4. Yang B., Dai Z., Ding S. Y., Wyman C. E.: *Biofuels* 2, 421 (2011).
5. Fengel D., Wegener G.: *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reaction*. Walter de Gruyter, Berlin 1984.
6. Heitz M., Carrasco F., Rubio M., Chauvette G., Chor-net E., Jaulin L.: *Can. J. Chem. Eng.* 64, 647 (1986).
7. Garrote G., Domínguez H., Parajó J. C.: *Holz. Roh-Werkst.* 57, 191 (1999).
8. Hubbell C. A., Ragauskas A. J.: *Bioresour. Technol.* 101, 7410 (2010).
9. Kačík F., Kučerová V., Výbohá V., Kirschnerová S.: *Acta Fac. Xylol. Zvolen* 49, 27 (2007).
10. Kučerová V., Halajová L.: *Acta Fac. Xylol. Zvolen* 51, 87 (2009).
11. Kačík F., Kubovský I.: *J. Photochem. Photobiol., A* 222, 105 (2011).
12. Bodirlau R., Teaca C. A., Resmerita A. M., Spiridon I.: *Cellul. Chem. Technol.* 46, 381 (2012).
13. ASTM D 1107-96: *Standard Test Method for Ethanol-Toulene Solubility of Wood*. (1996).
14. Seifert V. R.: *Papier* 10, 301 (1956).
15. Kačík F., Kačíková D.: *Charakteristika a analýza celulózy a jej derivátov*. TU vo Zvolene, Zvolen 2007.
16. Kačík F., Kačíková D., Jablonský M., Katuščák S.: *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1509 (2009).
17. Esteves B., Domingos I., Pereira H.: *Bioresources* 3, 142 (2008).
18. Inari G. N., Mounguengui S., Dumarcay S., Mathieu P., Gerardin P.: *Polym. Degrad. Stab.* 92, 997 (2007).
19. Foston M., Ragauskas J.: *Biomass Bioenergy* 34, 1885 (2010).
20. Oh S. Y., Yoo D. I., Shin Y., Seo G.: *Carbohydr. Res.* 340, 417 (2005).
21. Colom X., Carrilo F., Nogués F., Carriga P.: *Polym. Degrad. Stab.* 80, 543 (2003).
22. Kataoka Y., Kondo T.: *Macromolecules* 31, 760

- (1998).
23. Pandey K. K., Pitman A. J.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 52, 151 (2003).
 24. Hon D. N., Shiraishi N. (ed.): *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Decker Inc., New York 2000.
 25. Sevilla M., Fuertes A. B: Carbon 47, 2281 (2009).
 26. Yildiz S., Gumuskaya E.: Build. Environ. 42, 62 (2007).

V. Kučerová and E. Výbohová (*Faculty of Wood Sciences and Technology, Department of Chemistry and Chemical Technologies, Zvolen, Slovakia*): **The Changes of Cellulose in Hydrolysis of Willow (*Salix alba* L.) Wood**

Some characteristics of cellulose were studied before and after hydrolysis of willow (*Salix alba* L.) wood by GPC and FTIR spectroscopy. The hydrolysis was performed at 180 °C and different reaction times. The degrees of polymerization of cellulose decreased, molecular distribution changed and total crystallinity of cellulose increased. The increase is probably caused by degradation of amorphous cellulose. Aqueous hydrolysis seems to be a prospective pretreatment before enzymatic hydrolysis.

ELICITINY: KLÍČOVÉ MOLEKULY INTERAKCÍ ROSTLIN A PATOGENŮ

PAVLA MORICOVÁ^a, LENKA LUHOVÁ^a, JAN
LOCHMAN^b, TOMÁŠ KAŠPAROVSKÝ^b
a MAREK PETŘIVÁLSKÝ^a

^a Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^b Ústav bio-
chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity,
Kotlářská 2, 611 37 Brno
marek.petrivalsky@upol.cz

Došlo 17.7.14, přijato 26.9.14.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: elicitory, kryptogin, nekroza,
obránné mechanismy rostliny, steroly

Obsah

1. Úvod
2. Elicitory
3. Elicitiny – proteinové elicitory rostlinných patogenů
4. Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin
5. Signální dráhy v rostlinných buňkách iniciované elicitory
6. Kryptogin
7. Závěr

1. Úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny působení proměnlivého vnějšího prostředí a musí často čelit působení stresových faktorů abiotické i biotické povahy. Působením biotických stresových faktorů, jako jsou infekce viry, bakteriemi a houbami, vedlo v průběhu evolučního procesu u rostlin k vývoji účinného obranného systému, zahrnujícího různorodé specifické i nespecifické obranné mechanismy. Mezi nespecifické reakce patří tvorba a zesílení mechanických bariér, produkce sekundárních metabolitů nebo antimikrobiálních proteinů, které brání průniku patogenu do organismu, popřípadě zabraňují jeho dalšímu šíření¹. Specifická obrana aktivuje mechanismy vedoucí přímo k eliminaci daného patogenu, např. zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku vyvolává tzv. hypersenzitivní reakci (HR), při které rostlina reaguje na infekci patogenu poškozením vlastních buněk v místě průniku patogenu do rostlinných pletiv. HR ve formě kontrolované buněčné smrti v místě infekce zbavuje patogen výživového základu a tím limituje jeho růst a vývoj^{2,3}.

V rámci komplexního imunitního systému rostlin byly identifikovány dvě hlavní složky: imunita aktivovaná tzv. molekulárními vzory asociovanými s patogeny (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) a imunita vyvolaná efekty (ETI, effector-triggered immunity)^{4–6}. Jako PAMPs se označují evolučně staré struktury, které jsou v rámci vrozené imunity rozeznávány transmembránovými rekogničními receptory. Patogeny ovšem vyvinuly schopnost překonat imunitní složky aktivované PAMPs pomocí vnesení svých efektorů virulence dovnitř hostitelských buněk. K obraně rostliny využívají specifické proteiny s vazebnými místy pro polymorfní nukleotidy, které jsou kódovány geny rezistence (*R* geny) a specificky přímo nebo nepřímo rozeznávají většinu patogenních faktorů avirulence (*Avr*)⁴. Tato složka rostlinné imunity aktivovaná efekty je na rozdíl od imunity aktivované PAMPs velmi specifická a je často spojena s HR v místě infekce, kterou lze považovat za jeden z nejdůležitějších znaků pro zabránění růstu biotrofního patogenu⁵.

Ačkoli zmíněné dvě složky imunitního systému rostlin zapojují odlišné receptory, sdílejí aktivaci řady společných obranných mechanismů⁷. Ve fázi časně (vteřiny až minuty) po rozeznání patogenních struktur se jedná např. o změny v koncentracích a tocích iontů a tvorbu reaktivních forem kyslíku, ve fázi střední (minuty až hodiny) o aktivaci proteinkinas, transkripce genů a produkci hormonu ethylenu, a ve fázi pozdní (hodiny až dny) např. akumulaci hormonu kyseliny salicylové (SA) a tvorbu kalosy. Změny v hladinách fytohormonů po napadení rostliny patogenem způsobují další změny v expresi obranných genů a aktivaci obranných reakcí^{6–9}.

Jedním z mechanismů, kterým rostliny reagují na útok patogenu, je systémová získaná rezistence (SAR). Vede k odolnosti rostliny a chrání ji proti širokému spektru patogenů. SA je dlouhodobě známa jako klíčová látka pro aktivaci SAR a důležitou součástí signálních mechanismů vedoucích k rozvoji SAR jsou kyselina jasmonová (JA) a auxiny. SAR je asociována s aktivací velkého počtu genů kódujících různé typy stresových proteinů včetně tzv. s patogenezi souvisejících proteinů (PR proteiny, pathogenesis-related proteins). Tyto proteiny produkované hostitelskou rostlinou jsou exprimovány specificky jednak lokálně v místech infekce patogenem a jejich exprese je rovněž indukována jakou součástí SAR i v dalších částech rostliny⁶.

2. Elicitory

Látky spouštějící obranné reakce v interakci rostlina-patogen, jako součást výše popsaných mechanismů imunity PAMP a PTI, označujeme jako elicitory. Z chemického hlediska se jedná o celé spektrum látek zahrnující proteiny,

peptidy, oligosacharidy i nízkomolekulární sloučeniny. Elicitory se váží na specifické receptory nebo vysokoafinitní místa lokalizovaná obvykle na povrchu buněčných membrán a následně dochází k aktivaci signálních drah spouštějící vlastní obranné reakce rostlinných buněk^{6,8}.

Primární elicitory pocházejí z patogenů, zatímco jako elicitory sekundární jsou označovány látky uvolněné rostlinou po napadení patogenem⁹. Elicitory lze také dělit na nespecifické a specifické: mezi nespecifické elicitory patří látky, které se vyskytují u celé řady patogenů (např. polysacharidy buněčných stěn nebo některé nízkomolekulární látky jako mastné kyseliny, steroly apod.), specifické elicitory jsou tvořeny konkrétním patogenem – ve většině případů jde o produkty *Avr* genů, které zpravidla bývají rozpoznávány jen určitou skupinou hostitelů. Reakce na specifické elicitory bývá také zpravidla mnohem komplexnější než je tomu u nespecifických elicitorů^{4,8,9}.

3. Elicitiny – proteinové elicitory

Zvláštní skupinou specifických elicitorů představují elicitory. Jedná se o malé extracelulární proteiny vylučované zástupci oomycet, zejména rodů *Phytophthora* a *Pythium*, jejichž struktura je vysoce konzervovaná^{10,11}. Elicitiny nemají enzymovou aktivitu, nicméně patří do skupiny tzv. proteinů přenášející lipidy (lipid transfer proteins, LTP), které jsou schopny přenášet mastné kyseliny a steroly¹². Rozpoznávání elicitinů hostitelskými rostlinami je vysoce citlivé, např. u tabáku je pro vyvolání obranné reakce dostatečná již nanomolární koncentrace.

Elicitiny byly poprvé popsány jako monomerní hydrofilní proteiny o velikosti cca 10 kDa, složené obvykle z 98 aminokyselin¹³. Struktura elicitinů je obecně tvořena jedním antiparalelním β -listem a pěti α -helixy, které jsou stabilizovány každý třemi intramolekulárními disulfidovými můstky mezi šesti cysteiny lokalizovanými v konzervovaných pozicích. Ve struktuře zcela chybí aminokyseliny tryptofan, histidin a arginin, naopak serin a threonin představují přibližně 30 % proteinu. Nepřítomnost tryptofanu způsobuje, že elicitory vykazují typická tyrosinová UV spektra¹⁰. Struktura elicitinů obsahuje hydrofobní dutinu, která umožňuje specifickou vazbu sterolů a mastných kyselin^{14–16}.

Elicitiny se podle primární struktury dělí do pěti tříd^{10,17,18}. Třída I zahrnuje proteiny tvořené 98 aminokyselinami obsahující vždy 6 cysteinů, 3 methioniny, 2 fenylalaniny, 3 glyciny. Pozice pro leucin, isoleucin, prolin a threonin jsou vysoce konzervované. Třída I se dělí na elicitory kyselé (α -elicitiny, třída I-A) a bazické (β -elicitiny, třída I-B)¹⁹.

Většina elicitinů produkovaných patogeny rodu *Pythium* se řadí do třídy Py označované také jako I' (cit.¹⁷). Jedná se o skupinu kyselých elicitinů tvořených 98–101 aminokyselinami, která se mírně liší od třídy I, a je pro ni charakteristická přítomnost asparaginových glykosylačních míst. Třída II obsahuje silně kyselé elicitory o velikosti

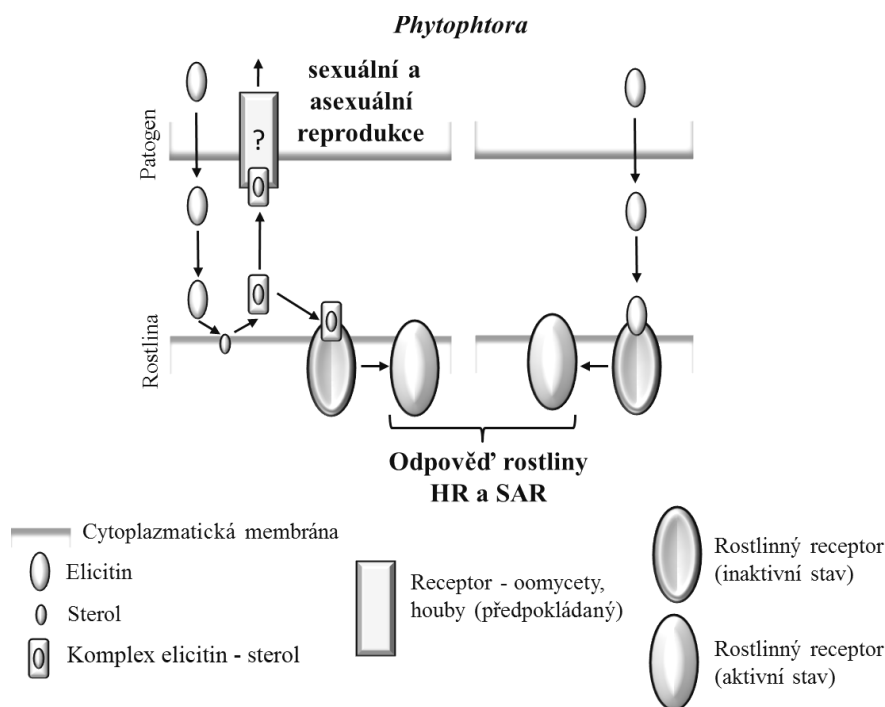
103–104 aminokyselin, které mají krátký hydrofilní C-terminální konec a jsou produkovány např. patogenem *Phytophthora cryptogea*²⁰. Elicitiny třídy III mají řetězec s délkou 165–170 aminokyselin, z nichž 98 je charakteristických pro elicitory a následujících asi 70 aminokyselin na C-terminálním konci polypeptidického řetězce, tvořeném ze 75 % aminokyselinami serinem, threoninem a alaninem, představuje *O*-glykosylovanou doménu. Elicitiny třídy III jsou produkovány např. patogenem *Phytophthora infestans*¹⁷.

Elicitiny dělíme na základě jejich hodnoty pI na kyselé (α -elicitiny, pI < 5) a bazické (β -elicitiny, pI > 7,5)²¹. Obecně platí, že zatímco α -elicitiny jsou produkovány vždy, β -elicitiny pouze některými druhy patogenu. Počet negativně nabitých aminokyselin, jako jsou kyseliny asparagová a glutamová, je téměř konstantní a pohybuje se v rozmezí od 3 do 5. U β -elicitinů je pozitivní náboj dán přítomností 6 lysinů ve struktuře, u kyselých α -elicitinů jsou přítomny jen 2–4 lysiny. U vysoce bazických β -elicitinů byly identifikovány fosforylační místa na karboxylovém konci proteinu (rezidua 92–94), které u většiny α -elicitinů chybí. β -Kryptogein a β -drechslerin mají další fosforylační místa lokalizovaná uvnitř tzv. ω -smyčky (rezidua 37–39)¹⁰.

Strukturní rozdíly mezi oběma skupinami elicitinů se odráží i v rozdílných schopnostech aktivace HR rostlin a v hodnotách koncentrací potřebných pro vznik nekrózy rostlinných pletiv. Zvýšený nekrotický účinek u bazických elicitinů je zřejmě způsoben vysokým množstvím lysinů na povrchu proteinu. Bazické β -elicitiny mají v pozici 13 velký hydrofilní aminokyselinový zbytek (obvykle lysin), kdežto u kyselých α -elicitinů se na stejném místě nachází malý nepolární valin²². Kyselé α -elicitiny, jako např. kapsicein z *P. capsici*, vykazují o cca 2 řády nižší schopnost vyvolat nekrózu rostlinných buněk než bazické β -elicitiny jako kryptogein. Navíc např. u tabáku byla prokázána 10 až 50násobně vyšší aktivace systémové získané rezistence (SAR) bazickými elicitory ve srovnání s kyselými¹⁰.

4. Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin

Patogenní organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium* postrádají schopnost syntetizovat steroly, které jsou nezbytné pro jejich reprodukci. Elicitiny produkované těmito organismy působí jako látky vyčytávající steroly z hostitelského organismu a následně spouští aktivní fázi sexuální a asexuální reprodukce patogenu^{14–16}. Tyto fyziologické a morfologické změny vyžadují komplexní signální systém zahrnující specifické receptory i na straně oomycet (obr. 1). Na druhé straně po vazbě elicitinů ve formě komplexu sterol-elicitin na příslušný receptor hostitelského organismu, dochází k aktivaci obranného systému rostlin¹⁶. Dvojitá role komplexu sterol-elicitin v reprodukci patogenu (virulentní faktor) a současně v mechanismech obrany rostliny (avirulentní faktor) tvoří základ dynamických in-



Obr. 1. Úloha elicitinů při transportu sterolů a aktivaci obranných reakcí rostlin (upraveno podle cit. ^{12,23})

terakcí mezi patogenem a rostlinou. Elicitiny pronikají lépe do vnější vrstvy membrány než proteiny přenášející lipidy, které se však mohou chovat jako antagonisté elicitinů a potlačovat tak buněčné odpovědi na elicitiny¹².

5. Signální dráhy rostlin aktivované elicitiny

Rozpoznání elicitinů rostlinnými buňkami je obecně zajištěno prostřednictvím receptorů, případně vysokoafinitních vazebních míst lokalizovaných v plazmatické membráně^{24,25}. Signální dráhy vyvolané elicitiny jsou znázorněny na obr. 2 (upraveno podle cit. ¹⁰). Vazba elicitinu (1) na receptor vyvolává řadu změn v buňce na molekulární úrovni. Dochází k aktivaci efektorových proteinů fosforylací (2, 4), aktivaci vápníkových (3) a chloridových kanálků a současně inhibici H^+ -ATPasy (5) a aktivaci membránové NADPHoxidasu vedoucí k acidifikaci cytosolu a dalším buněčným odpovědím (8). Alkalizace extracelulárního média (7) vede k zesílení aktivace NADPHoxidasu, zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku a zvýšenému zabudování vápenatých iontů do buněčné stěny (9).

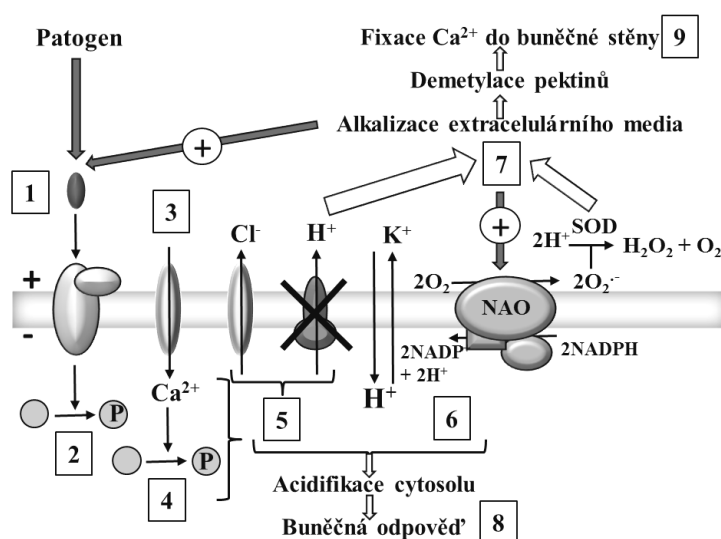
V důsledku vyplavení K^+ a Cl^- iontů z buňky dochází k depolarizaci membrány, která vede také k aktivaci signální dráhy vedoucí v první řadě k aktivaci NADPHoxidasu a blokadě H^+ -ATPasy. NADPHoxidasa produkuje superoxidový anion-radikál, který se dále přeměňuje na peroxid vodíku a další reaktivní formy kyslíku (ROS)^{26,27}. Inhibicí plazmatické H^+ -ATPasy dochází ke snížení pH cytosolu, alkalizaci extracelulárního prostoru a zvýšení intracelulárního množství ATP^{12,27–29}. Tyto projevy rané fáze obranné

reakce lze pozorovat již několik minut po přidání elicitinu.

Na přenosu signálu v odpovědi rostliny na elicitiny se podílí také změny ve fosforylačním stavu proteinů jako důsledek inhibice proteinfosfatů a aktivace proteinkinas, mezi které patří např. skupiny proteinkinas aktivované mitogenem (MAPK), poškozením nebo zvýšenou hladinou kyseliny salicylové^{30–33}. Působením elicitinů dochází dále ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, které se vedle funkce druhých posílů uvnitř buňky podílí rovněž na zpevnění buněčné stěny^{30,34}.

Vedle ROS jsou do obranné reakce indukované elicitiny zapojeny i oxid dusnatý (NO) a reaktivní formy dusíku. Aplikace elicitinů vyvolává u rostlinných buněk zvýšenou produkci NO (cit. ^{33,35,36}), která reguluje aktivity klíčových enzymů posttranslačními modifikacemi jako je S-nitrosylace cysteinových thiolů³⁷. Signální dráha NO indukovaná kryptoginem je také propojena se signálními drahami cytosolického vápníku prostřednictvím S-nitrosylace kalmodulinu a regulace exprese genů regulujících hladinu Ca^{2+} iontů³⁸. Při aplikaci elicitinu INF1 z oomycety *Phytophthora infestans* bylo prokázáno propojení signálních drah NO a MAPKkinas v bazální obraně rostlin³³. Zapojení NO v indukcii buněčné smrti po elicitaci kryptoginem zahrnuje reakci se superoxidem produkovaným NADPHoxidasou za tvorby peroxonitritu, který se účastní regulace exprese genů účastnících se procesu buněčné smrti³⁹.

V rámci pozdní fáze obranné reakce rostlin vyvolané elicitiny dochází k expresi obranných genů, mezi které se řadí patogeny indukované PR (pathogenesis related) pro-

Obr. 2. Signální dráhy aktivované elicitiny (upraveno podle cit.¹⁰)

teiny, fenylalaninamoniaklyasa jako klíčový enzym fenylpropanoidní dráhy a proteiny biosyntézy tríslovin a fitoalexinů^{40,41}. Interakce rostlinných buněk s elicitiny také zahrnuje aktivaci signálních drah rostlinných hormonů kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenu⁴². Navíc byla prokázána schopnost migrace elicitinů vaskulárním systémem a s tím spojená aktivace systémové získané rezistence (SAR)^{13,25}.

6. Kryptogein

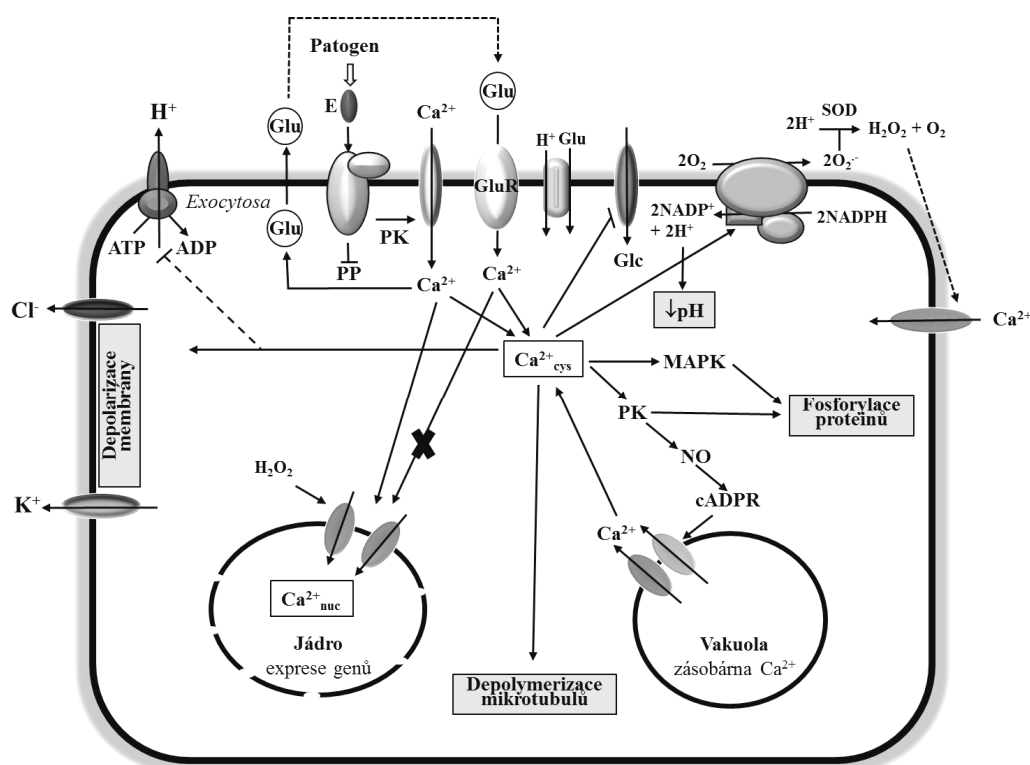
Nejčastěji studovaným elicitem je kryptogein produkovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea*, který patří mezi bazické β -elicitiny (hodnota pI 8,5). Kryptogein je globulární hydrofilní protein o molekulové hmotnosti 10 323 Da obsahující 5 α -helixů a jeden dvouvláknový antiparalelní β -skládaný list⁴³. Aminokyseliny v pozici 33 až 42 spojující α 2 a α 3 helixy tvoří tzv. ω -smyčku, jejíž struktura je stabilizována interakcí mezi Tyr33 a Pro42. Tyto struktury jsou propojeny disulfidovými můstky (Cys3–Cys71, Cys27–Cys56 a Cys51–Cys95). Struktura ω -smyčky je zřejmě odpovědná za vazbu na receptor rostlinné buňky a aktivaci signální kaskády vedoucí k HR. Přenos mastných kyselin a sterolů umožňuje hydrofobní dutina obsahující striktně konzervovaná hydrofobní rezidua, lokalizovaná mezi strukturou α -helixu s polárními aminokyselinami a strukturou tvořenou ω -smyčkou a β -listem⁴⁴.

Kryptogein vyvolává obrannou reakci u tabáku, která vede k nekróze, tj. odumření rostlinného pletiva v místě kontaktu s patogenem produkujícím elicitin, ale současně ke zvýšené rezistenci vůči patogenům v ostatních částech rostliny^{13,45}. Kryptogein se váže na specifický receptor v cytoplazmatické membráně a jeho funkce je pravděpo-

dobně spojena s aktivací vápníkových kanálků. Jedná se o glykoprotein složený ze dvou podjednotek o velikosti 162 kDa a 50 kDa, přičemž kryptogein se váže reverzibilně *N*-glykosidovou vazbou na cukernou složku 162 kDa podjednotky^{25,46,47}. Jako shrnutí řady studií interakce kryptogeinu s rostlinnými buňkami byl navržen model aktivace signálních drah rostlin v odpovědi na kryptogein (obr. 3)⁴⁸. Kaskáda signálních drah zahájená interakcí elicitinu kryptogeinu (E) s receptorem vede ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , na kterém se podílí i ionotropní glutamový receptor (GluR). Produkce NO a ROS indukuje zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} i z vnitřních zdrojů (vakuola), zvýšená koncentrace Ca^{2+} reguluje aktivitu Ca^{2+} -dependentních proteinů v jádře a je zapojena v regulaci genové exprese. Významnou roli v přenosu signálu má fosforylace/defosforylace proteinů, depolarizace membrány a depolymerizace mikrotubulů.

Po aplikaci kryptogeinu byla prokázána zvýšená biosyntéza lipidů a kvalitativní změny v zastoupení lipidů, které se podílí na stabilitě membrán rostlinných buněk⁵⁰. Prostřednictvím aktivace vápníkových kanálků a zvýšené koncentrace vápníku v cytosolu kryptogein indukuje exocytosu glutamátu do apoplastu a následnou aktivaci ionotropního glutamátového receptoru zapojeného v aktivaci obranných reakcí a mechanismu produkce NO (cit.⁴⁹). Po aplikaci kryptogeinu dochází ke zvýšené produkci NO a *S*-nitrosylaci proteinů, jako je např. protein účastnící se buněčného dělení cyklin-dependentní kinasa CDC48 (cit.³⁷). Zapojení NO v indukci buněčné smrti po aplikaci kryptogeinu bylo potvrzeno přidávkem lapače NO, které vedlo k poklesu rozsahu buněčné smrti vyvolané elicitem v buněčné suspenzi tabáku^{39,51}.

Bourque a spol. prokázali roli histondeacetylasy 2 jako negativního regulátoru buněčné smrti⁵² indukované elicitory. Lze předpokládat, že HR je kontrolována post-



Obr. 3. Schéma signálních drah indukovaných kryptogeinem (upraveno podle cit. ^{48,49})

translačními modifikacemi včetně acetylace jaderných proteinů. Aplikace kryptogeinu indukovala zastavení buněčného cyklu v G-2 fázi. Byla pozorována inhibice histon H⁺ kinasové aktivity cyklin-dependentních kinas. Proteasom-dependentní proteinová degradace má také klíčovou roli v HR indukované kryptogeinem⁵³. V další studii bylo potvrzeno, že v rané fázi po aplikaci kryptogeinu dochází k indukci endocytózy mechanismem závislým na produkci ROS enzymem NADPHoxidasou⁵⁴.

Reorganizace aktinových vláken indukovaná kryptogeinem je zapojena v regulaci HR přes modifikaci struktury vakuoly vedoucí k desintegraci vakuolární membrány⁵⁵. Po aplikaci kryptogeinu byla prokázána aktivace nejméně čtyř jaderných Ca²⁺-dependentních proteinkinas⁵⁶. Působením kryptogeinu dochází v rostlinách tabáku ke zvýšení specifické exprese genů souvisejících s obranou rostlin, zahrnující kyselé i bazické formy prakticky všech známých tabákových PR proteinů společně s geny pro NADPHoxidasu, lipoxygenasu a enzymy biosyntézy fenolických látek a isoprenoidů. Současně jsou pozorovány akumulace signálních látek jako je kyselina salicylová, jasmonová, ethylen a phytoalexiny^{57,58}.

Přes rozdílné biologické aktivity všechny elicitory sdílejí podobná vysokoafinitní vazebná místa na plazmatické membráně s podobnou hodnotou K_D (cit.⁵⁹). Pozorování, že vazba sterolu na kryptogein vyvolává změnu v konformaci ω-smyčky⁶⁰, vedlo k formulaci hypotézy, že

tato konformační změna vede k aktivaci kryptogeinu a následně komplex sterol-kryptogein interaguje s vysokoafinitními místy plazmatické membrány¹⁵. Tato hypotéza byla testována s využitím několika mutantů navržených metodami molekulárního modelování, které by umožňovaly rozlišit vztahy mezi strukturou a biologickou funkcí spojenou s vazbou sterolů. Použití mutantů se sníženou schopností vázat steroly vedlo k závěru, že tento parametr nemá vztah se schopností vyvolávat obranné odpovědi rostlin, ale má význam pouze pro aktivaci signálních mechanismů v rané fázi⁶¹. To je ovšem v rozporu se závěry další studie, která ukázala, že schopnost vazby sterolů ovlivňuje pouze interakci kryptogeinu s vysokoafinitním místem na membráně²³. Přestože mají takřka identickou strukturu a vazebné schopnosti, komplexy kryptogein-sterol a β-cinnamomin-sterol vyvolávají velmi odlišné odezvy v rané fázi. Schopnost kryptogeinu vyvolávat obranné reakce je tedy zřejmě více závislá na přítomnosti specifických reziduí než na schopnosti vázat steroly. Jako nejlepšími kandidáty na tuto funkci se jeví lysinové zbytky, což bylo potvrzeno silným vlivem mutace K13V na schopnost indukce obranných reakcí rostlin tabáku⁶². Na základě těchto výsledků byl navržen model přenosu signálu založený na možné interakci specifických lysinových reziduí s předpokládanou proteinovou složkou vysokoafinitních vazebných míst²³.

7. Závěr

Elicitory jsou vnější aktivátory obranných systémů rostlin, jejichž biologické aktivity se projevují ve velmi nízkých koncentracích. Mezi časné reakce patří hypersenzitivní reakce vedoucí k lokální buněčné smrti, později může dojít k rozvoji SAR na úrovni celé rostliny. Výsledky studia účinku elicitorů, proteinových elicitorů z oomycet rodů *Phytophthora* a *Pythium*, přináší nové poznatky o molekulárních mechanismech rozpoznání elicitorů receptory rostlinných buněk, přenosu signálu a aktivaci obranných mechanismů hostitelské rostliny. Aplikace specifických elicitorů může vyvolat zvýšenou odolnost rostlin vůči řadě významných patogenů. Tyto poznatky vedou k potenciálnímu využití elicitorů při ochraně zemědělsky významných plodin proti mikrobiálním infekcím a zlepšení výtěžnosti v průběhu pěstování.

Tato práce byla podpořena grantem GAČR P501/12/0590.

Seznam zkratk

cADPR	cyklická ADP ribosa
Glc	glukosa
Glu	kyselina glutamová
GluR	ionotropní glutamový receptor
HR	hypersenzitivní reakce
JA	kyselina jasmonová
MAPK	mitogen-aktivované proteinkiny
NADPH	nikotinamidinukleotidfosfát
NAO	NADPH oxidasa
PK	proteinkinasa
PP	proteinfosfatasa
PR	pathogenesis related
ROS	reaktivní formy kyslíku
SA	kyselina salicylová
SAR	systémově získaná rezistence

LITERATURA

- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D.: *Plant Cell* 8, 1773 (1996).
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.: *Cell* 79, 583 (1994).
- Morel J.-B., Dangl J. L.: *Cell Death Differ.* 4, 671 (1997).
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L.: *Immunol. Rev.* 198, 249 (2004).
- Jones J. D. G., Dangl J. L.: *Nature* 444, 323 (2006).
- Boller T., Felix G.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379 (2009).
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E. J., Jones J. D. G., Felix G., Boller T.: *Nature* 428, 764 (2004).
- Montesano M., Brader G., Palva E. T.: *Mol. Plant Pathol.* 4, 73 (2003).
- Hahn M. G.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 387 (1996).
- Ponchet M., Panabieres F., Milat M. L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J. P.: *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 1020 (1999).
- Panabieres F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P.: *Mycol. Res.* 101, 1459 (1997).
- Blein J.-P., Coutos-Thévenot P., Marion D., Ponchet M.: *Trends Plant Sci.* 7, 293 (2002).
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P., Ricci P.: *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 181 (1996).
- Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 133 (1998).
- Osman H., Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J. P.: *FEBS Lett.* 489, 55 (2001).
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.-L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J.-P.: *Mol. Biol. Cell* 12, 2825 (2001).
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 1028 (1997).
- Kamoun S., Young M., Glascock C. B., Tyler B. M.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 15 (1993).
- Nespoulous C., Huet J.-C., Pernollet J.-C.: *Planta* 186, 551 (1992).
- Panabières F., Marais A., Le Berre J., Penot I., Fournier D., Ricci P.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 996 (1996).
- Le Berre J. Y., Panabieres F., Ponchet M., Denoroy L., Bonnet P., Marais A., Ricci P.: *Plant Physiol. Biochem.* 32, 251 (1994).
- O'Donohue M., Gousseau H., Huet J.-C., Tepfer D., Pernollet J.-C.: *Plant Mol. Biol.* 27, 577 (1995).
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J.: *J. Exp. Bot.* 63, 2203 (2012).
- Cheong J. J., Hahn M. G.: *Plant Cell* 3, 137 (1991).
- Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.-N., Ouaked F., Wendeheime D., Chiltz A., Schaffner A., Pugin A.: *Biochimie* 81, 663 (1999).
- Zimmermann S., Frachisse J.-M., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Guern J.: *Plant Physiol. Biochem.* 36, 665 (1998).
- Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J.: *Plant Cell* 9, 2077 (1997).
- Blein J.-P., Milat M.-L., Ricci P.: *Plant Physiol.* 95, 486 (1991).
- Bourque S., Ponchet M., Binet M.-N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A.: *Plant Physiol.* 118, 1317 (1998).
- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A., Pugin A.: *Plant J.* 15, 773 (1998).
- Zhang S., Liu Y., Klessig D. F.: *Plant J.* 23, 339 (2000).
- Ren D., Yang K.-Y., Li G.-J., Liu Y., Zhang S.: *Plant Physiol.* 141, 1482 (2006).
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H.: *Plant Cell* 20, 1390

- (2008).
34. Amelot N., Carrouche A., Danoun S., Bourque S., Haiech J., Pugin A., Ranjeva R., Grima-Pettenati J., Mazars C., Briere C.: *Plant Cell Environ.* **34**, 149 (2011).
 35. Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J.: *Plant J.* **23**, 817 (2000).
 36. Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F., Wendehenne D.: *J. Exp. Bot.* **59**, 3407 (2008).
 37. Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H., Wendehenne D.: *Biochem. J.* **447**, 249 (2012).
 38. Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Francès V., Ma W., Berkowitz G. A., Wendehenne D.: *Plant Physiol.* **163**, 459 (2013).
 39. Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D.: *Plant Cell Environ.* (2014), doi: 10.1111/pce.12295.
 40. Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A.: *Plant Cell* **14**, 2327 (2002).
 41. Cormack R. S., Eulgem T., Rushton P. J., Köchner P., Hahlbrock K., Somssich I. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 92 (2002).
 42. Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H.: *J. Phytopathol.* **157**, 287 (2009).
 43. Fefeu S., Bouaziz S., Guittet E., Huet J.-C., Pernollet J.-C.: *Protein Sci.* **6**, 2279 (1997).
 44. Gooley P., Keniry M., Dimitrov R., Marsh D., Keizer D., Gayler K., Grant B.: *J. Biomol. NMR* **12**, 523 (1998).
 45. Keller H., Blein J. P., Bonnet P., Ricci P.: *Plant Physiol.* **110**, 365 (1996).
 46. Wendehenne D., Binet M.-N., Blein J.-P., Ricci P., Pugin A.: *FEBS Lett.* **374**, 203 (1995).
 47. Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., Lebrun-Garcia A.: *J. Biol. Chem.* **274**, 34699 (1999).
 48. Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 711 (2006).
 49. Vatsa P., Chiltz A., Bourque S., Wendehenne D., Garcia-Brugger A., Pugin A.: *Biochimie* **93**, 2095 (2011).
 50. Medeira C., Quartin V., Maia I., Diniz I., Matos M. C., Smedo J., Scotti-Campos P., Ramalho J., Pais I., Ramos P., Melo E., Leitão A., Cravador A.: *Eur. J. Plant Pathol.* **134**, 145 (2012).
 51. Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D.: *Plant Physiol.* **135**, 516 (2004).
 52. Bourque S., Dutartre A., Hammoudi V., Blanc S., Dahan J., Jeandroz S., Pichereaux C., Rossignol M., Wendehenne D.: *New Phytol.* **192**, 127 (2011).
 53. Ohno R., Kadota Y., Fujii S., Sekine M., Umeda M., Kuchitsu K.: *Plant Cell Physiol.* **52**, 922 (2011).
 54. Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F.: *Plant Physiol.* **146**, 1255 (2008).
 55. Higaki T., Goh T., Hayashi T., Kutsuna N., Kadota Y., Hasezawa S., Sano T., Kuchitsu K.: *Plant Cell Physiol.* **48**, 1414 (2007).
 56. Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A., Bourque S.: *Biochem. J.* **418**, 191 (2009).
 57. Suty L., Blein J. P., Ricci P., Pugin A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 644 (1985).
 58. Keller H., Bonnet P., Galiana E., Pruvot L., Friedrich L., Ryals J., Ricci P.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 696 (1996).
 59. Buhot N., Douliez J. P., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B. F., Milat M. L., Ponchet M., Mikès V., Kader J. C., Blein J. P.: *FEBS Lett.* **509**, 27 (2001).
 60. Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J.-C., Brunie S.: *Protein Sci.* **8**, 1191 (1999).
 61. Lochman J., Kasparovsky T., Damborsky J., Osman H., Marais A., Chaloupkova R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikes V.: *Biochemistry* **44**, 6565 (2005).
 62. Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčeková N., Chaloupková R., Ladislav D., Damborský J., Lochman J.: *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 321 (2011).

P. Moricová^a, L. Luhová^a, J. Lochman^b, T. Kašparovský^b, and M. Petřivalský^a (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc;* ^b*Institute of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Elicitins: Key Molecules in Plant – Pathogen Interactions**

Elicitors, endogenous compounds produced by microbial pathogens, induce defence responses in plants. They rank among chemically nonuniform groups including proteins, glycoproteins, oligo- and polysaccharides and lipids. By multiple mechanisms, elicitors are capable of triggering various modes of plant defence like oxidative burst, hypersensitive response, increased expression of pathogenesis-related proteins and the production of antimicrobial compounds – phytoalexins. Elicitins, secreted by oomycetes from *Phytophthora* and *Pythium* spp., are small (10 kDa) protein elicitors structurally similar to lipid-transfer proteins of plant cells and behaving like sterol carrier proteins. In the host plant, elicitors induce a hypersensitive response and development of acquired systemic resistance to many microbial phytopathogens. The review summarizes the current knowledge of the molecular modes of elicitor interaction with plant cells, with a special emphasis on cryptogin as a model elicitor for potential application in the induction of systemic plant resistance.

FUNKČNÉ ZLOŽKY CEREÁLII ÚČINNÉ V PREVENCH CIVILIZAČNÝCH OCHORENÍ

ANDREA MARKO, MILADA RAKICKÁ
a ERNEST ŠTURDÍK

*Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, Ústav biochémie,
výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37
Bratislava
andrea.holubkova@stuba.sk*

Došlo 28.2.14, prijaté 27.3.14.

Kľúčové slová: cereálie, fytochemikálie, vláknina,
β-glukány, rezistentné škroby

Obsah

1. Úvod
2. Morfológické a chemické zloženie obilných zŕn
3. Zdraviu prospešné látky obsiahnuté v cereáliách
 - 3.1. Vláknina
 - 3.2. β-Glukány
 - 3.3. Rezistentný škrob
 - 3.4. Fytochemikálie cereálií
4. Záver

1. Úvod

Pre prevažnú časť ľudstva cereálie predstavujú základnú a najdôležitejšiu potravinu, ktorá vo svojom prirodzenom stave poskytuje ľudskému organizmu najdôležitejšie nutrienty. Sú zdrojom sacharidov, vysokohodnotných bielkovín, vitamínov, minerálnych látok a v neposlednom rade antioxidantov, aktívnych látok, vlákniny a β-glukánov. Podstatný podiel výživovo dôležitých zložiek vrátane vlákniny, mikronutrientov či antioxidantov aktívnych zložiek sa nachádza vo vonkajších, obalových vrstvách obilných zŕn. Množstvo štúdií zaoberajúcich cereáliami poukazuje na pozitívny vplyv konzumácie predovšetkým celozrnných cereálnych produktov na ľudské zdravie.

Okrem týchto výhod obilniny ovplyvňujú výživovú bilanciu svetovej populácie, čo sa týka objemu konzumu zastávajú medzi ostatnými poľnohospodárskymi produktami významné postavenie. Cereálie sú dobre skladovateľné, sú pomerne lacnou surovinou a aj z hľadiska kontaminácie cudzorodými látkami je obilné zrnó pomerne odolné¹. Pravidelnou konzumáciou celozrnných cereálií je možné taktiež prispieť k zníženiu rizika civilizačných ochorení².

V súčasnosti sa pozornosť odbornej verejnosti v oblasti výživy, ochrany zdravia ľudí a diabetológie čoraz

viac upriamuje na produkciu nových funkčných potravín aj na cereálnej báze, nakoľko obilniny sú bohatým zdrojom bioaktívnych fytochemikálií a predstavujú vhodný substrát pre rast a metabolizmus pozitívne pôsobiace mikrobiálnych kultúr.

Funkčné potraviny možno definovať ako potraviny, ktoré sú obohatené o bioaktívne zložky. Prostredníctvom preukázaných fyziologických účinkov na ľudský organizmus majú schopnosť znižovať riziko vzniku chronických ochorení. Podľa organizácie The International Life Science Institute (ILSI) potravina môže byť označená za funkčnú, ak je možné uspokojivo preukázať, že má priaznivý vplyv na jednu alebo viacero špecifických funkcií v organizme a zlepšuje celkový zdravotný stav alebo znižuje riziko ochorení³. Doteraz sú už na spotrebiteľskom trhu známe funkčné potraviny, ktoré boli vyvinuté s cieľom znižovania krvného tlaku, cholesterolu, hladiny glukózy v krvi a rizika osteoporózy⁴.

2. Morfológické a chemické zloženie obilných zŕn

Obilné zrná sú plody, resp. semená alebo jadrá rastlín, ktoré patria do čeľade *Gramineae*. Túto skupinu trávovitých rastlín možno rozdeliť na dve podskupiny, a to cereálie a pseudocereálie. Medzi najznámejších zastupiteľov cereálií patrí pšenica, raž, jačmeň, ovos a tritikale⁵. K najznámejším pseudocereáliám zaraďujeme pohánku, mrlík, amarant, cirok, proso, ječatku².

Pseudoobilniny sú plodiny, ktoré produkujú škrobnaté zrná, preto sú podobné ako cereálie vhodné pre ľudskú výživu. Pseudocereálie majú veľmi dobré výživové parametre, preto tieto na škrob bohaté rastliny môžu vhodne obohacovať ľudskú výživu. Pseudoobilniny na rozdiel od obilnín neobsahujú lepok, preto sú vhodné pre výživu ľudí trpiacich na celiakiu. Na druhej strane neprítomnosť lepku v pseudocereáliách spôsobuje ich ťažšie spracovanie⁶. Z hľadiska chemického zloženia majú vyšší obsah bielkovín ako cereálie. Vyznačujú sa vysokým obsahom esenciálnych aminokyselín arginínu a histidínu. Nachádza sa v nich veľa nenasýtených mastných kyselín, predovšetkým kyselina linolénová. Z minerálnych látok obsahujú najviac vápnika, magnézia, železa, sodíka a zinku. Pseudocereálie sú dobrým zdrojom vitamínu C, riboflavínu a vitamínu E. Sú podobné ako cereálie bohaté na fenolové látky, ktoré sa používajú na medicínske účely. K významným patrí rutin v pohánke a saponíny, ktoré vykazujú antikarcinogénne, protizápalové, cholesterolznižujúce a imunomodulačné účinky⁷.

Základná štruktúra obilného zrna pozostáva z endospermu, otrúb a zárodočnej vrstvy, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v klíčení a obsahujú esenciálne zložky

a fytochemikálie dôležité v ľudskej výžive⁷.

Obilné zrnó obklopujú obalové vrstvy, ktoré pozostávajú z oplodia (pericarp), pokožky, osemenia (testa) a aleurónovej vrstvy⁸. Tvoria 5–20 % hmotnosti a sú najbohatšie čo do obsahu vitamínov skupiny B, z antioxidantne aktívnych látok sú to najmä polyfenolové látky. V obalových vrstvách sa nachádza značné množstvo nerozpustnej vlákniny vo forme celulózy, lignínu a arabinoxilánov^{8,9}.

Zárodočná vrstva (embrio) tvorí 2,5–12 % hmotnosti zrna. Embrio obsahuje 8 % celkových proteínov zrna, ktoré sú však vo forme enzýmov a nie ako zásobné proteíny (glutén). Lipidy predstavujú podiel až do 20 %, tvorí ich najmä kyselina linolová, linolénová, olejová a palmitová¹⁰. Je koncentrovaným zdrojom minerálov, najmä železa, zinku, tokoferolov a tokotrienolov^{7,9,11}.

Endosperm tvorí najväčšiu časť, 63–91 % zrna. Je to škrobnatý komponent pozostávajúci najmä zo sacharidov, vrátane škrobu a oligosacharidov ako sú fruktóza, inulín, či oligofruktóza. Bunky endospermu obsahujú vysoký podiel β-D-glukánu, vitamínov skupiny B, riboflavín, kyselinu pantoténovú a proteíny. Minoritnou zložkou sú lipidy^{12,13}.

Kvantitatívne najdôležitejšou zložkou cereálií sú sacharidy. Tvoria 66 až 75 % sušiny. Z monosacharidov sú zastúpené v zrnách najmä hexózy (fruktóza, glukóza, galaktóza) a pentózy (arabínóza, xylóza). Sacharóza a maltóza sú disacharidy bežne sa vyskytujúce v cereáliách. Polysacharidy sú polyméry, ktoré sú zložené z viac ako 20 monosacharidových jednotiek. Z nich sa v zrnách cereálií vyskytujú najmä škrob, celulóza a xylány¹⁴. Najviac zastúpený sacharid v obilninách je škrob, ten sa skladá z amylózy a amylopektínu. Obalové vrstvy zŕn sú bohatým zdrojom vlákniny¹⁵. Zahŕňa celulózu a ďalšie rozpustné a nerozpustné neškrobnaté

polysacharidy^{13,16,17}. Významné množstvo rozpustnej vlákniny (3–5 %) tvorí β-glukán nachádzajúci sa najmä v ovse a v jačmeni. β-Glukány sa vyskytujú v subaleurónovej vrstve a endosperme obilných zŕn. Ich koncentrácia sa pohybuje v rozmedzí od 1 % v pšeničných zrnách až do 3–9 % v jačmenných zrnách¹⁷.

Hlavnou zásobnou formou dusíka v cereáliách sú bielkoviny. Ich obsah v cereáliách môže kolísať na základe genetických odlišností a agronomických faktorov. Prevažná časť zásobných bielkovín zrna je lokalizovaná v endosperme. Medzi tieto bielkoviny patria albumíny a globulíny, tzv. cytoplazmatické bielkoviny rozpustné v NaCl, ďalej prolamíny (rozpustné v etylalkohole) a glutelíny (rozpustné v zásadách). Prolamíny a glutelíny môžeme charakterizovať ako typické zásobné proteíny, ktoré tvoria lepok. Bielkoviny typu albumínov a globulínov sú enzymaticky aktívne, dobre rozpustné vo fyziologických roztokoch a ľahko hydrolyzovateľné proteolytickými enzýmami, čo predurčuje ich dobrú stráviteľnosť¹⁸. Cereálie sú považované za ideálny zdroj proteínov, obsahujú však dostatok niektorých esenciálnych aminokyselín ako lyzín a tryptofán^{5,12}. Pseudocereálie sa vyznačujú všeobecne vyšším obsahom proteínov a niektorých esenciálnych aminokyselín, najmä lyzínu, v porovnaní s cereáliami¹⁹.

Cereálie sa vyznačujú nízkym obsahom lipidov, tie však majú významný vplyv na kvalitu a textúru cereálnych potravín²⁰. Pšenica, jačmeň, raž, hnedá ryža a cirok majú nižší obsah lipidov ako ostatné cereálie (ovos, proso a kukurica). Cereálne lipidy majú najmä nepolárny charakter a sú koncentrované najmä v zárodočnej vrstve^{21,22}. Triacylglyceroly sú majoritnou lipidovou zložkou. Okrem triacylglycerolov zaraďujeme medzi nepolárne lipidy aj di- a monoacylglyceroly, mastné kyseliny a estery sterolov.

Tabuľka I

Charakteristika minerálnych látok v obilninách a cereálnych produktoch^{24,25}

	Minerálny prvok	Biologická funkcia
Základné minerály	sodík (Na)	udržiavanie acidobázickej rovnováhy extracelulárny kation udržujúci objem extracelulárnej tekutiny v krvi
	draslík (K)	intracelulárny kation, udržiavanie acidobázickej rovnováhy
	vápnik (Ca)	zdravý vývoj a funkcia kostí a zubov krvná zrážanlivosť nervovo svalová dráždivosť
	fosfor (P)	súčasť kostí a zubov, súčasť DNA, RNA, ATP, GTP a fosfolipidov
	horčík (Mg)	intracelulárny kation, v mnohých enzýmoch znižuje neuromuskulárnu dráždivosť
Stopové minerály	železo (Fe)	zložka hemoglobínu, myoglobínu, cytochrómového systému
	zinok (Zn)	kofaktor enzýmov pre intermediárny metabolizmus a syntézu proteínov a superoxiddizmutázy kontrola génovej transkripcie
	meď (Cu)	koenzym cytochróoxidázy, superoxiddizmutázy hojenie rán

Polárne lipidy sú koncentrované v bunkových membránach. Do tejto skupiny patria steroly²¹. Cereálie predstavujú veľmi bohatý zdroj nenasýtených mastných kyselín. Mastné kyseliny sa viažu v bunkách na estery s dlhým reťazcom alkoholov a tak vytvárajú *N*-acetylové zlúčeniny. Voľné mastné kyseliny sa vyskytujú v cereáliách v menšom množstve. Majoritnými zložkami sú kyselina olejová, linolová a palmitová. Kyselina stearová a linolénová sú prítomné v malom, ale významnom množstve²².

Mikronutrienty v cereáliách zahŕňajú anorganické minerálne prvky a vitamíny. Popol – anorganický minerálny materiál tvorí 1–3 % obsahu sušiny. Tieto látky sú obsiahnuté najmä v perikarpe, klíčku a aleurónovej vrstve obilných zŕn. Technologickým opracovaním obilných zŕn, odstraňovaním obalových vrstiev a zárodočnej vrstvy (klíčku), dochádza k ich strate. Prevládajúce minerálne prvky sú draslík, fosfor, magnézium, železo, mangán, zinok a meď. Cereálie sú však pomerne chudobné na sodík a vápnik²³. Dôležité biochemické funkcie minerálnych prvkov cereálií sú zhrnuté v tab. I.

Cereálie sú bohatým zdrojom vitamínov. Patria sem najmä vitamíny skupiny B, vitamín E, kyselina folová a karotenoidy. Medzi vitamíny skupiny B patrí tiamín (B₁), riboflavín (B₂), niacín (B₃) a pyridoxín (B₆). Najvyšší obsah tiamínu je v jačmeni, pohánke a proso. Obsah vitamínov klesá pri tepelnom opracovaní. Najbohatším zdrojom

riboflavínu je pohánka. Bohatým zdrojom pyridoxínu je proso. Pyridoxín spolu s vitamínom B₁₂ znižuje hladinu homocysteínu v krvnej plazme, ktorý je hlavným rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení. Spomedzi ďalších vitamínov skupiny B nájdeme v cereáliách vitamín B₃ – niacín, skladajúci sa z dvoch foriem, kyseliny nikotínovej a nikotínamidu. Jeho najväčšie koncentrácie z rastlinných zdrojov sú obsiahnuté v sezamových a slnečnicových semenkách, v hnedej ryži, jačmeni a v proso. Vitamín B₃ je súčasťou koenzýmov NAD/NADP, ktoré sa zúčastňujú reakcií prenosu elektrónov v dýchacom reťazci a oxidačnej fosforylácii²⁶. Ďalšie dôležité biochemické funkcie vitamínov skupiny B, ako aj ich citlivosť, resp. stabilita na svetle, vzduchu a voči pôsobeniu tepla, sú sumarizované v tab. II.

3. Zdraviu prospešné látky obsiahnuté v cereáliách

Cereálie obsahujú celú škálu zložiek, ktoré majú pozitívny vplyv na zdravie človeka a dokážu znižovať riziko vzniku chronických ochorení, predovšetkým obezity, diabetu 2. typu a kardiovaskulárnych ochorení. Tieto látky zahŕňujú, okrem vyššie spomínaných vitamínov a minerálnych látok najmä cereálnu vlákninu, β -glukány, rezistentné škroby a fytochemikálie.

Tabuľka II
Charakteristika vitamínov v obilninách a cereálnych produktoch^{25,27}

Vitamín	Biologická funkcia	Rozpustnosť	Stabilita na		
			teple	svetle	vzduchu
Tiamín B ₁	dekarboxylácia pri metabolizme sacharidov, tukov a alkoholu	voda	nie	áno	nie
Riboflavín B ₂	oxidačný metabolizmus zdravá pokožka, pery, jazyk	voda	nie	nie	áno
Niacín B ₃	súčasť NAD/NADP v oxidačnom metabolizme	voda	áno	áno	áno
Pyridoxín B ₆	transaminačný kofaktor pre aminokyseliny tvorba krvi neuromuskulárna funkcia	voda	nie	nie	áno
Foláty, Kys. folová	metabolizmus purínov a pyrimidínov –syntéza DNA preventívne pôsobí proti defektu neurálnej trubice v gravidite tvorba krvi	voda	nie	nie	nie
Kys. pantoténová B ₅	súčasť koenzýmu A, intermediárny metabolizmus neuromuskulárna funkcia syntéza tukov	voda	nie	áno	áno
Vitamín A	funkcia videnia antioxidant rast, rozvoj a diferenciácia tkanív	tuk	nie	nie	nie

3.1. Vlákna

Vlákninu možno charakterizovať ako nestráviteľné a neškrobnaté polysacharidy a lignín, nachádzajúce sa v bunkových stenách rastlín. Skladá sa z izolovaných, organizmom nerozložiteľných polysacharidov^{28,29}.

Prevažná časť vlákniny sa vyskytuje v obalových vrstvách obilných zŕn, ktoré sa odstraňujú v procese mletia. Zrná zbavené týchto vrstiev majú výrazne nižší obsah vlákniny ako celé obilné zrná^{16,30}. Pojem vlákna zahŕňa veľké množstvo zložiek, patrí sem celulóza, hemicelulóza, pektíny, gumy, lignín a ďalšie polysacharidy. Vo vode rozpustná frakcia zahŕňa hemicelulózu, gumy, β -glukány, slizy a pektín. Vo vode nerozpustná frakcia pozostáva najmä z celulózy a lignínu³¹.

Vplyv na ľudský organizmus a jej zdravie prospešné vlastnosti sú známe už po desaťročia. Mnohé štúdie zaoberajúce sa vlákninou poukazujú na jej spojitost s telesnou hmotnosťou. Jej konzumácia nepriamo ovplyvňuje telesnú hmotnosť a hladinu inzulínu v krvi. Podieľa sa na znižovaní rizikových faktorov kardiovaskulárnych ochorení, krvného tlaku a hladiny cholesterolu v krvi^{29,32}.

Vlákna pôsobi v organizme viacerými mechanizmami. Potravinu bohatú na vlákna sú trávené oveľa pomalšie a absorpcia živín tak prebieha dlhšiu dobu, čo podporuje dlhší pocit sýtosti, z čoho následne vyplývajú dlhšie prestávky medzi konzumovanými jedlami a nižší energetický príjem³³. Zložky vlákniny sú v hrubom čreve čiastočne alebo úplne fermentované črevnou mikrofórou, pričom vznikajú plyny a krátkoreťazcové mastné kyseliny, najmä kyseliny octová, propiónová a maslová. Tieto mastné kyseliny znižujú pH v čreve a tým zabraňujú rastu patogénnych mikroorganizmov³⁴.

Rozpustná vlákna na rozdiel od nerozpustnej zvyšuje viskozitu črevného obsahu, spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka, čo vedie k predĺženiu času vstrebávania živín v hrubom čreve. Rozpustná vlákna redukuje účinnosť tráviacich enzýmov a v tenkom čreve spomaľuje postprandiálne inzulínové a glykemické reakcie, ktoré majú za následok spomalenie návratu hladu a následne nižší príjem energie³⁵. Niektoré zložky vlákniny, najmä nestráviteľné oligosacharidy (napríklad inulín a frukto-oligosacharidy) preukazujú prebiotické vlastnosti, teda podporujú rast, aktivitu a pomnoženie probiotických kultúr v hrubom čreve. Vlákna dokáže ovplyvňovať vylučovanie hormónov žliaz s vnútornou sekréciou, vrátane cholecystokinínu. Cholecystokinín je vylučovaný bunkami tenkého čрева a stimuluje sekréciu pankreasu, reguluje vyprázdňovanie žalúdka a centrálny pocit sýtosti³².

Zvýšená konzumácia cereálnej vlákniny znižuje hladiny nasýtených tukov, celkového a LDL cholesterolu a tiež triacylglycerolov v krvi. Vysoký obsah vlákniny v potrave taktiež pomáha pri redukcii koncentrácie postprandiálnej hladiny glukózy a inzulínovej odpovedi^{31,35–37}.

3.2. β -Glukány

β -Glukány možno definovať ako rozpustnú vláknu. Nachádzajú sa prirodzene v surovinách, ako sú niektoré druhy cereálnych zŕn, huby, riasy. Sú produkované aj niektorými kmeňmi baktérií a kvasiniek. Cereálne β -glukány predstavujú zmes (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukánu, teda ide o polysacharidy pozostávajúce z β -D-glukopyranózových jednotiek spojených (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 4) glykozidovou väzbou^{38,39}.

Glukány sú koncentrované najmä v bunkových stenách endospermu. Z cereálií najvyšší obsah vykazuje jačmeň a ovos. Okrem týchto obilnín sú pre ľudskú výživu ich prirodzeným zdrojom aj raž a pšenica⁴⁰.

Tieto polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou majú jedinečný nutričný aj technologický význam. β -Glukány sú rozpustné vo vode a schopné tvoriť viskózne gély. Mnohé klinické štúdie zamerané na hodnotenie účinkov β -glukánov na ľudské zdravie poukazujú na významne pozitívny vplyv na imunitný systém, hladiny cholesterolu a glukózy v ľudskom organizme⁴¹. Mechanizmus účinku β -glukánov však zatiaľ nie je úplne objasnený, ale štúdie na *in vitro* a *in vivo* úrovni dokazujú, že ich účinok závisí od ich viskozity, molekulárnej štruktúry a hmotnosti, stupňa vetvenia, prítomnosti sprievodných látok a konformačných vlastností^{42,43}.

Viaceré klinické štúdie sú zamerané na antidiabetické vlastnosti β -glukánov. Bol popísaný výrazný vplyv zvýšenej konzumácie cereálií a extrudovaných cereálií bohatých na tieto látky na redukciiu postprandiálnej plazmatickej glukózy a inzulínu u zdravých kontrol ako aj u pacientov s diabetom 2. typu^{44,45}.

Mnohé štúdie posudzujú aj vplyv β -glukánov na hladiny sérových lipidov. Anderson a spol. vo svojej práci popisuje β -glukány ako bioaktívne zložky ovsa, ktoré sú zodpovedné za znižovanie hladiny serového cholesterolu. Rovnako ďalší autori popísali potenciálne cholesterolznižujúce účinky pri zvýšenej konzumácii ovsených otrúb u hypercholesteroleminických pacientov^{46,47}. Organizácia the Food and Drug Administration v r. 1997 vydala vyhlásenie, že výživa s nízkym obsahom nasýtených lipidov a cholesterolu zahrňujúca rozpustnú vláknu celozrnného ovsa „môže“ alebo „by mohla“ redukovať riziko vzniku srdcových ochorení. FDA rovnako vyhlásila, že štatisticky významný fyziologický účinok poskytne dávka 3 g β -glukánov/deň (cit.⁴⁸).

3.3. Rezistentný škrob

Rezistentný škrob možno definovať ako škrob alebo degradačné produkty škrobu, ktoré nie sú stráviteľné enzýmami v tenkom čreve. Rezistentné škroby sa členia na 4 subfrakcie: fyzikálne rezistentný škrob (RS1), natívne škrobové granule (RS2), retrogradovaný škrob (RS3) a chemicky modifikovaný škrob (RS4). RS1 sú rezistentné, nakoľko sú vo fyzikálne neprístupnej forme, v čiastočne rozomletých cereálnych zrnách. Chemicky ich možno sta-

noviť ako rozdiel medzi obsahom glukózy uvoľnenej pri enzymatickom štiepení zhomogenizovanej vzorky obilniny a nezhomogenizovanej vzorky. RS1 je tepelne stabilný pri podmienkach klasického varenia. RS2 predstavuje škroby, ktoré majú formu granúl a sú rezistentné voči enzymatickej hydrolýze. V surových škrobových zrnách je škrob relatívne dehydrovaný a má pomerne kompaktnú štruktúru. Táto kompaktná štruktúra limituje dostupnosť tráviacich enzýmov (amyláz) a je zodpovedná za rezistenciu RS2 škrobov a neschopnosť želatinizácie. RS3 reprezentuje najviac rezistentnú škrobovú frakciu, je to najviac retrogradovaná frakcia počas varenia želatinizovaného škrobu. RS3 frakcia je odolná voči vareniu a úplne odolná voči pôsobeniu pankreatických amyláz. Chemicky modifikované škroby (RS4) sú škroby s väzbami inými ako α -(1–4) alebo α -(1–6) (cit. ^{28,49,50}).

Rezistentné škroby vykazujú celú škálu zdravotných benefitov. Prispieva k nim aj produkcia krátkoreťazcových mastných kyselín mikroflórou hrubého čreva, ktoré dokážu fermentačným procesom rozložiť sacharidy nestráviteľné v predchádzajúcich častiach gastrointestinálneho traktu. Produkciou týchto kyselín dochádza k znižovaniu hodnoty pH v čreve, čím sú vytvárané podmienky zamedzujúce rastu a pomnoženiu potenciálne patogénnych baktérií. Prítomnosť krátkoreťazcových kyselín podporuje vytváranie zdravého prostredia čreva a znižuje tak aj riziko vzniku kolorektálnych karcinogénnych ochorení¹⁵.

Rezistentné škroby pozitívne ovplyvňujú funkciu tráviaceho traktu, črevnú mikroflóru, a takisto pomáhajú pri regulácii hladiny cholesterolu v krvi, pri kontrole obezity a ďalších ochorení súvisiacich s výživou^{39,67}.

3.4. Fytochemikálie cereálií

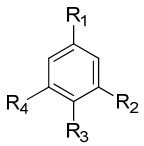
Fytochemikálie sú bioaktívne zlúčeniny obsiahnuté v rastlinách, ktoré nemajú žiadnu energetickú hodnotu a neradia sa ani medzi základné živiny. Vyznačujú sa však

mnohými zdraviu prospešnými vlastnosťami. Tieto zlúčeniny sú produkované rastlinami väčšinou na ich ochranu proti škodcom, chorobám, na reguláciu rastu, alebo ako pigmenty, esencie a arómy⁵¹. V súčasnosti je známe obrovské množstvo fytochemikálií, z ktorých najpočetnejšie skupiny tvoria flavonoidy, glukozinoláty (izotiokyanáty a indoly), fenolové kyseliny, fytáty, fytoestrogény (izoflavóny a lignany), tuky a oleje obsiahnuté v zelenine, ovocí, obilninách, strukovinách a iných rastlinných zdrojoch⁵². Mnohé z týchto látok, ktoré sú obsiahnuté v ľudskej strave, sa vyznačujú antimutagénymi, antikarcinogénnymi, antioxidantnými a protizápalovými účinkami. Okrem týchto pozitívnych efektov boli preukázané aj ďalšie, a to antiobezitné, cholesterol znižujúce a antidiabetické vlastnosti⁵³.

Veľkú skupinu fytochemikálií cereálií predstavujú *polyfenolové zlúčeniny*. Tieto zlúčeniny rastlinného pôvodu sa nachádzajú väčšinou vo forme monomérov so sacharidmi. Vyskytujú sa teda vo forme glykozidov, kde cukrovú zložku tvoria jednoduché sacharidy, disacharidy resp. oligosacharidy. Rastlinné fenolové zlúčeniny sa delia na jednoduché fenoly (monoméne monohydroxy- až polyhydroxyfenolové zlúčeniny), rastlinné triesloviny, t.j. taníny a ligníny⁵⁴. Najčastejšie sa fenolové zlúčeniny vyskytujú vo forme fenolových kyselín a flavonoidov. Fenolové kyseliny sa delia na dve skupiny, sú to deriváty kyseliny hydroxybenzoovej a hydroxyškoricovej. K derivátom kyseliny hydroxybenzoovej patrí kyselina *p*-hydroxybenzoová, vanilínová a kyselina galová. K derivátom kyseliny hydroxyškoricovej patrí kyselina *p*-kumarová, ferulová a kávová⁵⁵. Základnú štruktúru fenolových kyselín sumarizuje tab. III.

Polyfenolové zlúčeniny sa nachádzajú predovšetkým v otrubách obilnín, v strukovinách, v ovocí (jahody, jablká, grepfruit), v červenom víne, v čokoláde. Prijem týchto zlúčenín sa významne spája s nižším rizikom kardiovaskulárnych ochorení⁵⁷.

Tabuľka III
Chemická štruktúra fenolových kyselín⁵⁶

Fenolová kyselina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
				
Protocatechová	COOH	OH	OH	H
Vanilová	COOH	OCH ₃	OH	H
Syringová	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Galová	COOH	OH	OH	OH
<i>p</i> -kumarová	(CH) ₂ CO ₂ H	H	OH	H
Kávová	(CH) ₂ CO ₂ H	OH	OH	H
Ferulová	(CH) ₂ CO ₂ H	OCH ₃	OH	H
Škoricová	(CH) ₂ CO ₂ H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Polyfenolové zlúčeniny zohrávajú dôležitú úlohu pri zmene biochemických a hematologických vlastností v ľudskom organizme. Znižujú hladinu cholesterolu a triacylglycerolov v krvi, a tým pôsobia preventívne proti kardiovaskulárnym ochoreniam⁵⁸. Fenolové zlúčeniny všeobecne zabráňujú *in vitro* oxidácii lipoproteínových častíc s nízkou hustotou a chránia tak organizmus pred aterogenezou⁵⁹. Polyfenoly sa vo všeobecnosti vyznačujú najvyššou antioxidačnou aktivitou spomedzi všetkých prírodných antioxidantov. Pozitívne vplyvajú na integritu bunkovej membrány erytrocytov, teda normálnu tekutosť krvi a tým redukujú riziko mŕtvice. Mnohé štúdie polyfenolov tiež poukazujú na ich antikarcinogénne, antimutagénne a antifungálne vlastnosti⁶⁰.

Polyfenolové zlúčeniny majú schopnosť potláčať oxidáciu LDL. Oxidovaný LDL je hlavnou zložkou aterogénnych povlakov. Tvorba aterogénnych plakov v cievnych stenách vyúsťuje do kardiovaskulárných ochorení (CVD). Tento proces je v podstate zápalový a je indukovaný zápalovými cytokínmi TNF- α a IL-6. Chronická fáza kardiovaskulárných ochorení (tvorba aterogénnych plakov) môže vyústiť v akútnu fázu, teda trombotickú aktivitu (tvorba zrazenín) v miestach poškodenia ciev. CVD sú príkladom nežiadúceho zápalového procesu v organizme. Polyfenolové zlúčeniny sú účinnými prostriedkami v regulácii nežiadúcich zápalových aspektov vzniku CVD. Polyfenoly dokážu znižovať krvný tlak. Angiotenzín je oligopeptid v krvi, ktorý spôsobuje vazokonstrikciu a zvyšuje krvný tlak. Vzniká z prekursoru angiotenzinogénu účinkom špecifických enzýmov (angiotenzín-konvertujúcich enzýmov). Angiotenzín reguluje krvný tlak prostredníctvom renín-angiotenzínového systému. Niektoré nízkomolekulové prokynidíny majú schopnosť inhibovať aktivitu vyššie spomínaných špecifických enzýmov. Týmto spôsobom môžu polyfenoly vplyvať na znižovanie krvného tlaku. Zvýšená suplementácia kvercetínom pri experimentoch na zvieratách spôsobila zníženie krvného tlaku, normalizáciu koncentrácie glutatiónu, glutatiónpoxidázy a NO (cit.⁶¹).

Flavonoidy sú dôležité sekundárne metabolity rastlín, ktoré sú najčastejšou skupinou polyfenolov v ľudskej strave. Ich základnú štruktúru tvorí (C6-C3-C6) difenylpropán, najčastejšie sa vyskytujú vo väzbe so sacharidmi, teda tvoria glykozidy. Rôzne počty a polohy substituentov na kruhu C podmieňujú rozdelenie flavonoidov do tried (flavonoly, flavóny, flavany, flavanoly resp. katechíny, izoflavony, flavanonoly a antokyanidíny)⁶².

Tieto významné fytochemikálie vykazujú protizápalové, antioxidačné, hepatoprotektívne, antitrombotické, antikarcinogénne a ďalšie biologické účinky. Mnohé klinické štúdie popisujú pozitívne účinky flavonoidov pri prevencii, liečbe a zmierňovaní ochorení. Nedávne štúdie sa tiež zameriavajú konkrétne na úlohu flavonoidov v prevencii metabolického syndrómu a jeho hlavných tripartitných prispievateľov, t.j. diabetu, obezity a hypertenzie. Ukázalo sa, že pôsobia aj preventívne proti ateroskleróze, rakovine, artritíde a spomaľujú proces starnutia⁶².

Fytosteroly sú štrukturálne podobné cholesterolu, líšia

sa len v bočných reťazcoch metylovými a etylovými skupinami³³. Patria medzi triterpény, obsahujú tetracyklický kruh a postranný reťazec je viazaný na uhlík 17. Na základe prítomnosti resp. neprítomnosti dvojitej väzby na uhlíku 5 sa delia na steroly a stanoly. Vyskytujú sa vo voľnej alebo esterifikovanej forme⁶³. Medzi najznámejšie fytosteroly zaraďujeme kampesterol, sitosterol a stigmasterol. Vyznačujú sa širokou škálou biologických účinkov. Majú protizápalové, antikarcinogénne, antioxidačné vlastnosti a schopnosť znižovať hladinu LDL aj celkového cholesterolu v krvi, inhibujú absorpciu cholesterolu z črevného lumenu^{55,64}. Ďalší známy fytosterol je sitostanol. Je to úplne nasýtený rastlinný sterol, ktorý pôsobí ako inhibítor absorpcie cholesterolu v čreve. Považuje sa za najefektívnejší v redukcii množstva plazmatického cholesterolu zo všetkých fytosterolov⁶⁵.

Sú tiež prekursori steroidných hormónov. Ich schopnosť znižovať hladinu cholesterolu v krvi nesúvisí iba s inhibíciou absorpcie cholesterolu v tenkom čreve, ale aj s ich schopnosťou ovplyvniť metabolizmus cholesterolu v pečeni a v čreve⁶⁶.

4. Záver

Cereálie predstavujú bohatý zdroj zdraviu prospešných substancií. Funkčné zložky cereálií, ku ktorým patria vitamíny, minerálne a antioxidačne aktívne zlúčeniny, vláknina, β -glukány a v neposlednom rade rezistentné škroby sú objektom záujmu mnohých štúdií odborníkov v oblasti cereálnej chémie, výživy, diabetológie a iných príbuzných odborov. Výsledky týchto štúdií poukazujú na výrazne pozitívny fyziologický účinok menovaných zložiek cereálií. U viacerých zložiek bol preukázaný zdraviu prospešný efekt, ktorý súvisel predovšetkým so znižovaním rizika rozvoja kardiovaskulárných ochorení, diabetu 2. typu, obezity či karcinogénnych ochorení. Mechanizmy účinku nie sú však v niektorých prípadoch úplne objasnené. Odporúčania svetových zdravotníckych, výživarských, diabetologických organizácií smerujú k zvýšeniu konzumácie predovšetkým celozrnných cereálií. Pozorujeme aj zvýšený záujem o vývoj a produkciu nových funkčných potravín na cereálnej báze tak ako vo vedeckej oblasti, čoraz viac aj komerčnej sfére. Tento trend zvýšeného záujmu o cereálie a ich funkčné zložky môžeme hodnotiť ako veľmi pozitívny z hľadiska výživy a ľudského zdravia.

LITERATÚRA

1. Gajdošová A., Šturdík E.: *Nova Biotechnol.* 2004, 133.
2. Fletcher R. J. (ed.): *Encyclopedia of Grain science*, str. 4878, 2. vyd. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
3. Prado F. C., Parada J. L., Pandey A., Soccol C. R.: *Food. Res. Internat.* 41, 111 (2008).
4. Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S. S., Webb C.: *Int. J. Food. Microbiol.* 79, 131 (2002).

5. Wrigley C. (ed.): *Encyclopedia of Grain science*, str. 187, 2. vyd. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
6. Holubková A.: *Projekt dizertačnej práce*. Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Bratislava 2012.
7. De Moura F. F.: *Whole grain intake and cardiovascular disease and whole grain intake and diabetes*. Life Sciences Research Office, Maryland 2008.
8. Kamal-Eldin A., Laerke H. N., Knudsen K. E. B., Lampi A. M., Pironen V., Katina K., Poutanen K.: *Food Nutr. Res.* 53, 1 (2009).
9. Lang R., Jebb S. A.: *Encyclopedia of Human Nutrition*, str. 427, 2. vyd. Elsevier Academic Press, Oxford 2005.
10. Corke H. (ed.): *Encyclopedia of Grain science*, str. 30. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
11. Evers T., Millart S.: *J. Cereal Sci.* 36, 261 (2002).
12. Welch R. W.: *Encyclopedia of Human Nutrition*, str. 346, 2. vyd. Elsevier Academic Press, Oxford 2005.
13. Jacobs D. R., Gallaher D. D.: *Curr. Sci.* 6, 415 (2004).
14. Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y.: *Food Microbiol.* 27, 1 (2010).
15. Topping D.: *J. Cereal. Sci.* 46, 220 (2007).
16. Vitaglione P., Napolitano A., Fogliano V.: *Trends Food Sci. Technol.* 19, 451 (2008).
17. Cui S. W., Wang Q.: *Struct. Chem.* 20, 291 (2009).
18. Michálik I., Gálová Z.: *Výživa a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*, str. 67. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra 2006.
19. Kocková M., Valík E.: *Potravinárstvo* 5, 27 (2011).
20. Šramková Z., Gregová E., Šturdík E.: *Acta Chimica Slovaca* 2, 115 (2009).
21. Day L.: *Encyclopedia of Grain science*, str. 157. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
22. Becker R.: *Fatty Acids in Food and their Health Implications*, str. 303. CRC Press, Seattle 2006.
23. Cordain L.: *World Rev. Nutr. Diet.* 84, 19 (1999).
24. Asp E.: *Encyclopedia of Grain science*, str. 340. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
25. Mullerová D.: *Klinická diabetologie*, str. 27. Grada, Praha 2008.
26. Liebendzinska A., Szefer P.: *Food Chem.* 95, 116 (2006).
27. Asp E.: *Encyclopedia of Grain science*, str. 354. Elsevier Academic Press, Oxford 2004.
28. Mudgil D., Barak S.: *Int. J. Biol. Macromol.* 61, 1 (2013).
29. Marlett J. A., MCBurney M. I., Slavin J. L.: *J. Am. Diet. Assoc.* 102, 993 (2002).
30. Liu S., Willet W. C., Manson J. E., Hu F. B., Rosner B., Colditz G.: *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 920 (2003).
31. Rodriguez R., Jiménez A.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 3 (2006).
32. Banerjee P. K., Rimm E. B.: *Proc. Nutr. Soc.* 62, 25 (2003).
33. Slavin J. L.: *J. Am. Diet. Assoc.* 101, 780 (2001).
34. Johnson I. T.: *Encyclopedia of Human Nutrition*, str. 572, 2. vyd. Elsevier Academic Press, Oxford 2005.
35. Denis L.: *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 1 (2007).
36. Topping D. L., Cobiac L.: *Encyclopedia of Human Nutrition*, str. 578, Elsevier Academic Press, Oxford 2005.
37. Dashti B., Al-Awadi F., Khalafawi M. S.: *Food Chem.* 83, 557 (2003).
38. Wood B. J. B. (ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, str. 151, Elsevier Applied Science, London 1992.
39. Rakická M., Šturdík E., Marko A.: *Acta Chimica Slovaca* 6, 256 (2013).
40. Havrlentová M., Kraic J.: *J. Food Res. Nutrit.* 45, 97 (2006).
41. Ullmius M., Adapa S., Onning G., Nilsson L.: *Food Chem.* 130, 536 (2012).
42. Ostman E. E., Larsson R. H., Brighenti F., Bjojck I.: *J. Cereal Sci.* 43, 230 (2006).
43. Wood J. P.: *Carbohydr. Polym.* 25, 331 (1994).
44. Tappy L., Gugolz E., Wursch P.: *Diabetes Care* 19, 831 (1996).
45. Cavallero A., Empilli S., Brighenti F.: *J. Cereal. Sci.* 36, 59 (2002).
46. Anderson J. W., Spencer D. B., Hamilton C. C. Smith S. F., Tietyen J., Bryant C. A., Oeltgen.: *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 495 (1990).
47. Wood P. J., Weisz J., fedec P., Burrows V. B.: *Cereal Chem.* 66, 97 (1989).
48. FDA : 21 CFR Part 101. Food labeling, health claims: soluble dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. *Federal Register.* 62, str. 3584 (1997).
49. Englyst H. N., Kingman J. H., Cummings.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, 33 (1992).
50. Salijata M. G., Singhal R. S., Kulkarni P. R.: *Compr. Rev. Food Sci.* 5, 1 (2006).
51. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantshitohaina R.: *Free Radical Res.* 40, 1054 (2006).
52. Surh Y. J.: *Food Chem. Tox.* 40, 1091 (2002).
53. Surh Y. J., Chun K. S., Cha H. H.: *Mutat. Res.* 48, 243 (2001).
54. Vollmannová A., Tomáš J., Tóth T.: *Výživa a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*, str. 41, Slovenské poľnohospodárska univerzita, Nitra 2006.
55. Liu R. H.: *J. Cereal. Sci.* 46, 207 (2007).
56. Naczki M., Shadiky F.: *J. Chromatogr. A* 1054, 95 (2004).
57. Basu A., Fu D. X., Wilkinson M., Simmons B., Wu M., Betts N. M., Du M., Lyons T. J.: *Nutr. Res.* 30, 462 (2010).
58. Gnanamani A., Sudha M., Deepa G.: *Chemosphere* 72, 1321 (2008).
59. Moure A., Cruz J. M., Franco D., Domingues J. M., Sineiro J., Domingues H., Nunes M. J., Parajó J. C.: *Food Chem.* 72, 145 (2001).
60. Awika J. M., Rooney L. W.: *Phytochemistry* 65, 1199 (2004).
61. Stevenson D. E., Hurst R. D.: *Cell. Mol. Life Sci.* 64,

- 2900 (2007).
62. Prasain J. K., Carlson S. H., Wyss J. M.: *Maturitas* 66, 163 (2010).
63. Marangoni F., Poli A.: *Pharmacol. Res.* 61, 193 (2010).
64. Ryan E., Galvin K., O'Connor T. P., Maguire A. R., O'Brien N. M.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 85 (2007).
65. Krys-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanone A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. E., Etherton T. D.: *Am. J. Med.* 113, 71 (2002).
66. Moghadasian M. H., Frohlich J. J.: *Am. J. Med.* 107, 588 (1999).
67. E. Šárka, P. Smrčková, L. Seilerová: *Chem. Listy* 107, 929 (2013).

A. Marko, M. Rakická, and E. Šturdík
(*Department of Nutrition and Food Analysis, Slovak Technical University, Bratislava*): **Cereal Functional Components in the Prevention of Lifestyle Diseases**

Many studies observed that increased consumption of cereal grains is associated with a reduced incidence of lifestyle diseases. Cereals are a rich source of functional compounds including dietary fibers, β -glucans, resistant starches, vitamins, minerals and other bioactive phytochemicals, therefore they are suitable and increasingly used raw materials for production of functional foods.

ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

ANETA LARYŠOVÁ^{a*}, LENKA ENDLOVÁ^{a,b,c},
VIKTOR VRBOVSKÝ^{b,c}
a ZUZANA NAVRÁTILOVÁ^a

^a Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta,
Katedra chemie, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ^b OSEVA
VÝVOJ A VÝZKUM s.r.o., Hamerská 698, 756 54 Rožnov-
Zubří, ^c OSEVA PRO s.r.o., Purkyňova 10, 747 43 Opava
Aneta.la@seznam.cz

Došlo 12.12.14, přijato 29.1.15.

Klíčová slova: mák, makovina, morfin, alkaloidy,
extrakce, HPLC, validace

Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je plodina, která nachází své uplatnění zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu^{1,2}. Česká republika patří v současnosti společně s Tureckem k nejvýznamnějším evropským pěstitelům máku setého a v oblasti konzumního máku náleží k největším světovým producentům. V ČR se pěstuje výhradně mák setý semenného (olejného) typu. Z agrobiologického hlediska se jedná o jednoletou jarní plodinu. V zanedbatelné míře se u nás pěstuje také ozimá forma^{3,4}.

V ČR pěstované odrůdy máku jsou primárně určeny k produkci semene pro konzumní účely. Semeno se vyznačuje velmi dobrými dietetickými vlastnostmi. Hlavní složkou je olej (46 až 50 % sušiny), ve kterém dominuje kyselina linolová (60–70 %). Dietetické vlastnosti makového oleje se proto podobají oleji slunečnicovému. Semena mimo jiné obsahují tokoferoly, kyselinu pantotenovou, niacin, thyamin a mimořádně vysoký obsah vápníku³ (1400 mg ve 100 g).

Vedlejším produktem výroby makového semene je makovina, která obsahuje opiové alkaloidy. Význam alkaloidů pro rostlinu není jednoznačný, předpokládá se, že vznikly v důsledku obranných mechanismů rostlin proti býložravcům či parazitům nebo mohou být též odpadními látkami. Biosyntéza alkaloidů je pro rostlinu energeticky náročná a vyžaduje účast specifických enzymů^{5,6}. Tato

biosyntéza není kontinuální a probíhá v metabolicky aktivních pletivech; jednotlivé alkaloidy se tvoří postupně během vývinu rostliny. Nejdříve se tvoří kodein, thebain a noskapin, později pak morfin, narkotolin a papaverin³.

Makovina, jakožto u nás prakticky jediný zdroj morfinu a dalších alkaloidů, je farmaceutickými společnostmi vykupována a dále využívána pro medicínské účely. Obecně je definována jako zralá nadzemní část rostliny máku kromě semen (této definici odpovídá také pojem „maková sláma“), nicméně v pěstitelské praxi je makovina chápána jako směs podrcených vyzrálých tobolek a částí stonků pod tobolkou dlouhých asi 15 cm (cit.^{7–10}). V druhé polovině minulého století byla makovina vykupována bez větších nároků na kvalitu. Postupně však došlo k vytvoření normovaných jakostních ukazatelů pro výkup a hodnocení. Pěstitelé na tyto nároky okamžitě zareagovali a kvalita makoviny tak razantně stoupla. Při výkupu je makovina hodnocena z několika hledisek a musí být zdravá, suchá, bez plísni a škůdců, hnědožluté barvy se světlejším nebo tmavším odstínem, sklizená v období biologické zralosti. Ze současného sortimentu registrovaných odrůd je k produkci makoviny nejvhodnější odrůda Opal a především Orbis^{11–13}.

Obsah morfinu v makovině je nejvíce ovlivněn genetickým základem odrůd, značně pak průběhem počasí za vegetace a dále agronomickými zásahy¹⁴ (výživa, ochrana, technologie sklizně). Nejúčinnějším nástrojem, jak obsah morfinu v makovině cíleně ovlivňovat, je proto šlechtění, tedy tvorba odrůd s definovanou kvalitou. Hodnocení obsahu morfinu v makovině je důležitou součástí registračního řízení v rámci procesu povolování odrůd Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ).

S obsahem morfinu v máku souvisí legislativní opatření, mající zamezit jeho možnému zneužití k výrobě omamných a návykových látek. První z nich je tzv. ohlašovací povinnost (podle zákona č. 167/1998 Sb. o návykových látkách) pro osoby pěstující mák na ploše větší než 100 m² (§ 29) a specifikace při vývozu a dovozu makoviny (§ 25 a § 30). Novým opatřením je stanovení limitního obsahu morfinu, který je definován novelou uvedeného zákona (vstoupila v platnost dne 1. 1. 2014). Podle § 24 písmena c již nebude možné pěstovat odrůdy máku setého, které mohou v sušině z tobolek obsahovat více než 0,8 % morfinu. Tento limit bude promítnut do registračního řízení ÚKZÚZ při povolování nových odrůd^{8,15}. Tímto sledování obsahu morfinu v makovině během šlechtitelského procesu nabývá na ještě větší významnosti.

Na stanovení alkaloidů se používá celá řada metod. Z těch nejvýznamnějších to je tenkovrstvá chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, polarografie, chirální separace, micelární kapalinová chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie, iontově výměnná chromatografie, kapilární elektroforéza, plynová chroma-

*Aneta Laryšová získala za tuto práci 2. místo v celostátní soutěži o Cenu firmy Merck 2014 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Pardubicích 5. a 6. února 2014.

tografie a Ramanova spektroskopie^{16–21}. Nejčastěji používanou metodou stanovení alkaloidů v makovině je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV nebo MS detekcí. Uvedené metody se liší způsoby extrakce a čistícími kroky^{22–26}. Jako účinný krok přípravy vzorku k analýze se také prokázalo přečištění extraktu pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE)^{8,27,28}.

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci alkaloidů z makoviny a jejich stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV/VIS detekcí. Vyvinutá metodika byla validována pro stanovení obsahu morfinu, jakožto nejvýznamnějšího alkaloidu určujícího kvalitu makoviny⁸. Metodika byla poté využita k hodnocení obsahu alkaloidů při šlechtění máku setého ve firmě OSEVA PRO s.r.o.

Experimentální část

Vzorky

K experimentálním účelům byly použity tobolky máku setého. Rostlinný materiál byl získán od šlechtitelské firmy OSEVA PRO s.r.o., která je současně kurátorem genové kolekce olejnin v rámci Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Bylo vybráno deset odrůd máku setého lišících se koncentracemi alkaloidu morfinu v makovině. Jednalo se o odrůdy modrosemenné a bělosemenné, které jsou rozdílné také geografickým původem, barvou květu, výškou rostliny, vegetační dobou a dalšími agrobiologickými vlastnostmi. Odrůdy máku setého byly pěstovány v polních maloparcelních pokusech realizovaných firmou OSEVA PRO s.r.o., vzorky tobolek pocházely z pokusů sklizených v roce 2013. Pro analýzu bylo použito maximálně 7 tobolek máku z rostlin od každé odrůdy vysušené na 6% vlhkost. Při odběru rostlinného materiálu byla tobolka máku odlomena od stonku v kolénku, dále byla odříznuta blizna a semeno máku bylo vysypáno. Vzorky tobolek včetně blizny (tzv. makovina v užším slova smyslu) byly jemně namlety na laboratorním mlýnku TUBE-MILL control (IKA, Německo) na práškový vzorek a přesety přes síto o velikosti ok 0,5 mm.

Použité chemikálie

Pro přípravu vzorků a SPE izolaci byly použity: octová kyselina 99,8% p.a., amoniak 25% p.a., kyselina chlorovodíková 35–36% p.a., methanol p.a. (Fisher Scientific, ČR). K přípravě mobilní fáze byly použity: acetonitril a methanol pro HPLC, ledová octová kyselina 100% ch.č., triethylamin GC ≥ 99,5 % (vše Sigma-Aldrich, Německo). Deionizovaná voda byla připravena systémem Aqua Max – Ultra 370 (Younglin, Korea). Ke stanovení alkaloidů, optimalizaci separace a validaci byly použity standardy pentahydrát sulfidu morfia, sulfát kodeinu, hydrochlorid papaverinu, thebainu a noskapinu (HPLC nebo TLC ≥ 98 %; vše Sigma-Aldrich, Německo). Zásobní standardní

roztoky alkaloidů o koncentraci 1 mg ml⁻¹ (morfin, kodein, thebain), 0,125 mg ml⁻¹ (papaverin, noskapin) byly připraveny rozpuštěním v methanolu a uloženy při 4 °C. Z uvedených zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky alkaloidů. Rozsahy koncentrací jednotlivých roztoků alkaloidů pro kalibraci v µg ml⁻¹ byly následující: morfin 4–500, kodein 1–50, thebain 0,1–8, papaverin 0,5–20, noskapin 0,5–10.

Příprava vzorků a SPE izolace

50 mg mletého rostlinného materiálu bylo smícháno s 5 ml 5% octové kyseliny v centrifugační zkumavce, která byla vložena na 30 min do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla, ČR). Poté se vzorek třepal 1 min v třepačce TE III (Chirana, ČR) při laboratorní teplotě a celý objem vzorku byl centrifugován odstředivkou K 2015 (Centurion Scientific Ltd., Velká Británie) po dobu 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt byl přečištěn extrakcí na pevné fázi (SPE) na vakuovém manifoldu Mediawax-12 (Labicom, ČR). K SPE izolaci byly vybrány na základě dat z literatury^{8,27} 3 typy kolonek CHROMABOND HR-XC 200 mg/3 ml (Macherey-Nagel, Německo), Strata-X-C 100 mg/3 ml (Phenomenex, USA) a Discovery DSC-MCAX SPE tube 300 mg/3 ml (Supelco, USA). Kolony byly kondicionovány 3 ml methanolu a ekvilibrovány 3 ml ultračisté vody. Na kolonku byly následně naneseny 3 ml extraktu, byly promyty 2 ml 0,1 M HCl a 2 ml methanolu. Eluce byla provedena dvakrát 2 ml směsi (5% amoniak v methanolu). Eluát byl zahuštěn a zbytek rozpouštědel odpařen na rotační vakuové odparce RV 8 (IKA, Německo). Odparky byly rozpuštěny ve 3 ml methanolu a 3 min sonifikovány. Takto připravené vzorky byly použity k chromatografické analýze. Každý vzorek byl připraven dvakrát.

Chromatografické podmínky

Chromatografické analýzy byly provedeny na přístroji Agilent 1200 (Agilent, USA). Systém je vybaven kvarterním gradientovým čerpadlem, vakuovým odplyňovačem, automatickým dávkovačem vzorků s nástřikovým blokem, programovatelným termostatem kolon a dvěma detektory (UV/VIS a fluorescenčním). Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit program ChemStation. Analýzy byly provedeny na koloně Ascentis Expres F5 (5 µm, 150 mm × 4,6 mm I. D., Supelco, USA), mobilní fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu a mobilní fáze B pak směs acetonitril : ledová octová kyselina: triethylamin (97,9:2:0,1, v/v), průtok 1 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 50 µl, vlnová délka 284 nm, délka analýzy 30 min a max. tlak 350 bar.

Validate

Byly stanoveny následující parametry: linearita, správnost, opakovatelnost, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ), citlivost a robustnost metody.

Výsledky a diskuse

Extrakce alkaloidů a čištění vzorku

Při zpracování rostlinné matrice se vycházelo z popsaného postupu^{8,27}. Podle potřeby byly jednotlivé kroky modifikovány pro námi použitou instrumentaci. Při izolaci alkaloidů z makoviny byly testovány různé koncentrace octové kyseliny v koncentračním rozmezí 1–10 %. Dále byl testován vliv délky trvání extrakce octovou kyselinou v ultrazvukové lázni na celkovou výtěžnost alkaloidů. Pro ověření byly zvoleny doby 15, 30 a 60 min. K čištění extraktu byly vybrány SPE kolony se silně kyselým katexem pro výměnu bazických analytů. U všech typů kolonek byla sledována výtěžnost alkaloidu morfinu a také reprodukovatelnost extrakčního procesu. Výtěžnost metody byla zjištěna metodou přidavku externích standardů. Ke vzorku extrakčního činidla bylo přidáno známé množství standardu morfinu (30; 90; 140 μ l) o koncentraci 1 mg ml⁻¹. Stanovení výtěžnosti bylo provedeno třikrát. Všechny výše uvedené kolony měly hodnoty výtěžností velmi podobné v rozmezí 96–98 %. Byl studován vliv objemu elučního činidla na výtěžnost morfinu. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při použití 5% amoniaku v methanolu. Jako nejvhodnější pro další práci byla zvolena kombinace vzorku rozpuštěného v 5% octové kyselině, délka extrakce alkaloidů 30 min v ultrazvukové lázni, kolony Chromabond HR-XC 200 mg/3 ml a 5% roztoku amoniaku jako elučního činidla.

Chromatografické stanovení

Důležitým krokem při vývoji chromatografické separace bylo stanovení nejvhodnějšího složení mobilní fáze při použití kolony Ascentis Expres F5, 5 μ m, 150 mm $\times$

4,6 mm. Byla použita gradientová eluce a byl sledován vliv přidavku triethylaminu, ledové octové kyseliny a rostoucí koncentrace acetonitrilu na separaci alkaloidů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití gradientového programu uvedeného v tab. I. Eluční pořadí jednotlivých alkaloidů bylo v našich experimentálních podmínkách s použitou stacionární fází následující: morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin (obr. 1).

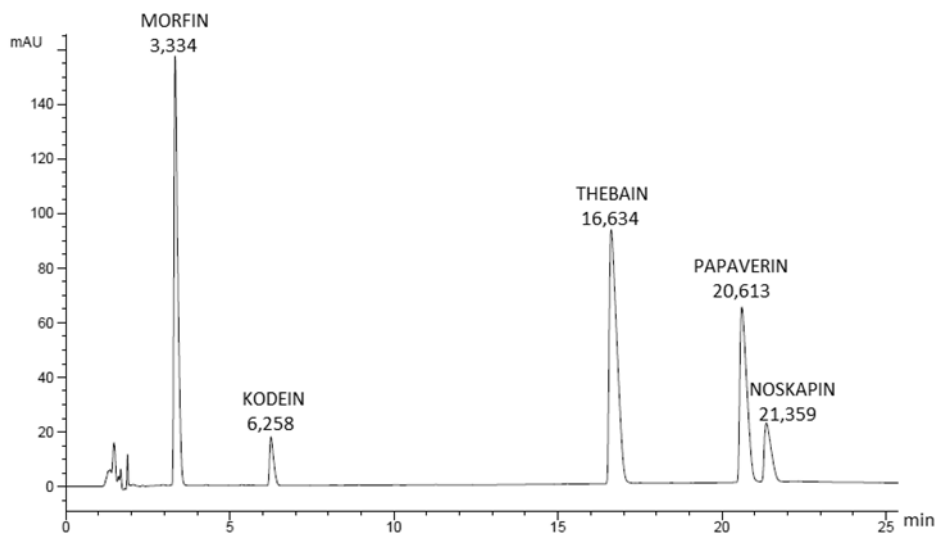
Validace metody

Byla provedena validace metody pro stanovení obsahu morfinu v makovině a softwarovým programem Effi Validation 3.0 byly stanoveny validační parametry. Získané hodnoty validačních parametrů jsou shrnuty v tab. II. Pro zjištění opakovatelnosti byly vybrány 3 vzorky makoviny obsahující různé množství morfinu, tak aby pokrývaly požadovaný rozsah běžných koncentrací morfinu v makovině. Vybrané vzorky byly v osmi opakováních vždy extrahovány příslušným postupem a analyzovány na HPLC. Opakovatelnost analytické metody je 4,63 %. V současné době neexistuje dostupný CRM makoviny

Tabulka I

Gradientový program pro separaci alkaloidů

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	90	10
5	85	15
10	80	20
20	65	35
30	90	10



Obr. 1. Chromatogram standardu alkaloidů. Standard morfinu, kodeinu, thebainu, papaverinu a noskapinu. Kolona Ascentis Express F5, MF A: 5% acetonitril, MF B: acetonitril : ledová octová kyselina: triethylamin = 97,9 : 2 : 0,1, 1 ml min⁻¹, UV/VIS detekce, 284 nm

Tabulka II

Validační parametry stanovení morfinu v makovině pomocí HPLC s UV/VIS detekcí

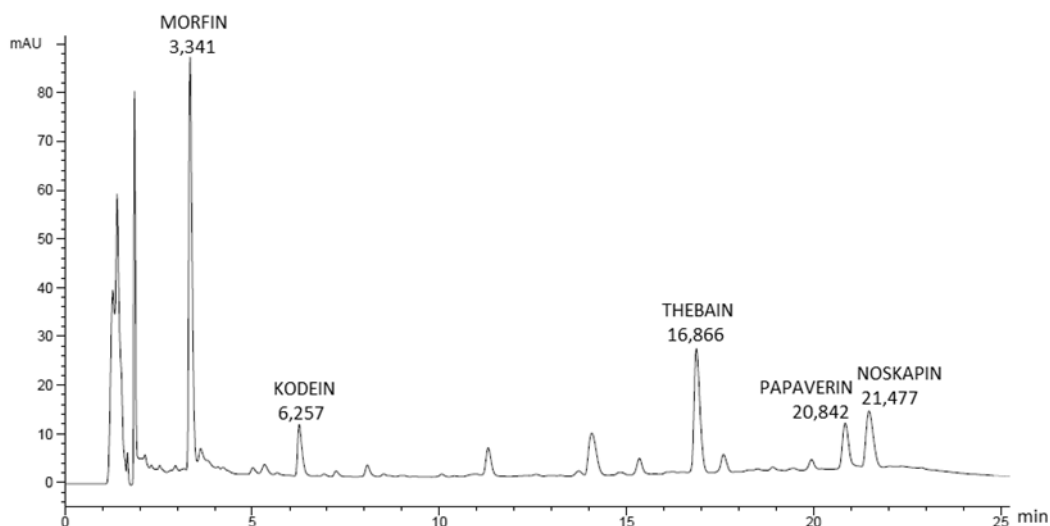
Parametr	Hodnota
Linearita	korelační koeficient
	0,9998
Meze	koeficient QC, %
	2,54
Meze	LOD, $\mu\text{g ml}^{-1}$
	1,275
Opakovatelnost, %	LOQ, $\mu\text{g ml}^{-1}$
	4,215
Citlivost, $\mu\text{g ml}^{-1}$	
	4,63
Výtěžnost, %	
	1,2
Výtěžnost, %	
	95,83–101,053

případně máku s deklarovaným obsahem morfinu. Proto byla správnost metody vyjádřena jako výtěžnost a byl použit standard morfinu, jehož známé množství bylo analyzováno vyvinutou metodou. Analyzovaná řada modelových vzorků byla připravena na třech koncentračních hladinách, pokrývala celý požadovaný rozsah a dané standardy byly analyzovány celkem třikrát. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 95,83–101,05 %. LOD a LOQ byly vyjádřeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek šumu základní linie. LOD pro stanovení obsahu morfinu v makovině je $1,28 \mu\text{g ml}^{-1}$ (0,013 %) a LOQ je $4,22 \mu\text{g ml}^{-1}$ (0,043 %). Linearita byla demonstrována korelačním koeficientem a koeficientem QC z lineární regrese závislosti plochy piků standardů morfinu na koncentračních úrovních mezi LOQ a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$. Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního koeficientu (0,9998) a koeficientu QC (2,54 %). Ze směrnice kalibrační přímky byla vyhodnocena citlivost metody, která je $1,20 \mu\text{g morfinu ml}^{-1}$. Minimální rozdíl v koncentraci, kterou lze rozlišit, činí $0,194 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Byla testována robustnost metody vůči 4 faktorům. Byl sledován vliv doby extrakce, koncentrace extrakčního činidla, počátečních podmínek gradientu a teploty na kolo-ně. Výsledky ukazují pouze malou změnu retenčních časů a ploch piků a tím prokazují vysokou robustnost prezentované metody vůči všem testovaným faktorům, která je požadována při rutinním využití pro stanovení morfinu ve šlechtitelské praxi.

Výsledky měření

10 vzorků makoviny různých odrůd máku setého bylo analyzováno na obsah alkaloidů. Identifikace alkaloidů ve vzorcích byla provedena porovnáním retenčních časů a spekter se standardy. V chromatogramech vzorků bylo identifikováno celkem pět alkaloidů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapi (obr. 2). Kvantifikace alkaloidů byla provedena metodou vnějších standardů s využitím kalibračních křivek. Byly připraveny kalibrační řady jednotlivých stanovovaných alkaloidů tak, aby obsahy alkaloidů v neznámých vzorcích spadaly do rozsahu kalibračních řad. Kalibrační křivka každého alkaloidu byla vynesena jako závislost plochy piků na koncentraci standardu. Vyvinutou metodou bylo stanovení alkaloidů ve vzorcích makoviny provedeno paralelně a interpretované výsledky vyjádřené v hm.% jsou průměrem těchto dvou stanovení (tab. III). U nově vyvinuté metody byla sledována stabilita připravených vzorků v různých časových intervalech (tab. IV). Stabilita byla zjišťována opakovanými analýzami při uchovávání vzorků v temnu a při 4°C . Testováním stability vzorku bylo prokázáno, že je vzorky možné uchovávat po dobu 2 týdnů při 4°C , aniž by docházelo k významným změnám obsahu morfinu.



Obr. 2. Chromatogram vzorku makoviny. Kolona Ascentis Express F5, MF A: 5% acetonitril, MF B: acetonitril : ledová octová kyselina: triethylamin = 97,9 : 2 : 0,1, 1 ml min⁻¹, UV/VIS detekce, 284 nm

Tabulka III

Stanovený obsah opiových alkaloidů ve vzorcích makoviny

Laboratorní číslo vzorku	Obsahy opiových alkaloidů [hm.%]				
	morfin	kodein	thebain	papaverin	noskapin
559	0,04	0,01	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
3977	0,16	0,03	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
654	0,28	0,10	0,01	0,02	0,03
591	0,39	0,06	pod LOQ	0,01	0,04
641	0,44	0,08	pod LOQ	0,10	0,03
6087	0,55	0,17	0,01	pod LOQ	0,03
6084	0,66	0,19	0,01	pod LOQ	0,02
628	0,83	0,17	pod LOQ	pod LOQ	0,01
6089	0,95	0,14	0,06	0,01	0,02
551	1,47	0,35	0,05	pod LOQ	0,02

Tabulka IV

Testování stability vzorků makoviny připravených k analýze na HPLC

Laboratorní číslo vzorku	Obsah morfinu [hm.%]				
	1. den	2. den	týden	dva týdny	průměr
591	0,40	0,41	0,41	0,42	0,41
6089	1,01	1,00	0,99	0,97	0,99

Závěr

Byla vyvinuta analytická metoda pro společné stanovení hlavních alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K výhodám metody patří zejména jednoduchá izolace alkaloidů z makoviny, relativně krátký čas analýzy a stanovení nejvýznamnějších alkaloidů v máku setém. Byly navrženy a validovány optimální chromatografické podmínky a postup pro přípravu vzorků zahrnující extrakci na pevné fázi. V rámci testovaných validačních parametrů byla pro stanovení obsahu morfinu ověřena opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti a robustnost. Nalezené limity detekce a kvantifikace jsou srovnatelné s údaji v literatuře⁸. Metoda byla aplikována na reálné vzorky makoviny ze sklizně roku 2013. Výsledky prokázaly, že je možné vyvinutou metodu využívat jako rutinní, spolehlivou a přesnou metodu pro stanovení kvality makoviny při šlechtění máku setého.

Výsledky byly získány v souvislosti s řešením projektu č. TA01010375 „Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého“ (2011–2014), který byl realizován za finanční spolupráce Technologické agentury České republiky.

LITERATURA

- Schulzová V., Hajšlová J.: *Toxické alkaloidy v potravině řetězci člověka*. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí. Veřejný dokument. Praha 2007.
- Singh D. V., Prajapati S., Bajpai S., Verma R. K., Gupta M. M., Kumar S.: J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 23, 1757 (2000).
- Vašák J.: *Mák*. Powerprint, Praha 2010.
- Baranyk P., Balík J., Hájková M., Havel J., Kazda J., Lošák T., Málek B., Markytán P., Plachká E., Richter R., Soukup J., Stražil Z., Šaroun J., Škeřík J., Šmirous P., Štráns P., Volf M., Vrbovský V., Zehnálek P., Zelený V.: *Olejniny*. Profi Press, Praha 2010.
- Moravcová J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Interní studijní pomůcka. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha 2006.
- Zenk M. H., Juenger M.: Phytochemistry 68, 2757 (2007)
- Prugar J.: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha 2008.
- Kabátová N., Šulová R.: *Bulletin Národní referenční laboratoře XVII 2013/1*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2013.
- Bechyně M., Kadlec T., Vašák J. a kol.: *Mák*. Semafor, Praha 2001.

10. Cihlár P., Vašák J., Kosek Z., Zukalová H.: *Konference Řepka a Mák, Praha, 5.2.2004*, Sborník referátů (Brixí J., ed.), str. 121. ČZU, Praha 2004.
11. Zukalová H., Cihlár P., Vašák J.: *Konference Prospeřující olejniny, Větrný Jeníkov, 14.12.2006*, Sborník referátů (Capouchová I., ed.), str. 105. ČZU, Praha 2006.
12. Zehnálek P.: *Úroda* 5, 51 (2014).
13. Lachman J., Hejtmánková A., Miholová D., Kolihová D., Tluka P.: *Plant Soil Environ.* 52, 282 (2006).
14. Zukalová H., Cihlár P., Vašák J.: *Konference Prospeřující olejniny, Větrný Jeníkov, 13.12.2007*, Sborník referátů (Capouchová I., ed.), str. 93. ČZU, Praha 2007.
15. Zehnálek P.: *Seznam doporučených odrůd řepka olejka, sója. Přehled odrůd hořčice bílá, mák setý, len olejný a kmín. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad, Brno* 2014.
16. Stöckigt J., Scheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha I., Stöckigt D.: *J. Chromatogr. A* 967, 85 (2002).
17. Terenerry V. C., Wells R. J., Robertson J.: *J. Chromatogr. A* 718, 217 (1997).
18. Schulz H., Baranska M., Quilitzsch R., Schütze W.: *Analyst* 129, 917 (2004).
19. Pothier J., Galand N.: *J. Chromatogr. A* 1080, 186 (2005).
20. Popa D. S., Oprean R., Curea E., Freda N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 645 (1998).
21. Jelínek I., Gaš B., Zusková I., Nikličková E., Buben I.: *Chem. Listy* 91, 487 (1997).
22. Verma R. K., Uniyal G. C., Gupta M. M.: *Indian J. Pharm. Sci.* 52, 276 (1990).
23. Krenn L., Glantschinig S., Sorgner U.: *Chromatographia* 47, 21 (1998).
24. Pettitt B. C., Damon C. E.: *J. Chromatogr. A* 242, 189 (1982).
25. Seidi S., Yamini Y., Heydari A., Moradi M., Esrafil A., Rezazadeh M.: *Anal. Chim. Acta* 701, 181 (2011).
26. Gómez-Serranillos P., Carretero E., Villar A.: *Fitoterapia* 2, 156 (1995).
27. Yoshimatsu K., Kiuchi F., Shimomura K., Makino Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 53, 1446 (2005).
28. Meng Q., Ch., Cepeda M. S., Kramer T., Zou H., Matoka D. J., Farrar J.: *J. Chromatogr. B* 742, 115 (2000).

A. Laryšová^a, L. Endlová^{a,b,c}, V. Vrbovský^{b,c}, and Z. Navrátilová^a (^a*Department of Chemistry, University of Ostrava*, ^b*OSEVA Development and Research Ltd., Rožnov-Zubří*, ^c*OSEVA PRO Ltd., Opava*): **Analysis of Alkaloids in Poppy Straw by High Performance Liquid Chromatography**

An analytic method was developed for the simultaneous determination of main alkaloids in poppy straw by HPLC. The optimal conditions and sample preparation were proposed and validated. The repeatability, regularity, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantitation, and robustness of the method were determined. The new method was applied to the real poppy straw samples from the 2013 harvest. The method can be used for a routine evaluation of poppy straw.

METODA PRO ANALÝZU ISOPROSTANŮ VE TKÁNI LOSOSA

MARTINA BOLECHOVÁ^{a,b},
JOSEF ČÁSLAVSKÝ^a, DANIELA MÁCOVÁ^a,
MILADA VÁVROVÁ^a a MARK TAGGART^c

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí,
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purky-
ňova 118, 612 00 Brno, ^b Ústřední kontrolní a zkušební
ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06 Brno, Česká repub-
lika, ^c Environmental Research Institute, North Highland
College, University of Highlands and Islands, Thurso,
Velká Británie
m.bolechova@centrum.cz

Došlo 6.1.14, přepracováno 17.2.14, přijato 23.5.14.

Klíčová slova: oxidativní stres, hmotnostní spektrometrie,
kapalinová chromatografie, isoprostany

Úvod

Oxidanty jsou látky zahrnující reaktivní kyslíkové formy (např. $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, H_2O_2), reaktivní dusíkové formy (např. NO_2 , $NO^{\bullet}$, N_2O_3) a další radikálové částice. V organismu se vytvářejí některými přirozenými procesy, jako jsou např. buněčné dýchání nebo fagocytóza. Jejich množství může být zvýšeno působením vnějších faktorů, kterými jsou např. těžké kovy, UV záření, xenobiotika, průmyslové znečištění životního prostředí nebo kouření. Hladina oxidantů v organismu je udržována v přirozených mezích působením antioxidační ochrany. Za normálního stavu se v organismu nacházejí oxidanty a antioxidy v rovnováze. Je-li tato rovnováha narušena a dojde ke zvýšení hladiny oxidantů, dochází k tzv. oxidativnímu stresu, který může způsobit až nevratné poškození biologicky důležitých molekul. Oxidanty mohou v organismu atakovat membránové lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, a proto je jejich působení spojováno s příčinou mnoha onemocnění vedoucích k rozvoji karcinogeneze nebo poškození nervového a kardiovaskulárního systému. U některých živočichů se dokonce projevují poškození, která jsou specifická pro přítomnost oxidativního stresu. Jedná se např. o blednutí korálů nebo úhyn raných vývojových stadií lososovitých ryb, uváděného v odborné literatuře pod názvem syndrom M74.

Oxidativní zatížení organismu lze monitorovat analytickými metodami, ve kterých jsou oxidanty sledovány přímo, nicméně existuje i řada metod, které využívají tzv. markery oxidativního stresu vznikající sekundárními reakcemi biomolekul napadených oxidanty. Přímá analýza oxidantů je komplikována jejich vysokou reaktivitou a nestabilitou, zatímco markery patří mezi stabilnější částice.

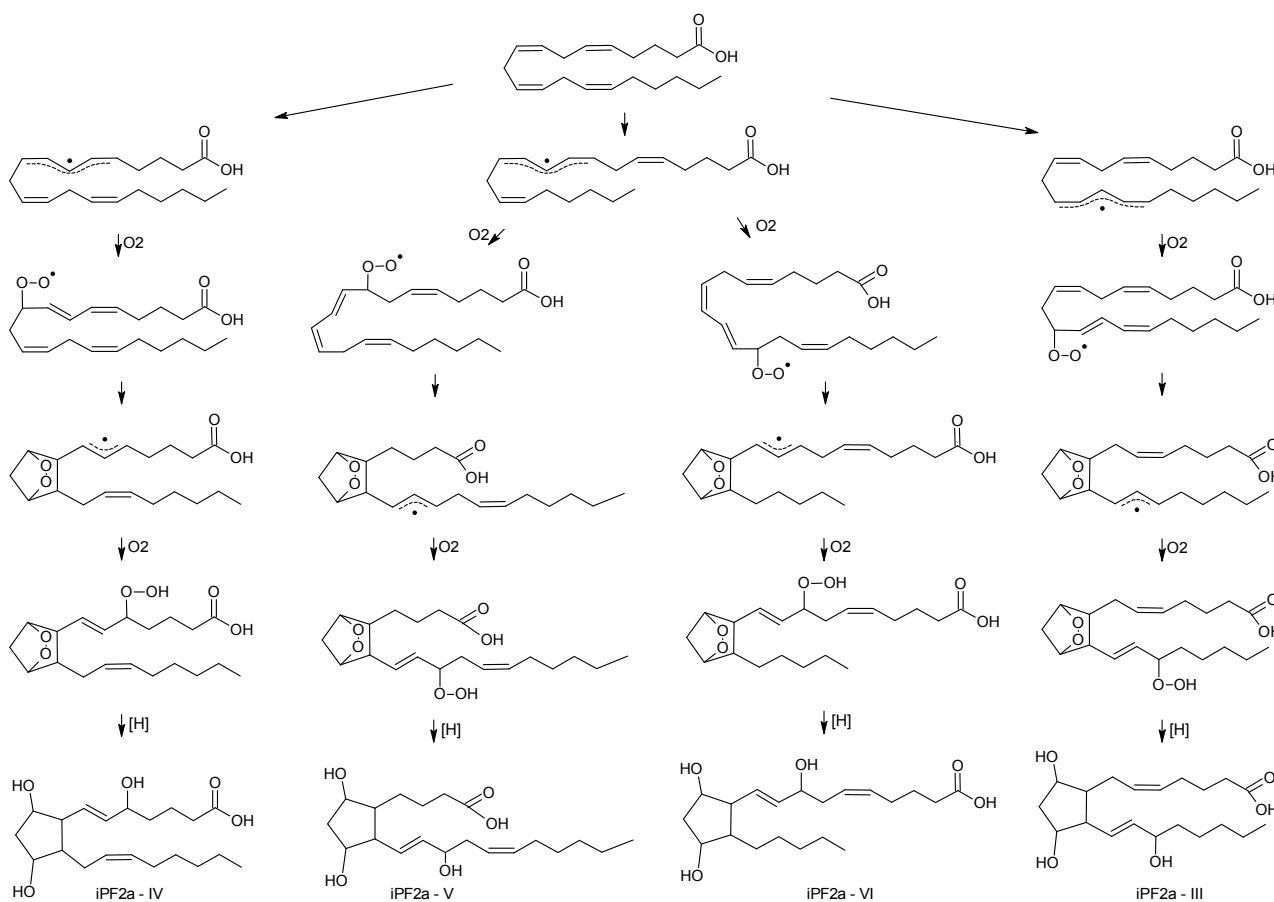
Pro účely hodnocení oxidativního stresu jsou často využívány metody sledující sekundární produkty zmiňované lipidní peroxidace. Těmito produkty jsou isoprostany, malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal. Protože se jedná o sloučeniny vyskytující se v organismu zcela přirozeně, srovnává se jejich hladina v organismu, kde je podezření na působení oxidativního stresu, s hladinou v organismu, který není oxidativním stresem zatížen. Čím větší je oxidativní stres, tím vyšší je hladina markerů v postiženém organismu.

Isoprostany jsou stabilní produkty neenzymatické oxidace polynenasycených mastných kyselin obsahujících ve své struktuře více než tři dvojné vazby. Jedná se o významné biomarkery oxidativního stresu¹. Jejich koncentrace mohou být sledovány v biologických vzorcích moči^{2–6}, krevní plasmě^{2,5,6}, dechového kondenzátu^{1,7} nebo tkáni (mozek, játra, aj.)^{2–5,8}. Například z kyseliny arachidonové vzniká neenzymatickou oxidací 64 regio- a diastereo- isomerních isoprostanových forem čtyř různých typů isoprostanů (obr. 1)⁹.

Pro analýzu isoprostanů lze využít např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s fluorimetrickou^{10–12} nebo UV¹³ detekcí. Nicméně je zde nezbytné zavést derivatizační krok, který umožní dostatečně citlivou detekci analytů. Po vhodném derivatizačním kroku, kterým se získá stabilní těkavý produkt, může být pro analýzu isoprostanů použita i plynová chromatografie (GC)¹⁴. Hladina isoprostanů se např. v medicíně často určuje i alternativními imunologickými metodami, a to radioimunologickou (RIA)¹⁵ nebo imunoenzymatickou metodou (ELISA)^{16,17}. Takové techniky však nejsou obecně dostatečně citlivé a specifické v důsledku konkurenčních imunochemických reakcí. Jejich největší nevýhodou je stanovení pouze jedné formy analytu.

Vzhledem k rychlému vývoji na poli instrumentálních analytických technik byly zmíněné chromatografické metody postupně rozšiřovány o možnosti detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Výhodou této techniky je možnost sledování několika analytů v jedné analýze při současném zachování vysoké citlivosti detekce. Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí byla např. aplikována při sledování prostaglandinů, leukotrienů, tromboxanů a isoprostanů v lidské moči, plasmě a v jiných biologických vzorcích^{18–21}. Hmotnostní spektrometrie má v dané problematice své uplatnění zejména ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS)^{22–28}. V tomto uspořádání se často využívá tandemové hmotnostně spektrometrické detekce, která je vysoce citlivá a selektivní. Navíc zde odpadá nutnost derivatizace analytů, která je nezbytná při využití plynové chromatografie nebo kapalinové chromatografie s fluorescenční a UV detekcí.

Tato studie se zabývá vývojem vhodné metodiky pro sledování isoprostanů jako markerů oxidativního stresu ve vzorku lososí tkáně. Zahrnuje jednak optimalizaci podmínek přípravy vzorku tkáně pro následnou analýzu isoprostanů a samotnou optimalizaci podmínek kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Předmětem studie byl vývoj metody pro ana-

Obr. 1. Radikálová oxidace kyseliny arachidonové za vzniku čtyř typů isoprostanů⁹

lýzu isoprostanů vznikajících radikálovou oxidací arachidonové kyseliny. Vzniklých 64 regio- a diastereo- isomerních isoprostanových forem je rozděleno na typy iPF₂α-III, iPF₂α-IV, iPF₂α-V a iPF₂α-VI. Vzhledem k dostupnosti standardů byla metodika optimalizována pro tři zástupce, a to iPF₂α-III, iPF₂α-IV, a iPF₂α-VI.

Experimentální část

Pro následující experimenty byla využita rybí svalovina lososa obecného (*Salmo salar*).

Hydrolyza tkáně

Postup přípravy vzorku tkáně zahrnoval alkalickou hydrolyzu, neboť bylo zapotřebí získat informaci o celkovém množství isoprostanů, tedy volných, ale i vázaných, které jsou součástí fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán. Metoda pro hydrolyzu a následnou extrakci cílených analytů vycházela ze studií T. Sicilia, H. Li a M. Masoody^{4,5,8} a byla optimalizována pro podmínky

naší laboratoře. Tkáň lososa (350 ± 0,1 mg) byla hydrolyzována 1 ml 1 M KOH po dobu 50 min při 39 ± 2 °C s přídavkem 20 µl butylhydroxytoluenu (BHT), který zde plnil funkci antioxidantu. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml 1 M HCl a 2 ml 100 mM mravenčí kyseliny pro úpravu pH a vysrážení proteinů. Následovala centrifugace po dobu 10 min při 2400 g.

Extrakce tuhou fází

Ze 3,5 ml supernatantu po centrifugaci byly isoprostany izolovány extrakcí tuhou fází (SPE) pomocí kolonky Strata-X 33 µm s obrácenou fází na polymerním sorbentu (Phenomenex, USA) obsahující 200 mg sorbentu (pro 3 ml vzorku).

Kolonky byly kondicionovány 2 ml MeOH a následně promyty 2 ml vody. Po kvantitativním nanesení celkového objemu vzorku po centrifugaci byly kolonky promyty 2 ml vody a 2 ml směsí MeOH:voda (20:80; v/v). Isoprostany byly eluovány 3 ml methanolem, objem extraktu byl snížen na 0,2 ml pod proudem dusíku. Po filtraci byl vzorek připraven pro následnou LC-MS/MS analýzu.

LC-MS/MS analýza isoprostanů

Chromatografická separace probíhala na ultraúčinném kapalinovém chromatografu Acquity TM (Waters, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Xevo TQ MS (Waters, USA). Kvantitativní hmotnostní spektrometr pracoval v režimu sledování vícenásobných reakcí (MRM). Pro každý analyt byl sledován jeden MRM přechod, který byl specifický pro daný typ isoprostanu. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tab. I. Naměřená data byla dále zpracována programem MassLynx V4.1.

Výsledky a diskuse

Optimalizace parametrů

V rámci vývoje metodiky byly optimalizovány následující parametry: (i) MRM přechody pro sledování vybraných isoprostanů, (ii) mobilní fáze, (iii) metoda přečištění vzorku pomocí SPE.

Pro sledování a následnou kvantifikaci analytů pomocí systému UPLC-MS/MS byla použita ionizace elektro-

sprejem se sledováním negativních iontů. Prekurzorem pro následnou aplikaci kolizně indukované disociace byl kvazimolekulární deprotonovaný ion m/z 353, který byl společný pro všechny tři typy sledovaných analytů. Každá skupina isoprostanů obsahuje ve svém produktovém spektru sekundární ionty, které jsou společné pro všechny typy isoprostanů, ale i ionty, které jsou charakteristické pro jeden daný typ isoprostanu. Pro sledování isoprostanů byly vybrány selektivní sekundární ionty pro aplikaci MRM modu hmotnostně spektrometrické detekce a byly optimalizovány podmínky kolizně indukované disociace. Závislost plochy píku isoprostanů na aplikované kolizní energii je znázorněna na obr. 2.

Pro následná měření byly použity hodnoty kolizní energie, které odpovídají maximu křivky na obr. 2. MRM podmínky jsou uvedeny v tab. II.

Na obr. 3 je uvedena ukázka chromatografických píků tří typů isoprostanů po optimalizaci podmínek MRM přechodů.

Součástí dalších optimalizací bylo testování vlivu složení mobilní fáze na odezvu analytů. Předpokládaný pozitivní vliv mobilní fáze obsahující octovou kyselinu na intenzitu iontů sledovaných v negativním modu byl ověřen

Tabulka I

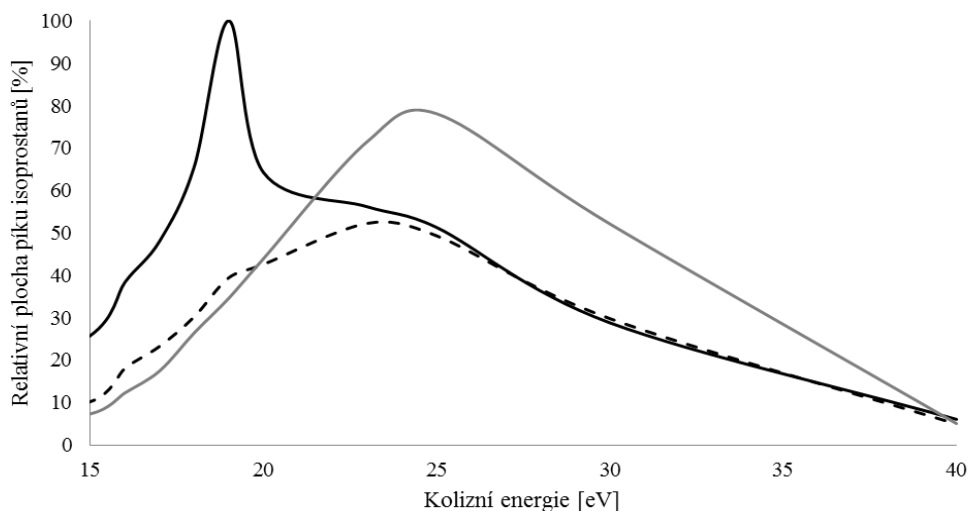
Podmínky stanovení isoprostanů pomocí UPLC-MS/MS

Parametr	Hodnota
<i>UPLC</i>	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA)
Složení mobilní fáze	A: 0,1% kyselina octová ve vodě B: 0,1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml min ⁻¹
Gradient mobilní fáze	0 min 10 % B 0–4,5 min lineární změna z 10 na 99,5 % B 4,5–7 izokratický při 99,5 % B 7,1–10 změna zpět na počáteční podmínky, konec analýzy
Objem nástřiku	2,5 μl
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	15 °C
<i>Iontový zdroj</i>	
Ionizace	ESI ⁻
Napětí na kapiláře	– 3,7 kV
Sušící plyn	N ₂ , průtok 650 dm ³ h ⁻¹
Zmlžovací plyn	N ₂ , průtok 50 dm ³ h ⁻¹
Teplota zdroje	150 °C
Teplota sušícího plynu	500 °C
<i>Hmotnostní analyzátor</i>	
Typ	tandemový hmotnostní analyzátor, trojitý kvadrupól
Detekční mod	MRM
Kolizní plyn	argon, průtok: 0,15 ml min ⁻¹

Tabulka II

Kolizně disociační reakce isoprostanů pro MRM mód hmotnostního spektrometru XEVO TQ MS

Isoprostan	MRM reakce [$m/z \rightarrow m/z$]	Napětí na vstupní čočce [V]	Kolizní energie [eV]
iPF ₂ α-III	353 → 193	40	25
iPF ₂ α-IV	353 → 127	40	23
iPF ₂ α-VI	353 → 115	40	19



Obr. 2. Optimalizace kolizní energie MRM analýzy pro sledování isoprostanů; — 353 > 115 (VI), --- 353 > 127 (IV), — 353 > 155 (III)

srovnáním s mobilními fázemi obsahujícími mravenčí kyselinu a octan amonný. Plochy píků každého analytu zvlášť byly pro srovnání normalizovány a graficky porovnány (obr. 4).

Ze srovnání lze usoudit, že použitá mobilní fáze měla velmi podobný efekt na každý ze tří analytů. Plocha píků isoprostanů je téměř dvojnásobně větší při použití mobilní fáze obsahující pouze octovou kyselinu, ve srovnání s plochou píků, získanou při aplikaci mobilní fáze obsahující pouze mravenčí kyselinu. Použití octanu amonného

pro modifikaci mobilní fáze zde mělo významný vliv na snížení intenzity píků sledovaných analytů. V souvislosti s tímto experimentem byl při každé použité mobilní fázi určován i limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ), které byly určeny jako trojnásobek resp. desetinásobek poměru odezvy vůči šumu nulové linie. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tab. III.

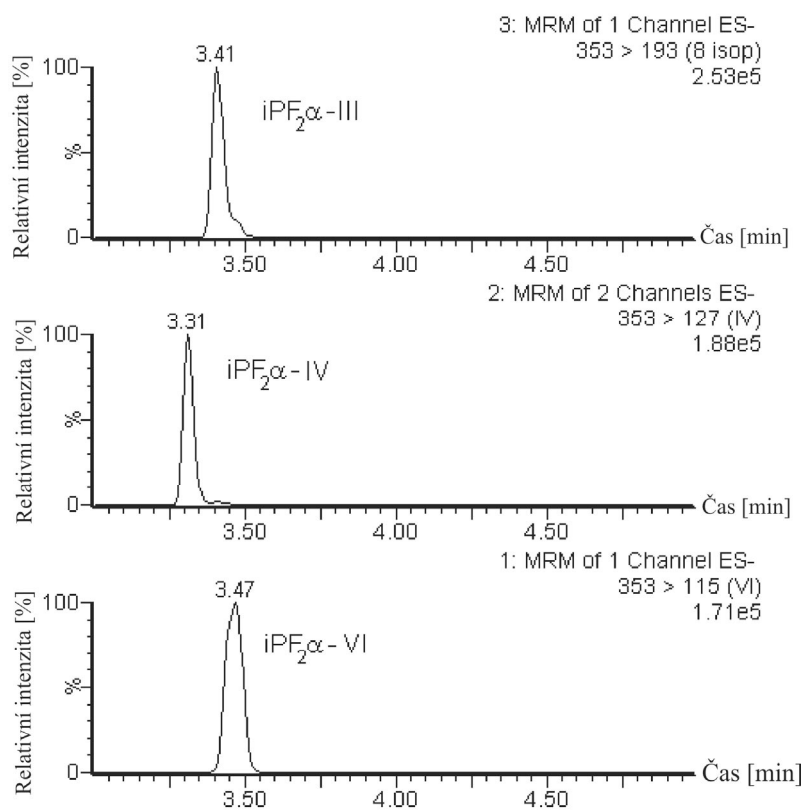
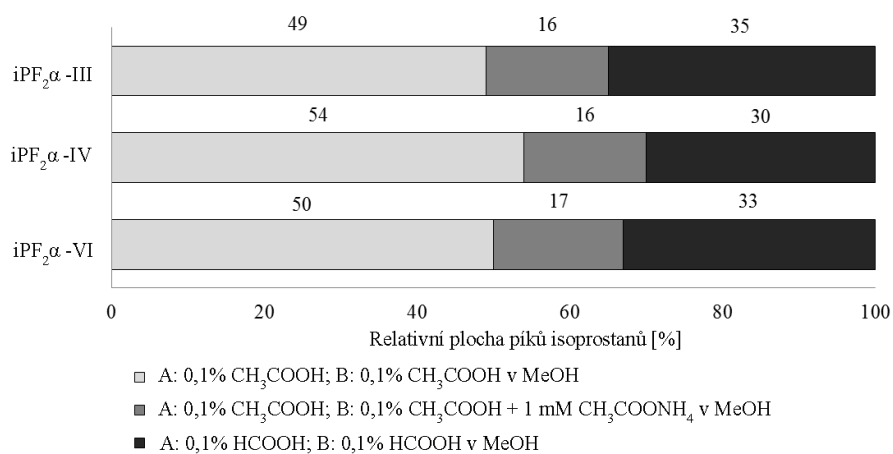
Nejnižšího limitu kvantifikace bylo dosaženo chromatografií s mobilní fází obsahující pouze octovou kyselinu (I). Testované mobilní fáze neměly výrazný vliv na tvar

Tabulka III

Vliv použité mobilní fáze na limity detekce a kvantifikace UPLC-MS/MS metody pro analýzu isoprostanů

Isoprostan Mobilní fáze	iPF ₂ α -III			iPF ₂ α -IV			iPF ₂ α -VI		
	I ^a	II ^b	III ^c	I ^a	II ^b	III ^c	I ^a	II ^b	III ^c
LOD, ng ml ⁻¹	0,013	0,089	0,060	0,039	0,114	0,051	0,021	0,080	0,051
LOQ, ng ml ⁻¹	0,042	0,297	0,201	0,129	0,381	0,171	0,069	0,265	0,171

^a Složení mobilních fází: I, A: 0,1% CH₃COOH, B: 0,1% CH₃COOH v MeOH; ^b II, A: 0,1% CH₃COOH, B: 0,1% CH₃COOH a 1mM CH₃COONH₄ v MeOH; ^c III, A: 0,1% HCOOH, B: 0,1% HCOOH v MeOH

Obr. 3. Záznam z analýzy standardní směsi isoprostanů o koncentraci 100 ng ml⁻¹

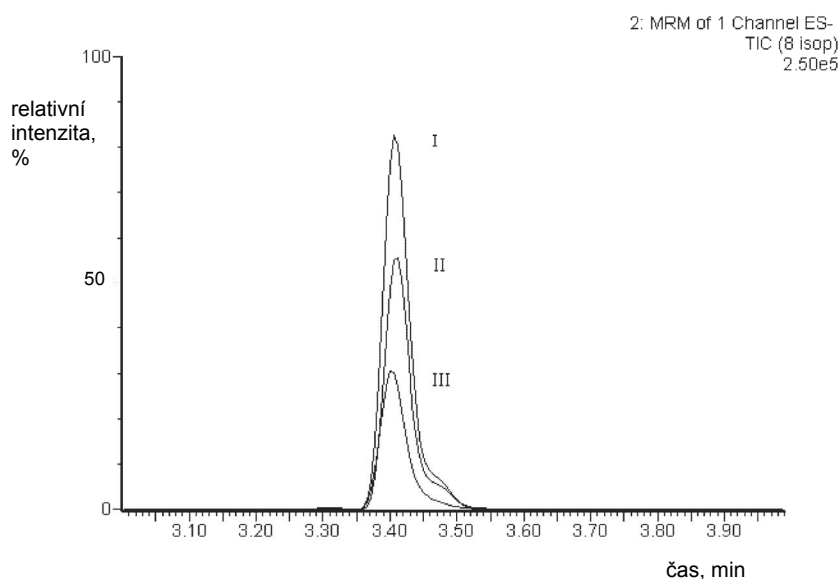
Obr. 4. Závislost normalizované plochy píků isoprostanů na použité mobilní fázi

píku. Na obr. 5 je uvedena ukázka ovlivnění chromatogramu iPF₂α-III použitou mobilní fází.

Pro následující chromatografické experimenty na UPLC-MS/MS byla použita mobilní fáze tvořená složkou

A (0,1% CH₃COOH ve vodě) a B (0,1% CH₃COOH v methanolu).

Nedílnou součástí přípravy vzorku tkáně pro hodnocení oxidativního stresu je optimalizace podmínek pro



Obr. 5. Chromatogram $iPF_2\alpha$ -III s použitou mobilní fází I, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH + 1 mM CH_3COONH_4 ; II, A: 0,1% $HCOOH$ a B: 0,1% $HCOOH$ v MeOH; III, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH v MeOH

Tabulka IV

Porovnání výtěžností isoprostanů na SPE kolonkách použitých pro přečištění a zkoncentrování analytů

Isoprostan	Výtěžnost [%]	
	Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge, 360 mg Sorbent per Cartridge, (Waters)	Strata™-X 33 μm Polymeric Reversed Phase, 200 mg/3 ml, (Phenomenex)
$iPF_2\alpha$ -III	$76,95 \pm 1,9 \%$	$99,85 \pm 1,4 \%$
$iPF_2\alpha$ -IV	$80,53 \pm 1,4 \%$	$98,85 \pm 1,1 \%$
$iPF_2\alpha$ -VI	$89,70 \pm 2,3 \%$	$99,40 \pm 2,1 \%$

extrakci isoprostanů. Vzhledem k obecně nízkým hodnotám koncentrace isoprostanů v biologické tkáni je zapotřebí vzorek zkoncentrovat a přečistit pro odstranění potenciálních interferentů. Pro tento účel lze použít extrakci na tuhé fázi (SPE). Během optimalizace byly porovnávány dvě SPE kolony lišící se použitou stacionární fází. První obsahovala reverzní fázi C-18 (Waters) a druhá polymerní reverzní fázi (Phenomenex). Výtěžnosti na obou kolonkách pro jednotlivé isoprostany jsou shrnuty v tab. IV.

Z výsledků jednoznačně vyplývá vhodnost použití kolonky obsahující polymerní stacionární fázi.

Validace metody

K posouzení a dokumentaci kvality analytického postupu byla určena kritéria metody jako je opakovatelnost, linearita, mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ). Pro tři sledované typy isoprostanů byla sestavena kalibrační závislost plochy píku na koncentraci. Získané kalibrační body v rozmezí od 0,1 do 100 $ng\ ml^{-1}$ (což odpovídá 0,066 a 66 $ng\ g^{-1}$) byly zpracovány metodou lineární regrese s koeficientem determinace více než 0,999 pro všechny tři typy isoprostanů. Tímto byla prokázána linearita v daném

Tabulka V

Validované parametry UPLC-MS/MS metody pro analýzu isoprostanů ve tkáni lososa

Isoprostan	t_R [min]	LOD [$ng\ g^{-1}$]	LOQ [$ng\ g^{-1}$]	Koeficient determinace R^2	Opakovatelnost RSD ($n=6$) [%]
$iPF_2\alpha$ -III	3,41	0,009	0,028	0,9993	14,6
$iPF_2\alpha$ -IV	3,31	0,026	0,085	0,9992	9,9
$iPF_2\alpha$ -VI	3,47	0,014	0,045	0,9997	14,7

koncentračním rozsahu. Limity detekce (LOD, $S/N \sim 3$) a kvantifikace (LOQ, $S/N \sim 10$) byly odvozeny z poměru signálu k šumu. Validace probíhala analýzou obohacených vzorků tkání lososa v šesti opakováních. Validované parametry jsou shrnuty v tab. V.

Závěr

Byla vypracována a validována metoda pro stanovení tří vázaných i nevázaných forem isoprostanů jako potenciálních markerů přítomnosti oxidativního stresu v lososích tkáních. Metoda je charakterizována nízkými hladinami kvantifikace a vysokou přesností.

Princip vyvinuté metody spočívá v kombinaci vhodné extrakční techniky s vysoce selektivní a přesnou detekční metodou. Pro uvolnění vázaných isoprostanů z fosfolipidové dvojvrstvy byla použita alkalická hydrolyza s následným přečištěním vzorku na SPE kolonkách. Isoprostanty byly dále analyzovány ultraúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a detekcí negativních iontů.

Navrhovaný postup byl validován v matici tkáně lososa obecného (*Salmo salar*). Důležitým krokem celého postupu je uvolnění vázaných forem isoprostanů hydrolyzou, který lze aplikovat i na další tkáňové vzorky. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že vyvinutá metoda je obecně vhodná pro sledování markerů oxidativního stresu v biologických tkáních.

Seznam použitých zkratk

BHT	butylhydroxytoluen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí
LOD	mez detekce, limit detekce
LOQ	mez stanovitelnosti, limit kvantifikace
MRM	sledování vícenásobných reakcí
RIA	radioimmunoassay
SPE	extrakce tuhou fází
UPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí

Tato studie byla podporována MŠMT ČR, grant č. FCH-S-13-2087.

LITERATURA

- Hegedüs A., Erdei S., Janda T., Tóth E., Horváth G., Dudits D.: *Plant Sci.* 5, 1329 (2004).
- Chiabrando C., Valagussa A., Rivalta C., Durand T., Guy A., Zuccato E., Villa P., Rossi J.-C., Fenalli R.: *J. Biol. Chem.* 3, 313 (1999).
- Gao L., Zackert W. E., Hasford J. J., Danekis M. E., Milne G. L., Remmert C., Reese J., Yin H., Tai H.-H., Dey S. K., Porter N. A., Morrow J. D.: *J. Biol. Chem.* 31, 28479 (2003).
- Sicilia T., Mally A., Schauer U., Pähler A., Völkel W.: *J. Chromatogr. B.* 861, 48 (2008).
- Li H., Lawson J. A., Reilly M., Adiyaman M., Hwang S., Rokach J., FitzGerald G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6, 13381 (1999).
- Sircar D., Subbaiah P. V.: *Clin. Chem.* 2, 251 (2007).
- Montuschi P., Ragazzoni E., Valente S., Corbo G., Mondino C., Ciappi G., Ciabattini G.: *Inflamm. Res.* 12, 502 (2003).
- Masoodi M., Nicolaou A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3023 (2006).
- Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23, 9383 (1990).
- Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., Imai K.: *Biomed. Chromatogr.* 6, 143 (1992).
- Ritov V. B., Kelley D. E., Kagan V. E.: *Anal. Biochem.* 311, 10 (2002).
- Korotchenko O. D., Alekseev S. M., Evstigneeva R. P., Karpova G. V., Isai S. V.: *Chem. Nat. Compd.* 6, 612 (1999).
- Eberhard J., Jepsen S., Albers H. K., Açil Y.: *Anal. Biochem.* 280, 258 (2000).
- Goswami S., Mai J., Bruckner G., Kinsella J. E.: *Prostaglandins* 5, 693 (1981).
- Montuschi P., Barnes P. J., Ciabattini G.: *Methods Mol. Biol.* 594, 73 (2010).
- Wang Z., Ciabattini G., Créminon C., Lawson J., Fitzgerald G. A., Patrono C., MacLouf J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 94 (1995).
- Carpagnano G. E., Kharitonov S. A., Resta O., Foscchino-Barbaro M. P., Gramiccioni E., Barnes P. J.: *Chest J.* 124, 1386 (2003).
- Tsikas, D.: *J. Chromatogr. B.* 717, 201 (1998).
- Lee C.-Y. J., Jenner A. M., Halliwell B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 696 (2004).
- Signorini C., Comporti M., Giorgi G.: *J. Mass Spectrom.* 38, 1067 (2003).
- Nourooz-Zadeh J., Gopaulb N. K., Barrowc S., Mallett A. I., Anggrad E. E.: *J. Chromatogr. B.* 667, 199 (1995).
- Taylor A. W., Bruno R. S.: *Lipids* 43, 925 (2008).
- Harman S. M., Liang L., Tsitouras P. D., Gucciardo F., Heward C. B., Reaven P. D., Ping W., Ahmed A., Cutler R. G.: *Free Radical Biol. Med.* 10, 1301 (2003).
- Yin H., Porter N. A., Morrow J. D.: *J. Chromatogr. B.* 827, 157 (2005).
- Ohashi N., Yoshikawa M.: *J. Chromatogr. B.* 746, 17 (2000).
- Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Najmanová V., Fenclová Z., Vlčková Š., Lebedová J., Pelclová D.: *J. Chromatogr. B.* 877, 2477 (2009).
- Sircar D., Subbaiah P. V.: *Clin. Chem.* 53, 251 (2007).

28. Liang Y., Wei P., Duke R. W., Reaven P. D., Harman S. M., Culter R. G., Heward C. B.: *Free Radical Biol. Med.* 34, 409 (2003).

M. Bolechová^{a,b}, J. Čáslavský^a, D. Mácová^a, M. Vávrová^a, and M. Taggart^c (^a*Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Technical University, Brno.* ^b*Central Inspectional and Testing Institute in Agriculture, Brno, Czech Republic,* ^c*Environmental Research Institute, North Highland College, Thurso, UK*): **A Method of Analysis of Isoprostanes in Salmon Tissue**

A sensitive and reliable method is proposed allowing quantification of isoprostanes in salmon tissue using ultra-HPLC coupled to tandem MS. Solid phase extraction is used for sample concentration and purification. Repeatability, linearity, limits of detection and quantification were assessed by validation.

BIOSYNTÉZA A IZOLÁCIA RASTLINNÝCH SAPONÍNŮV

LENKA TMÁKOVÁ, STANISLAV SEKRETÁR,
JARMILA HLÁŠNIKOVÁ, LENKA VRBIKOVÁ
a ŠTEFAN SCHMIDT

*Oddelenie potravinárskej technológie, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
lenka.tmakova@stuba.sk*

Došlo 6.3.14, prijaté 24.4.14.

Kľúčové slová: saponíny, extrakcia, izolácia, rastliny, biosyntéza

Obsah

1. Saponíny
2. Biosyntéza
3. Extrakcia a izolácia
 - 3.1. Problémy spojené s extrakciou a izoláciou saponínov
 - 3.2. Materiály
 - 3.3. Metódy
 - 3.3.1. Extrakcia saponínov
 - 3.3.2. Izolácia saponínov
4. Záver

1. Saponíny

Saponíny sú prírodné látky glykozidickej povahy s vlastnosťami mydla. Nakoľko majú lipofilný aglykón (steroid alebo triterpén) a hydrofilnú časť (cukorná zložka), znižujú povrchové napätie a v i minimálnej koncentrácii silno penia^{1–3}. Pomerne často sa vyskytujú v rastlinách a dodnes boli popísané asi v 100 čeľadiach. Ich obsah v rastlinách závisí od mnohých faktorov: kultivaru, veku, štádiá vývinu rastliny alebo klimatických a edafických faktorov. Sú široko rozšírené v rastlinách poľnohospodárskeho významu, najmä v strukovinách. Mnohé z týchto strukovín sú základnými prvkami ľudskej stravy⁴.

Biologická úloha saponínov nie je úplne známa. U rastlín sú všeobecne považované za súčasť obranných systémov v dôsledku antimikrobiálnych, fungicídnych, alelopatických, insekticídnych a moluskocídnych a ďalších aktivít^{5–7}.

Saponíny sú tiež účinnými látkami mnohých fytofarmák. Veľká štruktúrna rozmanitosť saponínov podmie-

ňuje množstvo zaujímavých biologických a farmakologických aktivít zistených u jednotlivých saponínov alebo ich zmesí.

Saponínom boli okrem antikarcinogénnych účinkov^{8–10} vedecky dokázané aj antioxidačné vlastnosti^{11–13}, účinky imunologických pomocných látok^{14,15} a taktiež hemolytické účinky^{14,16}.

Použitie vo forme zmesí sa stretáva s problémami štandardizácie v prípravkoch, kým použitie jednotlivých čistých látok je spojené s ťažkosťami izolácie vzhľadom na štruktúrne množstvo a s polaritou podobných saponínov v rámci jedného druhu⁴.

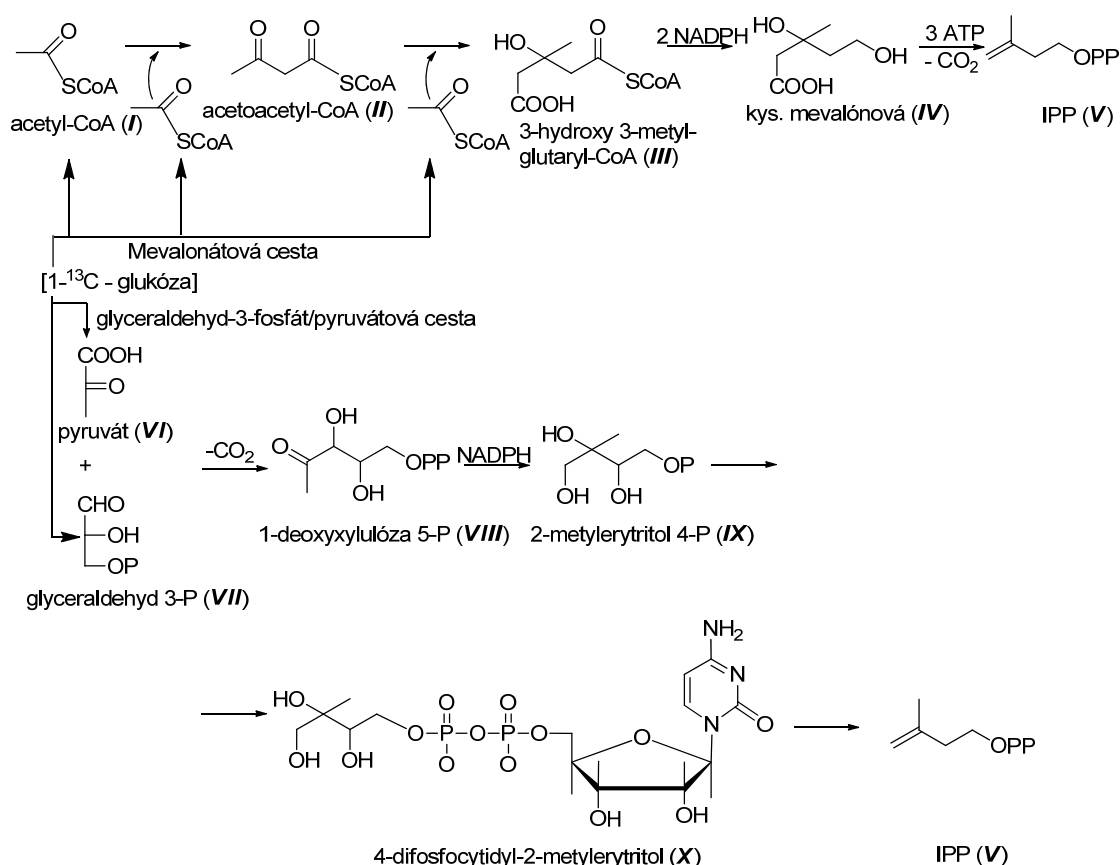
2. Biosyntéza

Základnými cestami vzniku terpénových zlúčenín je mevalonátová cesta a metylerytritolová cesta (obr. 1).

Východiskovou zlúčeninou pre všetky organizmy je molekula glukózy, z ktorej vzniká glyceraldehyd-3-fosfát a následne acetylkoenzým A. Kľúčovým krokom mevalonátovej biosyntetickej cesty je vznik 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzýmu A z troch molekúl acetylkoenzýmu A a jeho redukcia pôsobením 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzým A reduktázy na kyselinu mevalónovú, z ktorej vzniká prvý „izoprenoid“ – izopentenylidifosfát (IPP).

Vznik IPP je možný aj inou biosyntetickou cestou, ktorá nie je, na rozdiel od predchádzajúcej, lokalizovaná v cytozole bunky, ale v plastidoch. Táto tzv. metylerytritolová cesta zahŕňa nasledovné reakcie: adíciu pyruvátu na tiamindifosfát za vzniku hydroxyetyltiamínového derivátu (skrytá C2 jednotka), jeho adíciu na C3 jednotku – glyceraldehyd-3-fosfát za vzniku dihydroxypentyltiamínového derivátu a elimináciu tiamindifosfátu za vzniku prvého C5 medziproduktu 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu, ktorý po redukcii tvorí 2-metylerytritol-4-fosfát. Až v tejto molekule je zafixovaná štruktúra vznikajúceho IPP (cit.^{17–20}).

Účasť izopentenylidifosfátu v biosyntéze izoprenoidov závisí od enzýmov katalyzovanej reakcie, pri ktorej vzniká pôsobením izopentenylidifosfátizomérázy dimetylalylidifosfát, ktorý pôsobí ako štartér pri polymerizačných reakciách spôsobujúcich predĺženie reťazca. Dimetylalylidifosfát adične reaguje s molekulou izopentenylidifosfátu za vzniku geranylidifosfátu. Pridaním ďalšej IPP jednotky ku geranylidifosfátu vzniká farnezyldifosfát, ktorý následne dimerizuje na skvalén (obr. 2). Skvalén sa oxiduje oxigenázovým systémom na 2,3-epoxid, ktorý cyklizuje na lanosterol prípadne cykloartenol^{4,21}. Iné priestorové poskladanie skvalén-2,3-epoxidu umožňuje aj vznik pentacyklického β -amyrínu (obr. 3). Dôležitou reakciou je premena C30 skeletu lanosterolu na C27 skelet cholesterolu, ktorá zahŕňa stratu troch metylových jednotiek, presun dvojitej väzby a redukcii dvojitej väzby. Poradie týchto zmien

Obr. 1. Biosyntetická dráha vzniku izopentenylidifosfátu z glukózy²⁰

môže byť rôzne v závislosti od organizmov, v ktorých sa uskutočňujú. Bolo izolovaných viacero medziproduktov dokladajúcich rôzne štádiá tejto transformácie.

Cholesterol je predchodca veľkej skupiny steroidov, z ktorého sa tvoria steroidné sapogeníny, steroidné alkaloidy, steroidné hormóny, steroidné horčiny, žľazové kyseliny a kardioglykozidy. Cholesterol sa oxiduje na uhlíku C-16, C-22 a C-26. Hydroxylová skupina na C-16 utvára päťčlenný kyslíkatý kruh charakteristický pre furostánové deriváty. Hydroxylová skupina na C-26 môže tvoriť glykozidovú väzbu so sacharidmi alebo utvárať spirostánový kruh.

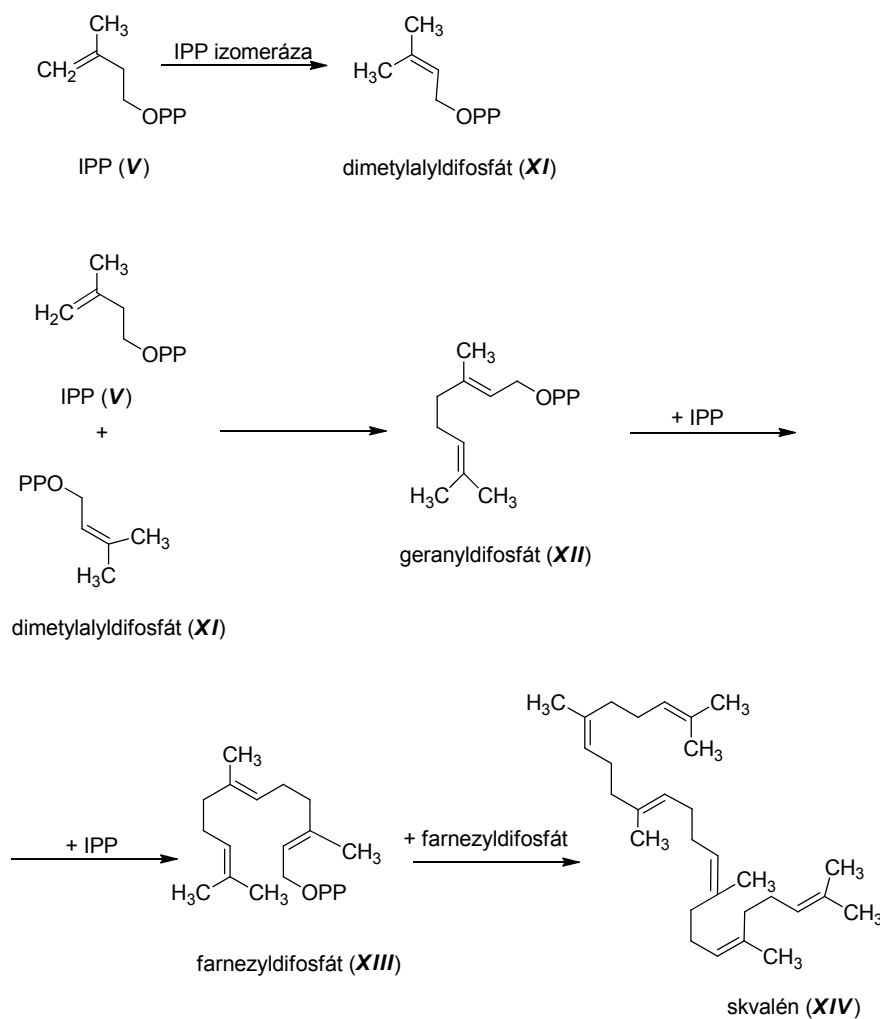
Biosyntéza glykozidov zahŕňa vytvorenie aglykónu a jeho spojenie so sacharidovým zvyškom. Najčastejšie sa na reakciách tohto druhu podieľa uridindifosfoglukóza, ktorá je donorom glukózy v procese transglykozylácie. Transformácia sacharidu pripojeného na nukleotid môže viesť k oxidácii, epimerizácii a ďalším reakciám, čo zapríčiňuje vytvorenie nových sacharidových nukleotidov.

Štruktúrna pestrosť saponínov sa dáva do súvisu s fylogenetickým vývojom rastlín, resp. vývojom výstavby ich bunkových membrán²².

3. Extrakcia a izolácia

Extrakcia a izolácia saponínov sa považuje za vážny problém, vzhľadom na ich špeciálne štruktúrne znaky. Konvenčné a novšie metódy skúmali metódy extrakcie, ktoré by boli z hľadiska vlastností ekologickejšie, účinnejšie a ekonomickejšie vzhľadom k použitému rozpúšťadlu^{23,24}. Podobne sa diskutuje o tradičných a nových postupoch aj pri metódach izolácie.

Aj keď vo všeobecnosti je ťažké použiť len jednu techniku na izoláciu saponínov, najnovšie znalosti poukazujú na skutočnosť, že vysoko rýchla protiprúdna chromatografia (HSCCC) a detektor rozptylu svetla s odparovaním mobilnej fázy (ELSD) prinášajú separácie s dobrými výsledkami. Zdá sa, že pri použití ELSD absen-tuje dlhotrvajúci problém detekcie, pretože väčšina saponínov nemá chromofór a tak sa robí iba nešpecifická UV detekcia v rozsahu 200–210 nm.

Obr. 2. Biosyntéza skvalénu⁴

3.1. Problémy spojené s extrakciou a izoláciou saponínov

Extrakcia a izolácia saponínov predstavuje výzvu vzhľadom na štrukturálne rozdiely, vyplývajúce z rôznych substituentov, napr. -OH, -CH₃, alebo -COOH v aglykóne. To je ďalej skomplikované počtom, usporiadaním a orientáciou sacharidových skupín, rovnako ako počtom a druhom cukrových reťazcov pripojených k aglykónu. Všeobecne možno povedať, že saponíny majú vysokú polaritu, nie sú chemicky a tepelne stabilné, sú neprchavé a zvyčajne sa nachádzajú v rastlinách, v nízkych koncentráciách²⁵. Z toho dôvodu je potrebná zvýšená pozornosť pri vykonaní extrakcie (predbežná úprava) použitej pri relatívne miernych podmienkach. Niektoré saponíny sa počas vodnej extrakcie môžu podrobiť enzymatickej hydrolýze, ale môže dôjsť aj k esterifikácii kyslých saponí-

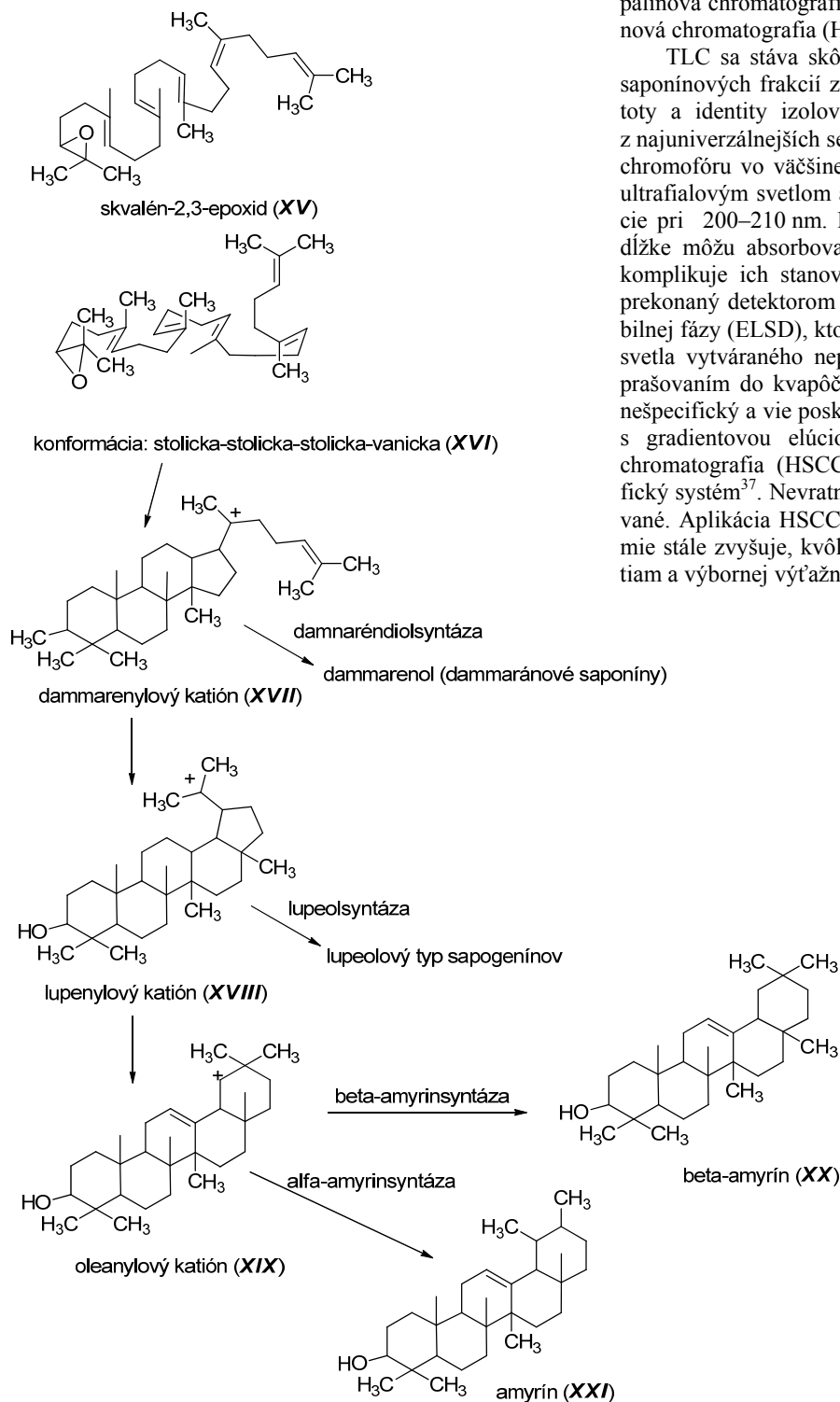
nov pri extrakcii alkoholom. Okrem toho môžu prebiehať aj transacylačné reakcie²⁴.

V minulosti, práca so saponínmi zahŕňovala extrakciu rastlinného materiálu za horúca použitím vodných alkoholových roztokov a odparenie alkoholu následnou extrakciou saponínov do butanolu pomocou rozpúšťadla. Problémom pri extrakcii za horúca je to, že nestále formy (napr. acylované formy) sa môžu rozpadáť na zložky, ktorých je viac ako pôvodných saponínov. Okrem toho, extrakcia metanolom môže najmä pri steroidných saponínoch viesť k vzniku metylderivátov, ktoré neboli pôvodne nájdené v rastline²⁶. Na zistenie skutočného zloženia saponínov by bola extrakcia za studena (etanol – voda) lepším riešením. Je potrebné poznamenať, že extrakcia rozpúšťadlom, môže niektoré veľmi polárne saponíny (bidezmozidové a tridezmozidové) ponechať vo vodnej vrstve.

Skutočnosť, že sa saponíny vyskytujú v rastlinách ako zmes štrukturálne podobných zlúčenín s podobnou polaritou, dáva náročnú úlohu na ich oddelenie. Na izoláciu týchto zlúčenín sa zvyčajne používajú viaceré separačné

metódy. Na úplné oddelenie a izoláciu čistých jednotlivých zložiek sa používajú: tenkovrstvová chromatografia (TLC)^{26–32}, kolónová chromatografia (CC), nízkotlaková kvapalinová chromatografia (LPLC), strednetlaková kvapalinová chromatografia (MPLC) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)^{33–36}.

TLC sa stáva skôr podpornou technikou na analýzu saponínových frakcií z CC. Používa sa na potvrdenie čistoty a identity izolovaných zlúčenín. HPLC je jednou z najuniverzálnejších separačných techník. Avšak absencia chromofóru vo väčšine saponínov brzdí ich detekciu pod ultrafialovým svetlom a umožňuje iba nešpecifické detekcie pri 200–210 nm. Problémom je, že pri tejto vlnovej dĺžke môžu absorbovať aj iné zložky ako saponíny, čo komplikuje ich stanovenie. Tento problém bol nedávno prekonaný detektorom rozptylu svetla s odparovaním mobilnej fázy (ELSD), ktorý umožňuje detekciu rozptýleného svetla vytváraného neprechádzajúcimi časticami analytov rozprašovaním do kvapôčok. Univerzálny ELSD detektor je nešpecifický a vie poskytnúť stabilnú základnú čiaru spolu s gradientovou elúciou^{26–29}. Vysokorychla protiprúdna chromatografia (HSCCC) má kvapalinový chromatografický systém³⁷. Nevratné adsorpčné účinky sú minimalizované. Aplikácia HSCCC sa v prírodných produktoch chémie stále zvyšuje, kvôli jej vyšším separačným schopnostiam a výbornej výťažnosti^{38–41}.



Obr. 3. Vznik základných typov triterpénových sapogenínov zo skvalénu-2,3-epoxidu⁴

3.2. Materiály

Rastlinný materiál (koreň, stonka-kôra, listy, kvety, plody, cibulky, atď.) sa obvykle suší na vzduchu a potom sa pred extrakciou melie na prášok. Používa sa destilovaná alebo deionizovaná voda a organické rozpúšťadlá, ktoré sú buď analytickej čistoty, alebo destilované v prípade univerzálnych činidiel. Pri extrakcii sa využívajú extrakčné prístroje, prípadne macerácia, extrakcia s využitím mikrovln alebo ultrazvukový kúpeľ. Štandardné chromatografické zariadenia a prístroje sú nevyhnutné pri použití TLC, CC, HSCCC alebo HPLC. Môžu sa použiť aj LC-ELSD, LC-MS, GC-MS, LC-NMR alebo iné kombinované techniky. Na objasnenie štruktúry sa používajú štandardné spektroskopické prístroje.

Na uľahčenie určovania štruktúry sú saponíny hydrolyzované na voľný aglykón a zložku cukrov. Z toho dôvodu je na ovplyvnenie hydrolyzy potrebná kyselina, zásada alebo rôzne enzýmy.

3.3. Metódy

3.3.1. Extrakcia saponínov

Prvý krok pri spracovaní saponínov zahŕňa ich extrakciu z rastlinnej matrice. Extrakčné rozpúšťadlo, extrakčné podmienky (napr. teplota, pH, pomer rozpúšťadla) a vlastnosti mletého materiálu (napr. zloženie a veľkosť častíc) sú hlavnými faktormi, ktoré určujú účinnosť procesu.

Konvenčné metódy extrakcie

Predúprava, ktorá zvyšuje účinnosť extrakcie, zahŕňa sušenie, redukciu veľkosti častíc a zbavenie tuku (použitie lipofilného rozpúšťadla ako je etylacetát alebo *n*-hexán). Zbavenie tuku sa môže uskutočniť aj po extrakcii saponínov. Redukcia veľkosti častíc (mletie) sa zvyčajne vykonáva na zvýšenie účinnosti extrakcie. Efektívnosť separácie sa zlepšuje použitím časti rastliny s najvyššou koncentráciou saponínu.

Extrakcia väčšiny saponínov prebieha na práškovom rastlinnom materiáli (rôzne časti) pomocou metanolu, etanolu, vody alebo vodného alkoholu ako extrakčných roztokov. Nasleduje zbavenie tuku (čím sa odstránia lipofilné látky, zvyčajne s petroléterom a *n*-hexánom), ktoré sa realizuje pred extrakciou, alebo na samom extrakte. Extrakty sa potom rozpustia alebo suspendujú vo vode a pretrepávajú sa s *n*-butanolom nasýteným vodou. Zvyšky *n*-butanolu sa spoja a kvapalina sa odstráni, aby sa získal surový extrakt saponínu, s ktorým možno ďalej pracovať. Niektorí volia vyzrážanie pomocou dietyléteru alebo acetónu, iní zaraďujú ešte dialyzačnú fázu pre malé, vo vode rozpustné molekuly, ako sú napríklad cukry^{24,42}.

Novšie metódy extrakcie

Konvenčné metódy extrakcie a purifikácie chemických zložiek z rastlinných pletív predstavujú aj niektoré nevýhody. Vyžadujú si hlavne dlhší extrakčný čas, väčší

rozpúšťací stupeň a majú menšiu účinnosť. Navyše, mnoho prírodných produktov je tepelne nestabilných a môžu sa degradovať počas extrakcie. V porovnaní s tradičnými metódami, novšie metódy majú mnoho výhod, ako je napríklad kratšia doba extrakcie, menej použitého rozpúšťadla a vyššia extrakčná rýchlosť⁴³. Kým tradičné metódy extrakcie sa bežne používajú na výrobu saponínových extraktov, najnovší výskum sa zameriava na technológie, ktoré zlepšujú účinnosť extrakcie a to znížením času extrakcie a spotreby rozpúšťadiel. Extrakcie s využitím mikrovln (MAE)^{44–49} a ultrazvuku (UAE)^{48–50} sú relatívne lacné, jednoduché a účinné. Tieto procesy zahŕňajú narušenie vnútornej štruktúry buniek a uvoľnenie intracelulárneho produktu na uľahčenie prenosu hmoty, ktoré je dosiahnuté rýchlym a selektívnym ohrevom suroviny v rozpúšťadle, ktoré je (čiastočne) priepustné pre mikrovlnnú energiu (pri extrakcii MAE)^{44–47} a pre mechanické účinky akustickej kavitácie (pri extrakcii UAE)⁵⁰.

Laboratórnymi metódami MAE a UAE sa preskúmala extrakcia ginsenosidov zo ženšenu^{45,47}. Maximálny výťažok saponínu sa MAE metódou (7,4 mg/100 mg sušiny ženšenu) dosiahol za 6 min a bol porovnateľný s 8h extrakciou podľa Soxhleta (7,7 mg/100 mg sušiny), 6h extrakciou za tepla s refluxom (6,7 mg/100 mg sušiny) a 2h extrakciou s využitím ultrazvuku (7,6 mg/100 mg sušiny)⁴⁷.

Niektoré príklady dostupných moderných extrakčných metód:

(a) Extrakcia s využitím ultrazvuku: V tejto metóde sa extrakcia vykonáva v ultrazvukovom kúpeli, ktorý umožňuje zmenu amplitúdy a teploty. Pracovná frekvencia je nastavená na hodnotu 33 kHz. Dané množstvo materiálu sa extrahuje 95% EtOH v kónickej banke a vystaví sa určitý čas zvukovým vlnám, pri izbovej teplote. Po extrakcii sa obsah sfiltruje a odparí do sucha.

(b) Superkritická fluidná extrakcia: Používa sa superkritický fluidný extraktor. Vzorky sú extrahované oxidom uhličitým a etanolom, pod pracovným tlakom 25 MPa a teplote 55 °C. Prietok sa často nastavuje na 30 l/h a separačná teplota na 37 °C.

(c) Extrakcia s využitím mikrovln: Použitie mikrovlnnej energie umožňuje rýchle rozpustenie, sušenie a extrakciu organických zlúčenín z komplexných matric. Mikrovlny ohrievajú rozpúšťadlá alebo zmes rozpúšťadiel priamo, priamou interakciou mikrovln s voľnými molekulami vody, prítomnými v žľazách a cievnych systémoch, čo má za následok ďalšie porušenie rastlinných pletív a uvoľnenie zložiek do organického rozpúšťadla. Jeho hlavné výhody sú zníženie objemu rozpúšťadla a spotreby času a tiež zvýšenie priepustnosti vzorky^{44,51–55}. Preto MAE poskytuje alternatívnu metódu ku konvenčným extrakčným metódam v rastlinách. MAE sa vykonáva v uzavretej nádobe prístroja, stroj je vybavený snímačom teploty a má maximálny príkon 800 W.

Prášok zbavený tuku sa zmieša s vybraným rozpúšťadlom (MeOH, EtOH alebo EtOH – H₂O 7:3, *n*-butanol alebo *n*-butanol – voda 1:1) v uzatvorenej fľaštičke a ožaruje sa pri 2450 MHz spravidla 20 min. Teplota rozpúšťadla sa

udržiava pri konštantnej teplote 60 °C za použitia automatického teplotného zariadenia, ponoreného do roztoku obsahujúceho v nádobe. Mikrovlnná energia je obmedzená na 300 W a po ochladení na teplotu miestnosti sa extrakt zhromažďuje a ukladá až do použitia.

3.3.2. Izolácia saponínov

Konvenčné metódy extrakcie rozpúšťadlom, CC a preparatívna TLC, môžu niekedy poskytnúť čisté látky, ale v mnohých prípadoch je zložité izolovať jednotlivé saponíny. Na práškový materiál zbavený tuku sa pôsobí petroleterom a extrahuje sa MeOH v Soxhletovom prístroji po dobu 72 h (cit.^{56,57}) alebo maceráciou s MeOH pri izbovej teplote. Extrakt sa zahusť pod zníženým tlakom a rozdelí sa postupne za použitia *n*-hexánu, etylacetátu (alebo CHCl₃) a *n*-BuOH. *n*-Butanový rozpustný podiel a vodná časť poskytuje hlavný podiel triterpénových saponínov⁵⁸. Tieto surové extrakty sú použité oddelene na kolónach Diaion HP-20 (polystyrén – divinylbenzénové kopolyméry), ktoré sa premyjú vodou – MeOH v rôznych pomeroch a nakoniec acetónom. Nájdené frakcie s rovnakou štruktúrou sa zmiešajú a oddeľujú na silikagéle stĺpcovou chromatografiou s CHCl₃ – MeOH – H₂O (40:10:1). Nakoniec môžu byť saponínové zlúčeniny oddelené na kolóne HPLC pomocou MeOH – vody ako elučného činidla. Saponíny sa pri TLC detegujú postrekom 10% H₂SO₄ v etanole a Lieberman-Burchardovým činidlom alebo zmesou *p*-anizaldehydu – kyseliny sírovej – kyseliny octovej ľadovej (1:2:100), triterpénové saponíny vytvárajú modrofialové škvrny pri zahrievaní²⁴.

4. Záver

So zvyšujúcim záujmom o životné prostredie sa zvyšuje aj záujem o prírodné povrchovo aktívne látky. Saponíny predstavujú skupinu sekundárnych metabolitov rastlín, ktoré sa v súčasnosti intenzívne študujú z hľadiska obsahových látok a ich účinkov. Je známe, že jedna rastlina môže obsahovať množstvo rôznych saponínov. Veľká štruktúrna rozmanitosť saponínov komplikuje ich izoláciu z rastlinných zdrojov, sú sprevádzané veľmi polárnymi zlúčeninami, ako sú sacharidy a farebné látky (fenolové látky), zriedkavo kryštalizujú a môžu byť hygroskopické.

Na získanie extraktu saponínov sa obvyčajne najviac používa tradičná extrakcia rozpúšťadlom, ale novšie modernejšie štúdie sa zameriavajú na technológie zlepšujúce efektivitu extrakcie znížením extrakčného času a spotrebu rozpúšťadla bez zníženia kvality vzorky.

Práca vznikla za podpory grantov APVV 0850-11 a VEGA 1/0860/13.

LITERATÚRA

- Wang Z.-W., Gu M.-Y., Li G.-Z.: J. Dispersion Sci. Technol. 26, 341 (2005).
- Güclü-Üstündag Ö., Mazza G.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47, 231 (2007).
- Hostettmann K., Marston A.: *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- Mučaji P., Nagy M.: *Saponíny. Výskyt, vlastnosti a možnosti využitia vo farmácii*. Vydavateľstvo Osveťa, Martin 2010.
- Augustin J. M., Kuzina V., Andersen S. V., Bak S.: Phytochemistry 72, 435 (2011).
- Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K.: Br. J. Nutr. 88, 587 (2002).
- Sparg S. G., Light M. E., Staden J.: J. Ethnopharmacol. 94, 219 (2004).
- Cheng T.-C., Lu J.-F., Wang J.-S., Lin L.-J., Kuo H.-I., Chen B.-H.: J. Agric. Food Chem. 59, 11319 (2011).
- Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C.: Fitoterapia 81, 703 (2010).
- Waheed A., Barker J., Barton S. J., Owen C. P., Ahmed S., Carew M. A.: Eur. J. Pharm. Sci. 47, 464 (2012).
- Chan K. W., Khong N. M. H., Iqbal S., Ismail M.: J. Cereal Sci. 57, 480 (2013).
- Dini I., Tenore G. C., Dini A.: Food Chem. 113, 411 (2009).
- Li J., Zu Y.-G., Fu Y.-J., Yang Y.-C., Li S.-M., Li Z.-N., Wink, M.: Innovative Food Sci. Emerging Technol. 11, 637 (2010).
- Sun H., Chen L., Wang J., Wang K., Zhou J.: Int. Immunopharmacol. 11, 2047 (2011).
- Verza S. G., Silveira F., Cibulski S., Kaiser S., Ferreira F., Gosmann G., Roehle P. M., Ortega G. G.: J. Agric. Food Chem. 60, 3113 (2012).
- Hassan S. M., Haq A. U., Byrd J. A., Berhow M. A., Cartwright A. L., Bailey C. A.: Food Chem. 119, 600 (2010).
- Chappell J.: Curr. Opin. Plant Biol. 5, 151 (2002).
- Kirby J., Keasling J.: Annu. Rev. Plant Biol. 60, 335 (2009).
- Trojanowska M. R., Osbourn A. E., Daniels M. J., Threlfall D. R.: Phytochemistry 54, 153 (2000).
- Rohmer M.: Nat. Prod. Rep. 16, 565 (1999).
- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E.: Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 75, 31 (2002).
- Henry M.: Phytochem. Rev. 4, 89 (2005).
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M.: J. Food Eng. 117, 426 (2013).
- Majinda R. R. T., v knihe: *Natural Products Isolation* (Sarker S. D., Nakar L., ed.), zv. III, kap. 16. Springer, New York 2012.
- Li B., Abliz Z., Tang M., Fu G., Yu S.: J. Chromatogr. A 1101, 53 (2006).
- Oleszek W., Bialy Z.: J. Chromatogr. A 1112, 78 (2006).
- Ha Y. W., Lim S. S., Ha I. J., Na Y.-C., Seo J.-J., Shin

- H., Son S. H., Kim Y. S.: *J. Chromatogr. A* 1151, 37 (2007).
28. Qi X., Ignatova S., Luo G., Liang Q., Jun F. W., Wang Y., Sutherland I.: *J. Chromatogr. A* 1217, 1995 (2010).
 29. Müller A., Ganzera M., Stuppner H.: *J. Chromatogr. A* 1112, 218 (2006).
 30. Adão C. R., Silva B. P., Parente J. P.: *Fitoterapia* 82, 1175 (2011).
 31. Liu P., Lu J.-F., Kang L.-P., Yu H.-S., Zhang L.-J., Song X.-B., Ma B.-P.: *Chin. J. Nat. Med.* 10, 88 (2012).
 32. Patel P. K., Patel M. A., Vyas B. A., Shah D. R., Gandhi T. R.: *J. Ethnopharmacol.* 144, 160 (2012).
 33. Bi L., Tian X., Dou F., Hong L., Tang H., Wang S.: *Fitoterapia* 83, 234 (2012).
 34. He H., Xu J., Xu Y., Zhang C., Wang H., He Y., Wang T., Yuan D.: *J. Ethnopharmacol.* 140, 73 (2012).
 35. Liu Y.-W., Zhu X., Lu Q., Wang J.-Y., Li, W., Wei Y.-Q., Yin X.-X.: *J. Ethnopharmacol.* 139, 194 (2012).
 36. Mostafa A., Sudisha J., El-Sayed M., Ito S.-I., Ikeda T., Yamauchi N., Shigyo M.: *Phytochem. Lett.* 6, 274 (2013).
 37. Ito Y., Conway W. D. (ed.): *High-speed Countercurrent Chromatography*. Wiley, New York 1996.
 38. Du Q., Cheng H., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 921, 331 (2001).
 39. Du Q., Li Z., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 923, 271 (2001).
 40. Du Q., Xia M., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 962, 239 (2002).
 41. Du Q., Cai W., Ito Y.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25, 2515 (2002).
 42. Weng A., Jenett-Siems K., Schmieder P., Bachran D., Bachran C., Görick C., Thakur M., Fuchs H., Melzig M. F.: *J. Chromatogr. B* 878, 713 (2010).
 43. Chen Y., Xie M.-Y., Gong X.-F.: *J. Food Eng.* 81, 162 (2007).
 44. Kwon J.-H., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J.: *J. Sci. Food Agric.* 51, 1807 (2003).
 45. Kwon J.-H., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J., Yaylayan V. A.: *Food Res. Int.* 36, 491 (2003).
 46. Kwon J.-H., Lee G.-D., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 615 (2003).
 47. Vongsangnak W., Gua J., Chauvatcharin S., Zhong J.-J.: *Biochem. Eng. J.* 18, 115 (2004).
 48. Wang L., Weller C. L.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300 (2010).
 49. Cheok C. Y., Salman H. A. K. S., Sulaiman R.: *Food Res. Int.* 59, 16 (2014).
 50. Wu J., Lin L., Chau F.: *Ultrason. Sonochem.* 8, 347 (2001).
 51. Eskilsson C. S., Björklund E.: *J. Chromatogr. A* 902, 227 (2000).
 52. Heng M. Y., Tan S. N., Yong J. W. H., Ong E. S.: *Trends Anal. Chem.* 50, 1 (2013).
 53. Takeuchi T. M., Pereira C. G., Braga M. E. M., Maróstica M. R., Leal P. F., Meireles M. A. A., v knihe: *Extracting Bioactive Compounds for Food Products – Theory and Applications* (Meireles M. A. A., ed.), kap. 4. CRC Press, Boca Raton 2009.
 54. Mandal V., Mandal S. C.: *Biochem. Eng. J.* 50, 63 (2010).
 55. Xu H.-J., Shi X.-W., Ji, X., Du Y.-F., Zhu H., Zhang L.-T.: *Food Chem.* 135, 251 (2012).
 56. Kerem Z., German-Shashoua H., Yarden O.: *J. Sci. Food Agric.* 85, 406 (2005).
 57. Woldemichael G. M., Wink M.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2327 (2001).
 58. Kuljanabagavad T., Thongphasuk P., Chamulitrat W., Wink M.: *Phytochemistry* 69, 1919 (2008).

L. Tmáková, S. Sekretár, J. Hlásniková, L. Vrbičková, and Š. Schmidt (*Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Biosynthesis and Isolation of Plant Saponins**

Saponins are polar compounds occurring in plants; their separation and identification are still problematic. Most of them must be purified by chromatography. The present review deals with theoretical background of biosynthesis and isolation of saponins from plant materials using both conventional and novel techniques. Several extraction techniques have been developed as alternatives to conventional extractions, offering certain advantages.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH CHMELOVÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ METODOU HPLC-PDA VE CHMELOVÉM MATERIÁLU

TEREZA HUDCOVÁ, HANA SKOUPÁ, LUKÁŠ
JELÍNEK, MARCEL KARABÍN a PAVEL
DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavel.dostalek@vscht.cz

Došlo 9.6.14, přepracováno 17.10.14, přijato 18.11.14.

Klíčová slova: chmelové prenylflavonoidy,
8-prenylnaringenin, isoxanthohumol, xanthohumol

Úvod

Chmel je důležitým zdrojem biologicky aktivních sekundárních metabolitů, z nichž řada vykazuje pozitivní účinky na lidské zdraví. Farmaceuticky důležitými látkami obsaženými ve chmelu jsou především prenylované flavonoidy, řadící se mezi polyfenolové sloučeniny^{1–3}. Majoritním prenylflavonoidem chmele je chalkon xanthohumol, jehož koncentrace v chmelových hlávkách se pohybuje v závislosti na odrůdě a ročníku sklizně v rozmezí 0,2–1,1 hm.% (cit.⁴).

Pozitivních zdravotních účinků prenylflavonoidů je známa celá řada. Působí antioxidačně a zpomalují tak průběh patologických procesů, jako je např. rakovina, ateroskleróza či infarkt myokardu. Značná pozornost je v současné době věnována především antikarcinogenním účinkům prenylflavonoidů. Xanthohumol a ostatní prenylflavonoidy účinně inhibují proliferaci nádorových buněk a zabraňují tak růstu karcinomu a vzniku metastáz, přičemž působí především na buňky lidského karcinomu prsu, vaječníku a tlustého střeva^{1–4}. Mechanismus chemopreventivního účinku xanthohumolu a ostatních prenylflavonoidů na růst nádoru v rané fázi spočívá v inhibici metabolické aktivace prokarcinogenů a indukci karcinogendetoxifikačních enzymů. Mechanismus antikarcinogenních účinků prenylflavonoidů na růst nádoru v pokročilém stádiu zahrnuje inhibici DNA syntézy, inhibici angiogeneze a potlačení vzniku zánětů¹.

Dalším významným účinkem prenylflavonoidů, zejména 8-prenylnaringeninu, je jejich estrogenní aktivita, díky které jsou schopny alternovat lidské steroidní hormony – estrogeny, a potlačovat tak klimakteriální symptomy či snižovat riziko vzniku nádorových onemocnění spojených s hormonálním systémem⁴.

Jediný zdroj prenylflavonoidů v lidské výživě je pivo, ovšem vzhledem k jejich velice nízkým obsahům v konečném produktu je nutno konstatovat, že běžnou konzumací piva není možné dosáhnout koncentrace těchto látek v plazmě v takové míře, aby vykazovaly výraznější pozitivní účinky na lidské zdraví⁵. Xanthohumol je sice majoritní prenylflavonoid v chmelových hlávkách, ovšem v hotovém pivu se nachází jen ve velmi nízké koncentraci (většinou nižší než 0,1 mg l⁻¹). Prostřednictvím isomerace, při které dochází k cyklizaci přes hydroxylovou skupinu, je xanthohumol v průběhu výroby piva přeměňován až z 95 % na isoxanthohumol, což je prenylflavonoid nejvíce zastoupený v konečném produktu.

Vzhledem k řadě pozitivních účinků chmelových prenylflavonoidů na lidské zdraví, jsou nejnovější výzkumy zaměřeny na to, jak zvýšit jejich příjem ve výživě. Možným řešením mohou být potravinové doplňky obsahující biologicky aktivní látky z chmele.

Vzhledem k využití chmelových prenylflavonoidů v potravinářském a farmaceutickém průmyslu je nyní kladen důraz na zdokonalení metod pro kvantifikaci těchto biologicky aktivních látek. Cílem naší práce byl vývoj spolehlivé analytické metody využívající HPLC-PDA (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem) pro stanovení všech významných prenylovaných flavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) ve chmelových materiálech (chmel, chmelové výrobky, vedlejší produkty zpracování chmele, potravinové doplňky na bázi chmele). Pro účel analýzy prenylflavonoidů byla vyvinuta metoda založená na kombinaci extrakčního postupu vycházejícího z běžně používaných metod pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chmelu⁶ a modifikovaného chromatografického stanovení převzatého z metody Dhooghe a spol.⁷

Experimentální část

Chemikálie

Pro extrakci chmelového vzorku byl použit methanol, p. a. (Sigma-Aldrich, SRN) a diethylether, p. a. (Lachner, ČR). Na okyselení roztoku byla použita kyselina chlorovodíková, p. a. (38%, Penta, ČR). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN) a demineralizovaná voda. Na okyselení mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí, p. a. (Penta, ČR). Standardy xanthohumolu (Hopsteiner, SRN), isoxantho-

humolu (Toroma Organics, SRN), a 8-prenylnaringenin (Toroma Organics, SRN) byly čistoty 98 % a vyšší.

Přístroje a zařízení

Všechny analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu 1100 Series (Agilent, USA) s kolonou s reverzní fází ECLIPSE XDB-C18, 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm (Agilent, USA) a PDA detektorem (Agilent, USA). Na přípravu ultračisté vody byl použit přístroj MILLI Q RG (Millipore, USA). Při přípravě vzorku byly použity kalibrované laboratorní váhy (třída přesnosti I), třepačka LT2 (Kavalier, ČSR), vakuová odparka RWO6-ML (Ika Werke, SRN) a ultrazvuková lázeň (JP Selecta, Španělsko). Vzorky byly filtrovány přes teflonové (PTFE) filtry (velikost pórů 0,2 μm), (Whatman, SRN).

Analyzovaný materiál

K analýze prenylovaných látek byl použit zbytkový materiál získaný extrakcí chmelových hlávek české vysokoobsažné chmelové odrůdy Vital superkritickým oxidem uhličitým. Tato odrůda byla vyšlechtěna s ohledem na její využití ve farmaceutickém průmyslu, je charakteristická vysokým obsahem prenylovaných flavonoidů – především desmethyloxanthohumolu (0,3–0,4 hm.%), xanthohumolu (0,7–1 hm.%) a alfa (12–16 hm.%) a beta (6–10 hm.%) hořkých kyselin. V důsledku své vyšší polaritě zůstávají prenylflavonoidy (na rozdíl od pryskyřic) v extrakčním zbytku, který se tak může stát vhodnou surovinou pro produkci materiálu s navýšeným množstvím látek s pozitivním účinkem na lidské zdraví⁸.

Postup přípravy vzorku

Chmelový materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku, a poté byl navážen 1 g s přesností na čtyři desetinná místa a extrahován směsí 20 ml methanolu a 100 ml diethyletheru po dobu 30 min na třepačce. Následně bylo do baňky přidáno 40 ml 0,1 M HCl a extrakce na třepačce pokračovala dalších 10 min. Poté byla směs ponechána v klidu po dobu 10 min, aby došlo k dobrému oddělení fází. 25 ml etherové fáze nad sedimentem bylo následně převedeno do 100ml srdcové baňky a veškerý diethylether byl odpařen na vakuové odparce do sucha při laboratorní teplotě. Po odpaření byl extrakt rozpuštěn v 5 ml methanolu a před převedením do vialky byl zfiltrován přes teflonový mikrofiltér.

Připravené vzorky byly analyzovány technikou vysokoučinné kapalinové chromatografie.

Podmínky HPLC analýzy

Mobilní fáze: A – odplyněná demineralizovaná voda (0,05 hm.% mravenčí kyselina); B – odplyněný acetonitril (0,05 hm.% mravenčí kyselina). Gradient (tab. I): Od 0. do 42. minuty se podíl mobilní fáze B lineárně zvyšoval z 35 % na 95 %. Stacionární fáze: reverzní fáze C18, 5 μm ,

Tabulka I

Gradient složení mobilní fáze (obj.%), A – demineralizovaná voda (0,05 hm.% mravenčí kyselina), B – acetonitril (0,05 hm.% mravenčí kyselina)

Čas [min]	A	B
0	65	35
40	38	62
42	5	95
47	5	95

4,6 $\times$ 150 mm, teplota 30 °C, průtok 0,8 ml min⁻¹, detektor PDA, nástřik 10 μl .

Látky byly identifikovány metodou porovnání retenčních časů a absorpčních maxim se standardy. Přesný obsah analyzovaných látek ve vzorcích byl stanoven metodou vnější kalibrace ($n=4$). Rozsah kalibrační přímky byl v 0–420 mg l⁻¹ v případě xanthohumolu (což odpovídá 0–1001 mg/100 g vzorku), 0–15 mg l⁻¹ v případě isoxanthohumolu (0–36 mg/100 g) a 0–16 mg l⁻¹ (0–38 mg/100 g) v případě 8-prenylnaringenin. Retenční časy jednotlivých látek jsou uvedeny v tab. II. Ukázkové chromatogramy zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým jsou na obr. 1 a 2. Xanthohumol byl detegován a vyhodnocen při vlnové délce 370 nm (obr. 1), isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin při vlnové délce 290 nm (obr. 2), což jsou vlnové délky blízké jejich absorpčním maximům (cit.^{7,8}).

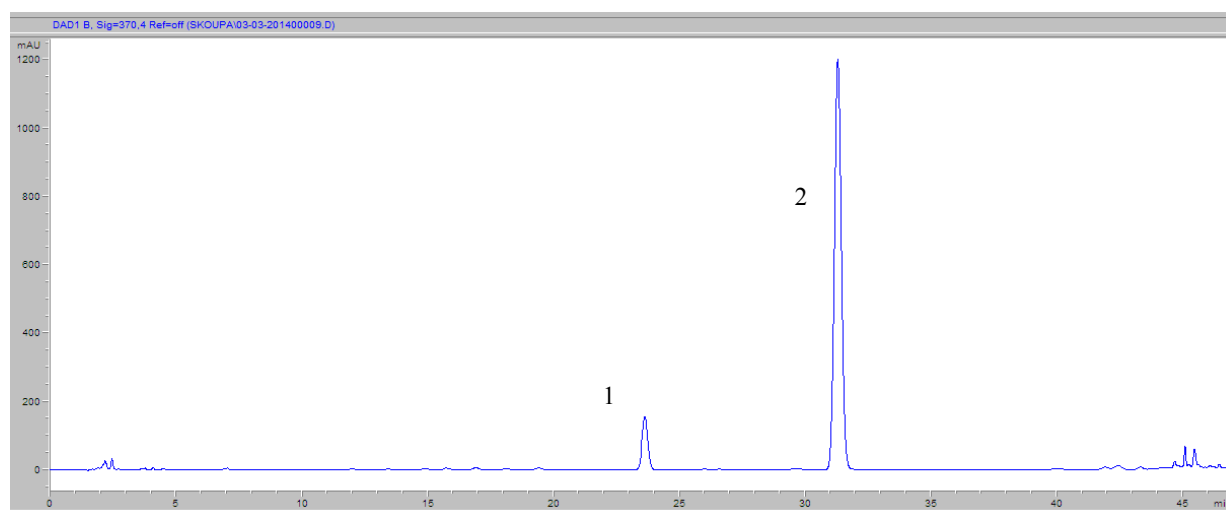
Výsledky a diskuse

Pro potvrzení robustnosti inovované metody byl proces izolace i analýzy prenylflavonoidů ve výchozím materiálu (zbytek po extrakci chmelových hlávek odrůdy Vital superkritickým oxidem uhličitým) opakován desetkrát ($n=10$). Míra proměnlivosti výsledků (opakovatelnost) stanovení koncentrace prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) je nepřímo úměrná vyšší směrodatné odchylky. Průměrná koncentrace xanthohumolu, isoxanthohumolu a 8-prenylnaringenin ve chme-

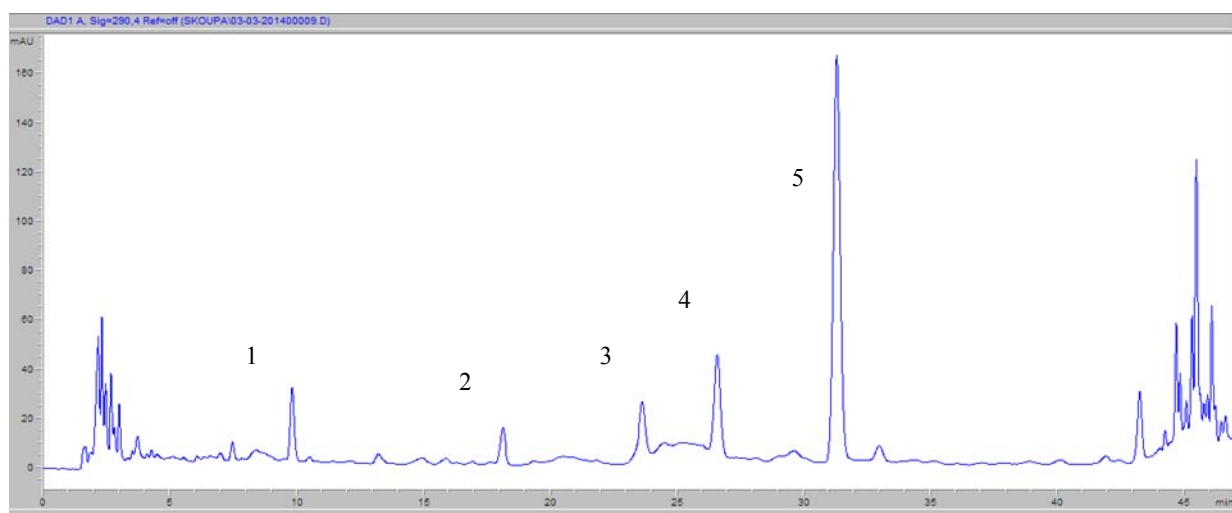
Tabulka II

Základní údaje o retenčních časech jednotlivých prenylflavonoidů při HPLC analýze. Kolona: ECLIPSE XDB-C18, 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), průtok 0,8 ml min⁻¹, vlnová délka λ = 370 nm pro xanthohumol, λ = 290 nm pro isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin

Látka	Retenční čas [min]
Isoxanthohumol	9,9
8-Prenylnaringenin	18,2
Xanthohumol	31,5



Obr. 1. Chromatogram vzorku připraveného ze zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým. Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, průtok 0,8 ml min^{-1} , detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), vlnová délka $\lambda = 370$ nm; 1 – desmethylxanthohumol, 2 – xanthohumol



Obr. 2. Chromatogram vzorku připraveného ze zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým. Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, průtok 0,8 ml min^{-1} , detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), vlnová délka $\lambda = 290$ nm; 1 – isoxanthohumol, 2 – 8-prenylnaringenin, 3 – desmethylxanthohumol, 4 – 6-prenylnaringenin, 5 – xanthohumol

lovém materiálu, směrodatná odchylka a opakovatelnost v rel.% jsou uvedeny v tab. III.

Relativní směrodatná odchylka byla pro všechny stanovené prenylflavonoidy nižší než 4 rel.%, pro isoxanthohumol odpovídá pouhým 1,61 rel.%. Tuto metodu lze považovat za spolehlivou a tedy i za vhodnou pro stanovení prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu.

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantificati-

on) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Podle uzance se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie¹⁰.

Meze detekce (3S/N) a meze stanovitelnosti (10S/N) (cit.⁹) jednotlivých prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100 g) jsou uvedeny v tab. IV.

Jako výchozí metoda byla zvolena běžně užívaná metoda pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chme-

Tabulka III

Opakovatelnost metody při stanovení jednotlivých prenylflavonoidů ($n=10$)

Prenylflavonoid	Průměrná koncentrace [mg/100 g]	Směrodatná odchylka	Opakovatelnost [rel.%]
Xanthohumol	918,01	32,22	3,51
Isoxanthohumol	26,11	0,42	1,61
8-Prenylnaringenin	16,59	0,54	3,28

Tabulka IV

Mez detekce a mez stanovitelnosti metody stanovení jednotlivých prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100g). Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm, detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), průtok 0,8 ml min⁻¹, vlnová délka λ = 370 nm pro xanthohumol, λ = 290 nm pro isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin

Prenylflavonoid	LOD	LOQ
Xanthohumol	0,420	1,398
Isoxanthohumol	0,537	1,791
8-Prenylnaringenin	0,713	2,375

lu, a to z důvodu podobné chemické struktury prenylflavonoidů a hořkých kyselin. Z této metody byl převzat způsob přípravy vzorku, založeného na extrakci vzorku směsí diethylether: methanol, 5:1 (v/v), okyselenou kyselinou chlorovodíkovou, ovšem některé kroky tohoto postupu byly upraveny. Vzhledem k tomu, že námi vyvinutá metoda má sloužit k analýze prenylflavonoidů i v relativně drahých chmelových materiálech, jako jsou potravinové doplňky na bázi chmele, zvolili jsme kvůli nižší finanční náročnosti snížení navážky materiálu z původních 10 g na 1 g, a v důsledku toho bylo nezbytně nutné zakoncentrovat vzorek v konečném kroku přípravy vzorku. Chromatografický krok byl založen na metodě publikované Dhooghe a spol. (2010). Z této metody bylo převzato složení mobilní fáze⁷, ovšem délka analýzy byla prodloužena za účelem zmírnění gradientu vedoucího k lepšímu rozdělení pík v průběhu chromatografické analýzy. Vyvinutá analytická metoda HPLC-PDA je kombinací dvou metod a má pro stanovení koncentrací prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu několik zásadních výhod. Příprava vzorku je rychlá a spotřeba rozpouštědel a vzorků je relativně nízká. Zvolená úprava vzorků a metodika stanovení je vhodná i pro stanovení velmi nízkých koncentrací prenylflavonoidů.

Porovnáním absorpčních spekter je možné identifikovat i desmethylxanthohumol a 6-prenylnaringenin, nicméně prozatím z důvodu nedostupnosti čistých standardů nebyla kvantifikace těchto dvou prenylflavonoidů náplní tohoto článku. Výhodou této metody je také to, že umožňuje stanovit ve vzorku všechny prenylflavonoidy (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, pří-

padně desmethylxanthohumol, 6-prenylnaringenin) v průběhu jedné analýzy, a jelikož se jedná o upravenou metodu na stanovení hořkých kyselin, je pravděpodobné že by tato metoda mohla sloužit i ke stanovení dalších biologicky a technologicky významných látek (alfa a beta hořké kyseliny).

Závěr

Pro účely stanovení prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) ve chmelových materiálech byla vyvinuta metodika, která pomocí systému HPLC-PDA umožňuje kvalitativní i kvantifikativní analýzu všech sledovaných prenylflavonoidů. V rámci vývoje metodiky byly stanoveny její validační parametry (opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti).

Tato práce byla podpořena TA ČR – Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků – TE02000177.

LITERATURA

1. Stevens J. F., Page J. E.: *Phytochem.* 65, 1317 (2004).
2. Gerhäuser C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 827 (2005).
3. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Bughler D. R.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 271 (1999).
4. Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P.: *Chem. Listy* 106, 1095 (2012).
5. Jelínek L., Karabín M., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: *Chem. Listy* 107, 209 (2013).
6. The American Society of Brewing Chemists: *ASBC Methods of Analysis, Hops 14, α - and β -Acids in hops and hop extracts by HPLC.* ASBC, Washington 2009.
7. Dhooghe L., Naessens T., Heyerick A., Keukeleire D. D., Vlietnick A., Pieters L., Apers S.: *Talanta* 83, 448 (2010).
8. Krofta K., Patzak J., Nesvadba V., Mikyška A., Slabý M., Čejka P.: *Kvasny Prum.* 59, 2 (2013).
9. Hofta P., Dostálek P., Basařová G.: *Chem. Listy* 98, 825 (2004).
10. Validační program pro statistické zpracování analytických dat http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf

T. Hudcová, H. Skoupá, L. Jelínek, M. Karabín, and P. Dostálek (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Determination of Bioactive Prenylflavonoids in Hop Materials by HPLC-PDA**

In recent years, an interest in the health-promoting activities of derivatives of hop constituents has grown.

Pharmaceutically important substances in hop are primarily prenylated flavonoids, in the context with their proven biological effects. A reliable analytical method using HPLC-PDA for determination of all prenylated flavonoids (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) in hop materials was developed.

PŘÍRODNÍ LÁTKY KYSELÉ CHUTI

OLDŘICH LAPČÍK^a, ZDENĚK WIMMER^{a,b},
LUBOMÍR OPLETAL^c, JITKA MORAVCOVÁ^a,
JANA ČOPÍKOVÁ^d a PAVEL DRAŠAR^a

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav experimentální botaniky AV ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^c Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,

^d Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
Pavel.Drasar@vscht.cz

Došlo 15.2.15, přijato 17.4.15.

Klíčová slova: přírodní látka, kyselá chuť, doplněk stravy, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus účinku
3. Látky kyselé chuti v potravinách
4. Kyselé komponenty vína
5. Látky ovlivňující vnímání kyselosti
6. Závěr

1. Úvod

V tomto článku, který tvoří další díl naší skládky přírodních látek^{1–11}, se věnujeme látkám vyvolávajícím kyselou chuť. Vnímání různých chutí slouží od nepaměti všem živočichům jako signál o bezpečnosti potravy. Sladká chuť naznačuje zdroj energie, hořká varuje před nebezpečím a slaná napomáhá dodávat organismu sůl, protože „soli je zapotřebí“, jak se říká v jedné známé pohádce. Kyselá chuť naznačuje, že potrava není zcela zralá nebo že může být nahnílá. Ovšem u lidí a možná i u některých zvířat přiměřená konzumace kyselých potravin vyvolává i příjemné pocity a navíc kyselá látka jsou důležité pro dobrou kondici organismu.

Do potravin se přidávají pro zlepšení chuti a vůně, pro inhibici mikrobiální kontaminace a neenzymového hnědnutí a také na zlepšení gelotvorných vlastností, viskozity nebo teploty tání. Jako přídatná látka se v potravinách komerčně využívá např. kyselina octová, adipová, citronová, mléčná, jantarová, fumarová, vinná nebo jablečná.

2. Mechanismus účinku

Ačkoliv se snahy rozpoznat, co způsobuje kyselou chuť (kyselost, angl. sourness), datují již od konce 19. století, kdy byla poprvé spojována se stupněm disociace kyselin, a tedy přímo s účinkem vodíkových iontů¹², stále ještě není její mechanismus zcela objasněn.

Testování kyselé chuti pufrů složených z kyseliny octové a octanu sodného s různým pH a různou celkovou aciditou pro dané pH publikované v roce 1920 ukázalo, že kyselost závisí na obou proměnných. Tedy, že je důležitá jako koncentrace vodíkových iontů, tak koncentrace volné kyseliny¹³. První práce popisující kyselou chuť ve vztahu ke koncentraci kyseliny byla publikována¹⁴ v roce 1935. Autoři ukázali, že různě koncentrované roztoky kyselin chloroctové, octové, mravenčí, vinné a jablečné, které měly stejně kyselou chuť jako 0,0025 M kyselina chlorovodíková, spotřebují stejné množství fosfátového pufru o pH 6,9 na dosažení pH 4,5. Odtud odvodili, že relativní kyselost ekvimolárních roztoků kyselin je nezávislá na koncentraci. Z těchto a dalších prací se traduje jakási kyselostní řada, ve které má zředěná kyselina chlorovodíková index kyselosti 1. Pro srovnání, kyselina vinná má kyselostní index 0,7, kyselina citronová 0,46 a kyselina uhličitá 0,06 (cit.¹⁵). Jiné řazení může být podle klesajícího pocitu kyselosti: kyselina sírová, dusičná, chlorovodíková, chloroctová, fosforečná, dihydroxyvinná, vinná, citronová, mravenčí, mléčná, jablečná, octová, tartronová (hydroxypropandiová), D-galaktouronová, fumarová, propionová, uhličitá.

Vjem kyselosti je úměrný koncentraci protonů v případě anorganických kyselin, které jsou ve vodném roztoku plně disociované, ale pro organické kyseliny to pravda není, což ukazuje i na vliv aniontu. Proto se řada dalších prací věnovala objasnění vlivu aniontu či nedisociované formě organické kyseliny. Kyselá chuť organických kyselin byla dávána do souvislosti např. s jejich hydrofobicitou, která by mohla napomáhat snadnějšímu průchodu kyseliny přes buněčnou membránu receptoru¹⁶. Již dříve bylo totiž zjištěno, že zavedení polárních funkčních skupin do molekuly organické kyseliny její kyselost snižuje¹⁷. Ovšem jiné práce tuto teorii nepotvrdily^{18,19}.

Výsledky řady publikací vedly v roce 1996 k návrhu chemické podstaty kyselé chuti jako analogii neutralizační reakce mezi kyselinou a bází, kde receptor slouží jako báze²⁰.

Už jenom z tohoto krátkého přehledu je jasné, že závěry jednotlivých studií nejsou konzistentní, i když kyselost je považována za „jednoduchou“ základní chuť, protože její vnímání nevyžaduje stereoselektivní interakci složité molekuly s chuťovými receptory. Důvodů rozdílných výsledků může být několik. Předně je to různý způsob nastavení testů. Kyselost látek je testována buď na

dobrovolnicích, zvířatech nebo izolovaných buňkách. Existují zásadní rozdíly ve vnímání kyselé chuti mezidruhové i uvnitř jednoho druhu²¹. Kyselou chuť významně ovlivňují i takové vlastnosti slin, jako je obsah iontů a pufrovací kapacita^{22,23}. Mechanismus účinku silných a slabých kyselin je různý a problém je dále komplikován i tím, že receptorem jsou polarizované epitelové buňky s apikálními a bazolaterálními membránami různých vlastností. Ještě složitější je pak předpovědět a modifikovat kyselou chuť potravin a nápojů obsahujících často směs organických kyselin²⁴.

Pravděpodobný buněčný mechanismus vzniku kyselé chuti na chuťových buňkách zahrnuje především účinek protonů, které mohou přímo blokovat apikální hyperpolarizující K^+ kanály, otevírat Ca^{2+} kanály nebo pronikat do buňky přes apikální Na^+ kanály blokovatelné amiloridem. Ve všech těchto případech dochází k depolarizaci buněčné membrány, a chuťové buňky tak dávají signál k uvolnění neurotransmiterů a mozek vnímá kyselou chuť. Předpokládá se také, že slabé organické kyseliny mohou v neionizované podobě prostoupit buněčnou membránou, následně v intracelulárním prostoru disociovat, a tím vyvolat změnu elektrického potenciálu. Práci zaměřených na buněčný princip vnímání kyselé chuti je publikováno hodně, proto odkazujeme zájemce na referátové články^{21,24,25}.

Nicméně ani po sto letech studia vnímání kyselé chuti nebylo jasno, zda existuje v chuťovém pohárku nějaký speciální protein fungující jako senzor kyselé chuti, ačkoliv jeho hledání bylo vynaloženo velké úsilí. Až v roce 2006 byly zveřejněny dva průlomové články o identifikaci proteinů PKD2L1 a PKD1L3 jako kandidátů na tuto funkci. Experimenty s myšimi buňkami exprimujícími tyto proteiny ukázaly, že reagují specificky na přítomnost kyseliny chlorovodíkové a citronové uvolňováním Ca^{2+} iontů, přičemž při stejné hodnotě pH byla odezva na kyselinu citronovou silnější²⁶. Ve druhé práci byly k pokusům *in vivo* použity geneticky modifikované myši, které neexprimovaly protein PKD2L1 na chuťových buňkách²⁷. Tyto myši veselé konzumovaly okyselenou potravu, kterou normální myši po ochutnání okamžitě odmítly. Buňky exprimující protein PKD2L1 byly překvapivě nalezeny i v míše a autoři předpokládají, že by mohly monitorovat hladinu protonů v nervovém systému. Od roku 2006 bylo publikováno mnoho dalších článků, které v podstatě potvrzují předchozí závěry.

3. Látky kyselé chuti v potravinách

Nejběžnější potraviny, které obsahují přirozeně kyselé složky, jsou ovoce, jako je citron, jablko, višně, broskev, hrozny, pomeranč, tamarind, jahody, hrozno, mango a někdy meloun. Víno může mít také kyselý nádech a chuť, pokud není správně skladováno, podobně jako zkyslé mléko. Bylo popsáno, že děti v USA mají větší požitek z kyselých chutí než dospělí²⁸, přičemž většina potravinářských výrobků kyselé chuti pro děti obsahuje kyselinu citronovou. Nejběžnějšími kyselinami z ovoce

jsou jablečná, citronová, vinná a fumarová.

Mezi prostředky okyselování potravin patří nejčastěji kyseliny fosforečná, octová, adipová, citronová, fumarová, mléčná, jablečná, jantarová, vinná, fosforečná, a glukono- δ -laktón. Jejich kyselost klesá v řadě fosforečná > fumarová > vinná > jablečná > octová > citronová > mléčná > glukonová²⁹. Potravinaři hodnotí i perzistenci kyselé chuti na jazyku a to např. v řadě od nejdélejší: fumarová, mléčná, jablečná, citronová a vinná³⁰.

Merckův Index uvádí jako sloučeninu sladkokyselou chuti kyselinu cyklohexansulfamovou, svíravě kyselou sloučeninu $H_2Fe_4O_{22}S_5$, označovanou jako subsulfát železitý, bromovodík, jehož páry chutnají kysele, a inosin-5-fosfát s příjemnou kyselou chutí³¹.

4. Kyselé komponenty vína

Hlavními komponentami vína, které přispívají k jeho kyselé chuti (aspektu), jsou kyseliny vinná, octová, jantarová, jablečná, citronová, mléčná a galaktouronová³². Kyseliny dávají vínům jejich charakteristickou svěžít, lehce nakyslou chuť, ale přispívají i k trpkosti, hořkosti, slanosti, ovocnému tónu a některé i k vůni. Alkohol, cukry, minerální látky a další komponenty mohou zmírnit kyselost kyselin a dát vínům rovnováhu. Některé kyseliny jsou přirozeně přítomné v základních složkách vína (vinná, jablečná a citronová), zatímco jiné jsou vedlejšími produkty kvašení (kyselina mléčná, jantarová a octová). Vína s malým obsahem kyselin bývají chuťově chudá a plochá.

Nejdůležitější role kyselin v potravinách a tím i ve víně tkví v jejich schopnosti zastavit, nebo alespoň zpomalovat růst mnoha potenciálně škodlivých mikroorganismů, které by chuť vína zhoršily. Druhou důležitou vlastností je schopnost účasti spektra kyselin na transesterifikacích.

Kyselina vinná se v ovoci, kromě vína často nevyskytuje. U vína je však kyselinou převládající. To je důležité, protože je to nejsilnější a chuťově nejvýraznější kyselina přítomná u révových vín a se svými draselnými a vápenatými solemi do značné míry řídí (pufruje) efektivní kyselost (pH) těchto vín. Její kvantitativní nedostatek může tak přispět k mnoha problémům vína.

Kyselina jablečná je jedním z nejrozšířenějších kyselin v ovoci a zelenině, ze kterých jsou vyrobena různá vína. V teplejších klimatech je kyselina jablečná méně zastoupena ve zralých plodech než v chladnějších klimatických podmínkách, ale v obou podnebných pásmech se její koncentrace se zráním zmenšuje. Vyšší koncentrace kyseliny jablečné má tendenci přispět k chuti ostrou kyselostí, takže snížení její koncentrace je často hlavním faktorem při „mírnění“ nebo „vyhlazení“ příliš kyselé chuti moštu. Jeden způsob, jak to udělat, je nechat mošt déle kvasit, neboť 20–30 % původního množství kyseliny jablečné je vydýcháno během fermentace. V případě, že fermentovaná kapalina stále obsahuje příliš mnoho kyseliny jablečné, je třeba podpořit jablečno-mléčné kvašení, kterým se kyselina jablečná převede na slabší kyselinu mléčnou. Vysoký obsah kyseliny mléčné ale může být na škodu, protože při

kvašení může podpořit procesy, které produkují zápach zkaženého mléka nebo kysaného zeli.

Kyselina citronová se v hroznech vyskytuje méně, ale je hlavní v mnoha dalších druzích ovoce a často se přidává do vína ke zvýšení kyselosti, doplnění specifické chuti nebo k zabránění kovové pachuti. U hroznového vína ale zmizí během kvašení v podstatě stejným způsobem, jako kyselina jablečná. Pokud se přidá do téměř hotového vína ke zvýšení kyselosti, kyselina citronová sice dává vínu svěžší chuť, která se však zdá být umělá.

Kyselina octová je těkává a detegovatelná čichem. Jedná se o přirozenou součást většiny vín ve velmi malých množstvích, ale může být i sekundárně tvořena některými bakteriemi ve styku se vzduchem.

Kyselina jantarová je produktem kvašení a bývá ve stopových množstvích ve všech vínech. Chuť, kterou dodává, je směs kyselá, slaná a hořká. Co je ale považováno za významné, je to, že lépe než ostatní kyseliny ve víně má schopnost produkovat bohaté, svěží estery transesterifikací během procesu stárnutí.

Kyseliny askorbová, máselná, sorbová, jantarová, citramalová ((2*R*)-2-hydroxy-2-methyljantarová), dimethylglycerová, galakturonová, glukuronová, glukonová, ketoglutarová, slizová, šťavelová a hroznová jsou také přítomny v hroznovém moštu ve stopových množstvích a přispívají k celkové kyselosti či různým vadám vína ale, co je významné, rozšiřují paletu transesterifikací³³, při kterých se zvolna navozuje rovnováha mezi směsí esterů, volných kyselin a alkoholů a solí kyselin.

5. Látky ovlivňující vnímání kyselosti

Je zajímavé, že slané a kyselé součásti potravy zvyšují navzájem pocit slanosti a kyselosti při nízkých koncentracích, ale mají opačný efekt při vyšších koncentracích. Podobně hořké a kyselé látky mohou buď zvýšit, nebo potlačit druhou chuť v závislosti na koncentraci³⁴.

Kyselý vjem snižuje i extrakt droždí, obsahující více než 20 % rozvětvených aminokyselin, jako leucin, isoleucin a valin z celkového obsahu aminokyselin, a méně než 3 % mononukleotidů³⁵.

Ovšem zcela unikátní sloučeninou potlačující kyselou chuť je protein mirakulin obsažený v červených bobulích keře *Richadella dulcifica*, synonymum *Synsepalum dulcificum*, jehož vlastní je západní Afrika. Protein sám není sladký, ale je schopný kyselou chuť převést na sladkou, např. žvýkání bobule změni kyselou chuť citronu na sladkou chuť pomeranče³⁶. A nejen to. Mirakulin způsobí, že i různé kyseliny (chlorovodíková, šťavelová, mléčná, mravenčí, octová a citronová) chutnají sladce a síla vjemu závisí na kyselosti a pH roztoku kyseliny³⁷. Mirakulin je glykoprotein složený ze 191 aminokyselin a obsahuje dva oligosacharidové epitopy navázané na Asn-42 a Asn-186; molekulová hmotnost je 42,6 kDa (cit.^{38,39}). Pravděpodobný mechanismus účinku mirakulinu spočívá v jeho navázání na membránu chuťového receptoru v těsném sousedství receptoru pro sladkou chuť. V kyselém prostředí se změni

konformace proteinu tak, že může druhým ligandovým místem interagovat s receptorem pro sladkou chuť. Tato hypotéza je podložena pozorováním, že vjemy slanosti, hořkosti či sladkosti nejsou ovlivněny po vypláchnutí úst roztokem mirakulinu³⁷.

6. Závěr

Mohlo by se zdát, že objasnění vzniku kyselé chuti, která je vyvolávána tak malou molekulou, jako je oxoniový kation vznikající disociací kyselin, je jednoduché. Jak ale ukazuje tento článek, přesný mechanismus není detailně rozluštěn ani dnes.

Přehled přírodních látek kyselé chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiverzity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, například 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 a grantu NAZV č. QI111A166.

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).
- Čopíková J., Wimmer Z., Lapčík O., Cahlíková L., Opletal L., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 108, 1053 (2014).
- Cejpek K.: Chem. Listy 108, 426 (2014).
- Čopíková J., Moravcová J., Wimmer Z., Opletal L., Lapčík O., Drašar P.: Chem. Listy 107, 867 (2013).
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Voldřich M.: Chem. Listy 106, 903 (2012).
- Jelínek L., Karabín M., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Chem. Listy 107, 209 (2013).
- Krejzová E., Bělohav Z.: Chem. Listy 108, 17 (2014).
- Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 44 (2007).
- Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: Chem. Listy 101, 1002 (2007).
- Opletal L., Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 101, 895 (2007).
- Richards T. W.: J. Am. Chem. Soc. 20, 121 (1898).
- Harvey R. B.: J. Am. Chem. Soc. 42, 712 (1920).
- Beatty R. M., Cragg L. H.: J. Am. Chem. Soc. 57, 2347 (1935).
- McLaughlin S., Margolskee R.F.: American Scientist 82, 538 (1994).
- Gardner R. J.: Chem. Senses Flav. 5, 185 (1980).
- Chauncey H. H., Feller R. P., Shannon I. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 917 (1963).
- Noble A. C., Philbrick K. C., Boulton R. B. J.: Sens.

- Stud. 1, 1 (1986).
19. Norris M. B., Noble A. C., Pangborn R. M.: *Physiol. Behav.* 32, 237 (1984).
 20. Shallenberger R. S.: *Food Chem.* 56, 209 (1996).
 21. DeSimone J. A., Lyall V., Heck G. L., Feldman G. M.: *Resp. Physiol.* 129, 231 (2001).
 22. Lugaz O., Pillias A. M., Boireau-Ducept N., Faurion A.: *Chem. Senses* 30, 89 (2005).
 23. Heinzerling C. I., Stieger M., Bult J. H. F., Smit G.: *Chem. Percept.* 4, 145 (2011).
 24. Da Conceicao Neta E. R., Johanningsmeier S. D., Drake M. A., McFeeters R. F.: *J. Food Sci.* 72, 352 (2007).
 25. Kinnamon S. C.: *Ciba Found. Symp.* 179, (Issue: Mol. Basis Smell Taste Transduct.) 201 (1993). *SciFinder Acc. No.* 1994:601336.
 26. Ishimaru Y., Inada H., Kubota M., Zhuang H., Tomimaga M., Matsunami H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12569 (2006).
 27. Huang A. L., Chen X., Hoon M. A., Chandrashekar J., Guo W., Tränkner D., Ryba N. J. P., Zuker C. S.: *Nature* 442, 934 (2006).
 28. Liem D. G., Mennella J. A.: *Chem. Senses* 28, 173 (2003).
 29. Berry S. K.: *J. Food Sci. Technol.-Mysore* 38, 93 (2001).
 30. Jarrett T. N.: *The Manufacturing Confectioner March*, 58 (2012).
 31. *The Merck Index*, 13th Ed., Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 2001, electronic version by CambridgeSoft, Cambridge.
 32. Wolf L. K.: *Chem. Ing. News*, Sept. 22, 28 (2014).
 33. Keller J.: Winemaking home page; <http://winemaking.jackkeller.net/> staženo 27/10 2014.
 34. Breslin P. A. S.: *Trends Food Sci. Technol.* 7, 390 (1996).
 35. Shimokawa H., Tanisawa J.: JP 2014200212 (2014).
 36. Kurihara K., Beidler L. M.: *Science* 161, 1241 (1968).
 37. Kurihara K., Beidler L. M.: *Nature* 222, 1176 (1969).
 38. Theerasilp S., Kurihara Y. J.: *Biol. Chem.* 263, 11536 (1988).
 39. Theerasilp S., Hitotsuya H., Nakajo S., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y. J.: *Biol. Chem.* 264, 6655 (1989).

O. Lapčík^a, Z. Wimmer^{a,b}, L. Opletal^c, J. Moravcová^a, J. Čopíková^d, and P. Drašar^a (^aIsotope Laboratory, Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, ^bIsotope Laboratory, Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^cDepartment of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, ^dDepartment of Carbohydrate Chemistry and Technology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Natural Taste-Sour Substances**

A brief survey of naturally occurring sour compounds is given. It can contribute to the knowledge of the biodiversity of secondary metabolites which can be utilized among others, in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of this group of mostly secondary metabolites are illustrated. The review is also aimed at teachers and students.

LIPIDY, FUNKČNÉ A ŠTRUKTURÁLNE KOMPONENTY EUKARYOTICKÝCH BUNIEK

EVA DROZDÍKOVÁ
a MARGITA OBERNAUEROVÁ

Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava
obernauerova@fns.uniba.sk

Došlo 11.11.14, prijaté 19.12.14.

Kľúčové slová: homeostáza lipidov, kvasinky, metabolické ochorenia lipidov

Obsah

1. Úvod
2. Glycerofosfolipidy
3. Sfingolipidy
4. Steroly
5. Mastné kyseliny
6. Neutrálne lipidy a lipidové partikuly
7. Homeostáza lipidov
8. Záver

1. Úvod

Lipidy predstavujú veľkú skupinu látok biologického pôvodu ťažko alebo vôbec nerozpustných vo vode. Ako biomolekuly v organizme nemajú katalytickú aktivitu, napriek tomu zastávajú viaceré významné funkcie. Na úrovni organizmu slúžia ako zdroj energie (neutrálne lipidy, mastné kyseliny) alebo ako mediátory signálnych molekúl (sfingolipidy). Na úrovni bunky predstavujú štrukturálny základ bunkových membrán pozostávajúcich z glycerofosfolipidov, sfingolipidov a sterolov. Zastúpenie jednotlivých lipidov v membránovom matrixe určuje fyzikálno-chemické vlastnosti membrán. Okrem toho lipidy svojou schopnosťou vytvárať subdomény s membránovými proteínmi vytvárajú vhodné prostredie pre ich optimálnu katalytickú aktivitu a/alebo stabilitu a tak ovplyvňujú celý rad regulačných a signalizačných funkcií lokalizovaných v týchto membránach.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* so subcelulárnou štruktúrou takmer identickou s vyššími eukaryotami predstavujú po fyziologickej, genetickej a molekulárno-biologickej stránke najlepšie preštudovaný organizmus s kompletne známou sekvenciou genómu a s možnosťou identifikácie homologických génov medzi kvasinkami a vyššími eukaryotami. Z tohto dôvodu sa kvasinky javia

ako ideálny model štúdia mechanizmov participujúcich na udržiavaní homeostázy lipidov aplikovateľných aj na vyššie eukaryoty.

Cieľom tohto článku je poukázať, na základe poznatkov získaných štúdiom kvasinkového modelu, na jednotlivé druhy lipidov ako esenciálnych štrukturálnych a funkčných komponentov eukaryotických buniek a na prepojenie jednotlivých dráh lipidového metabolizmu s cieľom udržania lipidovej homeostázy v podmienkach meniaceho sa environmentu.

2. Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy (fosfolipidy) sú amfipatické molekuly, čo z nich robí ideálne zložky biologických membrán. Pozostávajú z hydrofóbnej (nepolárnej) zložky, ktorá je tvorená reťazcami mastných kyselín naviazaných esterovou väzbou na glycerolovú kostru a z hydrofilnej (polárnej „hlavičky“) časti tvorenej zbytkom kyseliny fosforečnej alebo fosforylovaným alkoholom. Mitochondriálny fosfolipid kardiopín je výnimkou a nesie štyri acylové reťazce naviazané na dve chemicky rôzne fosfatidylové polovice spojené centrálnym glycerolovým mostíkom. Z mastných kyselín najčastejšie sa vyskytujúci vo fosfolipidoch kvasiniek sú kyseliny palmitová (16:0), palmitolejová (16:1), stearová (18:0) a olejová (18:1).

Na základe štruktúry „hlavičky“ možno fosfolipidy rozdeliť do dvoch skupín. K fosfolipidom s zwitteriónovými (nenabitými) hlavičkami patria fosfolipidy s najväčším zastúpením v eukaryotických bunkách a to fosfatidylcholí (PC) a fosfatidyletanolamín (PE). Do skupiny fosfolipidov s anionickou hlavičkou patria fosfatidylinozitol (PI), fosfatidylserín (PS), kyselina fosfatidová (PA), kardiopín a jeho prekursor fosfatidylglycerol (PG)¹. Špecifickou vlastnosťou fosfolipidov je ich polymorfizmus, t.j. schopnosť tvoriť lamelárne, dvojvrstvové (bilayer) a hexagonálne (nonbilayer) štruktúry. Zatiaľ čo PC, PI, PS, CL a PA za fyziologických podmienok pH a osmolarity tvoria spontánne lipidové dvojvrstvy (lipozomy), pre PE je charakteristická hexagonálna štruktúra. Vznik takejto štruktúry je podmienený stupňom saturácie a dĺžkou reťazcov mastných kyselín. Pomer medzi lipidmi tvoriacimi lamelárne a hexagonálne štruktúry determinuje vnútorné zakrivenie membrán². Hoci podiel jednotlivých fosfolipidov sa v bunke mení v závislosti od rastových podmienok (zdroj uhlíka, dostupnosť živín, fáza rastu a teplota), priemerné množstvo fosfolipidov je relatívne konštantné³.

V kvasinkách ako aj v iných eukaryotických bunkách fosfolipidy tvoria až 70 % lipidového matruxu membrán. Dvojvrstva fosfolipidov je základom štruktúry biologických membrán. Ich vlastnosti sú podmienené chemickými

a fyzikálnymi vlastnosťami membránových lipidov. Náboj membránového povrchu závisí od obsahu negatívne nabitých fosfolipidov, hrúbku membrány ovplyvňuje dĺžka acylových reťazcov lipidov. Fluidita membrány pri danej teplote závisí od druhu lipidov a nasýtenosti acylových reťazcov⁴.

Fosfolipidy v bunkách zohrávajú viaceré významné úlohy. Patrí medzi ne zabezpečovanie semipermeability bunkovej membrány a membrán bunkových organel. Ako komponenty biomembrán vytvárajú prostredie pre mnohé katalytické procesy v bunkách, aktívne sa zúčastňujú na prenose energie a signálov, participujú na transporte rozpustných látok, transporte proteínov a sekrécii⁵.

Miestom syntézy (fosfolipidov) v eukaryotickej bunke je endoplazmatické retikulum (ER). Syntéza vychádza z ich spoločného prekursora kyseliny fosfatidovej (PA). Z nej ďalej vznikajú cytidindifosfát-diacylglycerol (CDP-DAG) a diacylglycerol (DAG), ktoré slúžia ako prekursor syntézy anionických a nenabitých (zwitteriónových) fosfolipidov prostredníctvom dvoch alternatívnych dráh. V prvej dráhe cez CDP-DAG reakciou so serínom, inozitolom a glycerolom vznikajú PS, PI, PG a CL. V druhej tzv. Kennedyho dráhe reakciou DAG s CDP-cholínom, CDP-etanolamínom vznikajú PC a PE (cit.⁶).

3. Sfingolipidy

Sfingolipidy sú ďalším významným lipidovým komponentom biologických membrán. Na rozdiel od ostatných lipidov, základom ich štruktúry je sfingozínová kostra. Väzbou substituentov na sfingozínovú bázu v polohách C1 a C2 vznikajú tri základné skupiny sfingolipidov. Ceramidy vznikajú väzbou rôznych druhov mastných kyselín na C2 uhlík sfingozínu. Ďalšia skupina, sfingomyelíny (fosfosfingolipidy), sú tvorené sfingozínom, na ktorý je naviazaná buď fosfocholínová alebo fosfoetanolamínová skupina, ktorá im dodáva celkový tvar podobný fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu. Tretou skupinou sú glykosfingolipidy, ktorých „hlavičku“ tvoria jednoduché cukry alebo oligosacharidy, čo spôsobuje značnú diverzitu v ich štruktúre. Tá im umožňuje špecifické interakcie s fosfolipidmi, sterolmi a s polárnymi skupinami ďalších molekúl⁷. Sfingozínová báza sfingolipidov a ceramidy sú vo všetkých druhoch eukaryotických organizmov syntetizované v ER, následne sú transportované do Golgiho aparátu (GA), kde sú ďalej segregované a modifikované a prostredníctvom sekrečných vezikul transportované v rámci bunky. Okrem plazmatickej membrány sa sfingolipidy našli vo vakuolách a v stopových množstvách aj v mitochondriách⁸. Podiel sfingolipidov predstavuje 3 až 10 % z celkového množstva membránových lipidov.

Sfingolipidy participujú na mnohých fyziologických procesoch v bunke. Slúžia ako signálne molekuly pri regulácii bunkového delenia, adhézii buniek, odpovedi buniek na stresové podmienky prostredia, bunkovej smrti či regulácii glukózového a glycerofosfolipidového metabolizmu⁹. Najviac sú zastúpené v nervovom tkanive¹⁰.

Biosyntéza zahŕňa 11 reakcií. Prvých deväť reakcií prebieha v ER, ďalšie tri sa uskutočňujú v GA. Prvým krokom je kondenzácia serínu a palmitoyl-CoA, čoho výsledkom je vznik 3-ketosfingánínu. Táto reakcia je konzervovaná od kvasiniek až po ľudí. Redukciou 3-ketosfingánínu ďalej vzniká dihydrosfingozín, ktorý je acylovaný na dihydroceramid. Desaturáciou dihydroceramidu vzniká ceramid a ďalšími reakciami komplexné sfingolipidy¹¹.

4. Steroly

Steroly sú ďalšie esenciálne komponenty eukaryotických membrán. Ich chemická štruktúra v rámci jednotlivých druhov organizmov varíruje v rozmiestnení nenasýtených väzieb a substituentov v ich cyklickej štruktúre. V bunke sa vyskytujú vo voľnej alebo esterifikovanej forme ako sterol estery¹². Počas logaritmického rastu je hladina sterol esterov veľmi nízka. K jej zvyšovaniu dochádza pri vstupe kultúry do stacionárnej fázy¹³.

Prekursorom všetkých sterolov je cyklický polyizopren. Steroly sú amfipatické molekuly schopné vytvárať dvojvrstvové štruktúry, ale keďže neobsahujú fosfátovú „hlavičku“, nie je možné ich zaradiť medzi fosfolipidy¹².

Medzi najvýznamnejšie zastúpené steroly v kvasinkách patria ergosterol a lanosterol, ktoré tvoria 20–30 % z celkového množstva lipidov v bunke. U cicavcov je dominujúcim membránovým sterolom cholesterol, u rastlín sitosterol a stigmasterol. Jemné rozdiely v biosyntetických dráhach a štruktúre cholesterolu a ergosterolu sú využívané hlavne v humánnej terapii pri liečbe fungálnych ochorení. V eukaryotických bunkách sa až 50–90 % sterolov prítomných v bunke nachádza v cytoplazmatickej membráne a v membránových vezikulách⁷.

V biologických membránach sú steroly včlenené medzi fosfolipidy, kde zabezpečujú štrukturálnu stabilitu membrány. Pomer v zastúpení fosfolipidov a sterolov ovplyvňuje na jednej strane fluiditu membrány tým, že steroly zabraňujú príliš tesnému kontaktu medzi acylovými reťazcami jednotlivých fosfolipidov a na druhej strane steroly poskytujú membráne mechanickú stabilitu sprostredkovanú interakciou medzi ich steroidným jadrom a acylovými reťazcami mastných kyselín fosfolipidov¹⁴.

Schopnosť sterolov interagovať s acylovými reťazcami lipidov je predpokladom vzniku špecializovaných domén v rámci štruktúry membrán, tzv. lipidových raftov¹⁵. Tieto mikrodomény sú zhluky membránových lipidov (sterolov, sfingolipidov a fosfolipidov) a proteínov v polotekutej usporiadanej fáze, kým okolitá membrána je neusporiadaná a výrazne fluidnejšia¹⁶. Teória vzniku lipidových raftov umožňuje vysvetliť mnohé kľúčové procesy v bunkách, ako je transport membránových proteínov, prenos signálov, reorganizácia cytoskeletu alebo asymetrický rast buniek¹⁷. Bolo ukázané, že silná asociácia cholesterolu a sfingolipidov v lipidických raftoch s najväčšou pravdepodobnosťou zodpovedá za ich nerozpustnosť v neiónových detergentoch pri 4 °C. Táto vlast-

nosť sa využíva na extrakciu membránových frakcií, rezistentných k detergentom (DRM – detergent resistant membrane) a bohatých na sfingolipidy a cholesterol, ktoré sú považované za biochemické ekvivalenty lipidových raftov¹⁸.

Biosyntéza ergosterolu predstavuje vyše 20 reakcií, pričom väčšina z nich je lokalizovaná v ER. Začína sa tvorbou farnesylpyrofosfátu (FPP) prostredníctvom tzv. mevalonátovej dráhy. FPP je následne sledom ďalších 11 reakcií konvertovaný na konečný produkt ergosterol¹⁹.

Dôležitým prekursorom ergosterolu je skvalén. Za bežných podmienok je hladina skvalénu v bunke veľmi nízka, pretože je takmer okamžite spracovaný a premenený na ergosterol. Premena skvalénu na skvalén epoxid je jediná reakcia z celej biosynthetickej dráhy ergosterolu, ktorá na svoj priebeh nevyhnutne potrebuje kyslík. Pri anaerobióze sa syntéza ergosterolu v tomto bode zastavuje a dochádza k akumulácii skvalénu²⁰.

5. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) patria medzi esenciálne komponenty buniek. Hydrofóbnosť povaha acylových reťazcov im umožňuje podieľať sa na tvorbe dvojvrstvovej štruktúry biologických membrán. Okrem tejto štruktúrálnej funkcie MK predstavujú za určitých podmienok aj energetickú zásobu buniek.

MK prítomné v bunkách pochádzajú buď z *de novo* syntézy, z rastového média alebo z „turnoveru“ (degradčných reakcií) lipidov. Zatiaľ čo *de novo* syntéza MK prebieha v cytosole, všetky enzýmy participujúce na desaturácii a elongácii MK sú lokalizované v membráne ER (cit.²¹). Syntéza MK sa uskutočňuje dvoma nezávislými dráhami. Cytosolickou dráhou, ktorou je syntetizovaná väčšina MK, čo zodpovedá dráhe „eukaryotického“ typu I a dráhou „mitochondriálneho“ typu II, ktorá je podobná bakteriálnej biosyntéze MK (cit.²²).

Mechanizmus syntézy a elongácie MK je rovnaký u všetkých typov buniek, líši sa len rozdielmi v dĺžke a v stupni nenasýtenosti acylových reťazcov MK. Syntéza začína karboxyláciou acetyl-CoA na malonyl-CoA, ktorý slúži v ďalších cyklicky sa opakujúcich syntetických reakciách ako donor dvoch uhlíkov. U kvasiniek sú prevažne syntetizované acylové reťazce o dĺžke 16 a 18 uhlíkov, pričom ich vzájomný pomer ovplyvňuje fluiditu membrány. Acylové reťazce MK o dĺžke C26 sú esenciálnymi komponentami sfingolipidov a GPI-kotiev²³.

Mononenasýtené MK predstavujú asi 70–80 % celkového obsahu MK v kvasinkách. Syntetizujú sa v ER zo saturovaných acyl-CoA prekursorov MK. Sú pre bunku esenciálne⁴. Acyl-CoA reťazce MK sú nepostrádateľnými prekursorami pre všetky acylačné reakcie participujúce pri syntéze fosfolipidov, TAG, ceramidov, steryl esterov a tiež pri proteínových acyláciách²¹.

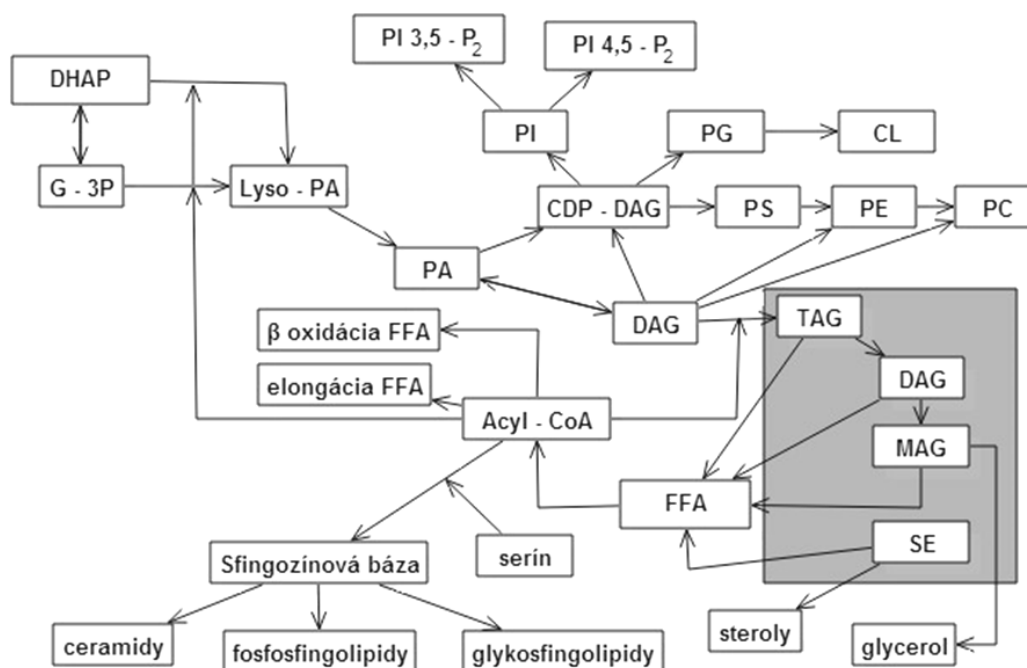
6. Neutrálne lipidy a lipidové partikuly

Neutrálne lipidy sú hydrofóbnosť molekuly neobsahujúce vo svojej štruktúre polárne skupiny. Medzi hlavné neutrálne lipidy prítomné v eukaryotických bunkách patria triacylglyceroly (TAG) a steryl estery (SE), ktoré sú syntetizované v ER. Slúžia nielen ako zdroje energie (hlavne TAG), ale predstavujú aj stavebné prvky bunkových membrán (produkty ich lipolýzy). Za bežných podmienok neutrálne lipidy nie sú schopné začleniť sa do membránových štruktúr, v dôsledku čoho agregujú a vytvárajú hydrofóbnosť vnútrobunkové útvary, tzv. lipidové partikuly (LP)²⁴. Pôvodne sa predpokladalo, že LP slúžia len ako zásobáreň molekúl bohatých na energiu²⁵. Výskumy z posledných rokov ukázali, že LP zohrávajú významnú úlohu pri udržiavaní homeostázy lipidov, tvorbe membrán a pri delení buniek. Tiež ochraňujú bunku pred vplyvom cytotoxických lipidov a lipidových intermediátov (voľné MK, skvalén) a účinkom abnormálnych proteínov⁴. Akumulácia alebo nesprávna funkcia LP vplyva aj na patogenézu humánnych ochorení ako sú ateroskleróza, diabetes alebo obezita²⁶.

Lipidová partikula sa skladá z hydrofóbnosť jadra tvoreného TAG a SE, ktoré je od cytoplazmy oddelené fosfolipidovou monovrstvou²⁷. Na povrchu LP sa nachádzajú špecifické proteíny, ktoré sú prítomné aj na povrchu membrány ER. Prevažnú časť týchto proteínov predstavujú enzýmy metabolizmu lipidov, ako sú enzýmy biosyntézy a degradácie TAG, SE alebo enzýmy biosyntézy steroľov a PA (cit.²⁸). Zastúpenie fosfolipidov v monovrstve LP sa líši od ich zastúpenia v plazmatickej membráne, v membráne ER alebo GA (cit.²⁹). V LP kvasiniek a cicavčích buniek je najhojnejšie zastúpeným fosfolipidom PC, ktorého podiel predstavuje až 60 % (cit.³⁰). Podiel ďalších fosfolipidov klesá v poradí PE, PI a PS (cit.³¹). Hromadenie PA je len minimálne, čo súvisí s jej úlohou skôr ako intermediátu metabolizmu fosfolipidov, než ako konečného funkčného produktu. Jej bezprostredný metabolický „následník“ diacylglycerol sa v LP akumuluje vo významnom množstve, hoci jeho presné rozmiestnenie medzi jadrom a povrchom LP nie je presne známe³⁰.

Biogenéza LP je ešte zatiaľ stále predmetom vedeckých diskusií. Najpreferovanejšou teóriou je tzv. hypotéza pučania, podľa ktorej sa novosyntetizované TAG a SE hromadia do mikrodomén medzi lipidovými dvojvrstvami ER. Počas pokračujúcej syntézy TAG a SE sa tvoria prekursori zreých lipidových partikul, ktoré sa po dosiahnutí určitej kritickej veľkosti uvoľňujú do cytoplazmy³².

Kvasinky *S. cerevisiae* akumuluju LP počas vstupu kultúry do stacionárnej fázy rastu. V tomto štádiu môžu predstavovať až 70 % z celkového obsahu lipidov v bunke³³. Ich veľkosť závisí od fázy rastu, pričom najväčšie sú prítomné v stacionárnej fáze. LP vznikajú aj ako dôsledok zvýšenej syntézy alebo príjmu lipidov³⁴. Rast LP môže byť spôsobený aj vzájomnou fúziou LP alebo ich dočasným opätovným pripojením k membráne ER, kde sa do vnútra LP dostávajú ďalšie neutrálne lipidy³⁵.



Obr. 1. Schematické znázornenie prepojenia metabolických dráh syntézy a degradácie lipidov v bunkách kvasiniek. Obsah lipidovej partikuly – sivý obdĺžnik, Acyl-Co-A – acyl-koenzým A, CDP-DAG – cytidindifosfát-diacylglycerol, DAG – diacylglycerol, DHAP – dihydroxyacetónfosfát, FFA – masné kyseliny, FFA-Co-A – aktívované masné kyseliny, G-3P – glycerol-3-fosfát, Lyso-PA – kyselina lysofosfatidová, MAG – monoglyceroly, PA – kyselina fosfatidová, PC – fosfatidylcholín, PE – fosfatidyletanolamín, PI – fosfatidylinozitol, PI-3,5-P₂ – fosfatidylinozitol-3,5-bisfosfát, PI-4,5-P₂ – fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát, PS – fosfatidylserín, SE – steryl estery, TAG – triacylglyceroly

Východiskovými molekulami syntézy TAG sú glycerol-3-fosfát (G-3-P) alebo dihydroxyacetónfosfát (DHAP). Z nich sledom reakcií vzniká 1-acyl-G-3-P, ktorý je ďalšími acylačnými reakciami konvertovaný na PA. Defosforyláciou PA vzniká DAG, z neho ďalším acylačným krokom vzniká TAG (cit.²⁵). TAG slúži ako zdroj DAG a voľných MK pre syntézu membránových fosfolipidov.

SE môžu vzniknúť acyláciou sterolov dvoma odlišnými enzymatickými reakciami. Prvou acyl-CoA nezávislou reakciou, kde donorom acylových reťazcov sú fosfolipidy alebo reakciou aktivovaných MK v acyl-CoA závislej reakcii. Podobne ako syntéza TAG aj syntéza SE prebieha v ER, kde sú lokalizované všetky enzýmy týchto dráh²⁵. TAG a SE slúžia pre bunku v čase hladovania ako zdroj voľných masných kyselín, voľných sterolov a DAG na biosyntézu membránových lipidov²⁴.

7. Homeostáza lipidov

Lipidy sú esenciálnymi štrukturálnymi a funkčnými komponentami buniek. Ich skladba v bunke varíruje v závislosti od zdroja uhlíka a fázy rastu, čo úzko súvisí s hladinou prekursorov a produktov jednotlivých biosyntetických, resp. degradačných dráh. Vzájomná prepojenosť

jednotlivých dráh lipidového metabolizmu je schematicky znázornená na obr. 1.

8. Záver

Lipidy sú dôležitým zdrojom a zásobárňou energie, ale aj štrukturálnou a funkčnou súčasťou membrán buniek. Štatistické údaje naznačujú, že 2–3 % ľudskej populácie trpí vrodenou alebo získanou poruchou metabolizmu lipidov. Poruchy v metabolizme lipidov súvisiace s transportom lipidov alebo ich ukladaním v rámci bunky, môžu byť dôsledkom iných chorôb ako sú diabetes, hepatopatia, alkoholizmus alebo ateroskleróza, ktorej klinickým následkom môže byť ischemická porucha srdca, zúženie ciev alebo ďalšie nadväzujúce systémové ochorenia³⁶. Posledné štúdie ukazujú aj na úzky súvis medzi vznikom rôznych druhov rakovinových ochorení a poruchami v homeostáze lipidového metabolizmu³⁷.

Kvasinky sú eukaryotické organizmy s dobre preštudovanými molekulárnymi mechanizmami regulácie metabolizmu lipidov. Výrazné podobnosti medzi kvasinkovými a cicavčiami bunkami, týkajúce sa dráh syntézy a „turnoveru“ lipidov ako aj poznatky o pohybe lipidov vo vnútri, resp. medzi membránami alebo jednotlivými orga-

nelami kvasinkovej bunky, robia tento organizmus vhodným experimentálnym systémom pri hľadaní molekulárnej podstaty ľudských ochorení spôsobených poruchami v metabolizme lipidov s cieľom vyvinúť nové, účinnejšie stratégie ich liečby.

Zoznam skratiek

1-acyl-G-3-P	1-acyl-glycerol-3-fosfát
acetyl-CoA	acetylkoenzým A
acyl-CoA	acylkoenzým A
CDP-DAG	cytidindifosfát-diacylglycerol
CDP-etanolamín	cytidindifosfát-etanolamín
CDP-cholín	cytidindiacyl-cholín
CL	kardiolipín
CTP	cytidíntrifosfát
DAG	diacylglycerol
DHAP	dihydroxyacetónfosfát
DRM	detergent resistant membrane
ER	endoplazmatické retikulum
FFP	farenzylpyrofosfát
G-3-P	glycerol-3-fosfát
GA	Golgiho aparát
GPI	glykofosfatidylinozitol
LP	lipidová partikula
malonyl-CoA	malonyl-koenzým A
MK	mastné kyseliny
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholín
PE	fosfatidyletanolamín
PG	fosfatidylglycerol
PI	fosfatidylinozitol
PS	fosfatidylserín
SE	steryly estery
TAG	triacylglycerol

LITERATÚRA

- Henry S. A., Kohlwein S. D., Carman G. M.: *Genetics* 190, 317 (2011).
- Gruner S. M., Jain M. K.: *Biochim. Biophys. Acta* 818, 352 (1985).
- Carman G. M., Han G. S.: *Annu. Rev. Biochem.* 80, 859 (2011).
- de Kroon A. I., Rijken P. J., De Smet C. H.: *Prog. Lipid. Res.* 52, 374 (2013).
- Palsdottir H., Hunte C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 2 (2004).
- Carman G. M., Henry S. A.: *Prog. Lipid. Res.* 38, 361 (1999).
- Huang X., Withers B. R., Dickson R. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 657 (2014).
- Spincemaille P., Matmati N., Hannun Y.A., Cammue B. P., Thevissen K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 3131 (2014).
- Kihara A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 766 (2014).
- Dowhan, W.: *Adv. Lipobiol.* 2, 79 (1997).
- Guillas I., Zachowski A., Baudouin E.: *Plant. Signal. Behav.* 6, 140 (2011).
- Simons K., Toomre D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31 (2000).
- Koffel R., Tiwari R., Falquet L., Schneider R.: *Mol. Cell Biol.* 25, 1655 (2005).
- Sharma S. C.: *FEMS Yeast Res.* 6, 1047 (2006).
- Simons K., Toomre D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31 (2000).
- Simons K., Sampaio J. L.: *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3, 4697 (2011).
- Dufourc E. J.: *J. Chem. Biol.* 1, 63 (2008).
- George S., Nelson M. D., Dollahon N., Bamezai A.: *Immunol. Cell Biol.* 84, 192 (2006).
- Daum G., Lees N. D., Bard M., Dickson R.: *Yeast* 14, 1471 (1998).
- Leber R., Zinser E., Zellnig G., Paltauf F., Daum G.: *Yeast* 10, 1421 (1994).
- Tehlivets O., Scheuringer K., Kohlwein S. D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 255 (2006).
- Hiltunen J. K., Chen Z., Haapalainen A. M., Wierenga R. K., Kastaniotis A. J.: *Prog. Lipid Res.* 49, 27 (2010).
- Rössler H., Rieck C., Delong T., Hoja U., Schweizer E.: *Mol. Genet. Genomics* 269, 290 (2003).
- Rajakumari S., Grillitsch K., Daum G.: *Prog. Lipid Res.* 47, 157 (2008).
- Daum G., Wagner A., Czabany T., Athenstaedt K.: *Biochimie* 89, 243 (2007).
- Unger R. H., Clark G. O., Scherer P. E., Orci L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 209 (2010).
- Czabany T., Wagner A., Zweytick D., Lohner K., Leitner E., Ingolic E., Daum G.: *J. Biol. Chem.* 283, 17065 (2008).
- Kohlwein S. D.: *J. Biol. Chem.* 285, 15663 (2010).
- Tauchi-Sato K., Ozeki S., Houjou T., Taguchi R., Fujimoto T.: *J. Biol. Chem.* 277, 44507 (2002).
- Chitraju C., Trötz Müller M., Hartler J., Wolinski H., Thallinger G. G., Lass A., Zechner R., Zimmermann R., Köfeler H. C., Spener F.: *J. Lipid Res.* 53, 2141 (2012).
- Krahmer N., Guo Y., Wilfling F., Hilger M., Lingrell S., Heger K., Newman H. W., Schmidt-Supprian M., Vance D. E., Mann M., Farese R. V. Jr., Walther T. C.: *Cell Metab.* 14, 504 (2011).
- Kohlwein S. D., Veenhuis M., Van Der Klei I. J.: *Genetics* 193, 1 (2013).
- Sandager L., Gustavsson M. H., Stahl U., Dahlqvist A., Wiberg E., Banas A., Lenman M., Ronne H., Stymne S.: *J. Biol. Chem.* 277, 6478 (2002).
- Guo Y., Cordes K. R., Farese R. V. Jr., Walther T. C.: *J. Cell Sci.* 122, 749 (2009).
- Fujimoto T., Ohsaki Y., Cheng J., Suzuki M., Shinohara Y.: *Histochem. Cell Biol.*

- 130, 263 (2008).
36. Beller M., Thiel K., Thul P. J., Jäcke H.: FEBS Lett. 584, 2176 (2010).
37. Natter K., Kohlwein S. D.: Biochim. Biophys. Acta 1831, 314 (2013).

E. Drozdiková and M. Obernauerová (*Department of Microbiology and Virology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava*): **Lipids – Structural and Functional Components of Eukaryotic Cells**

Lipids are basic organic components of living cells. These biomolecules do not show catalytic activities. De-

spite this fact, lipids participate in a several important cell functions. At the organism level, they serve as energy sources (neutral lipids, fatty acids) or as mediators of signalling molecules. At the cellular level, lipids (glycerophospholipids, sphingolipids and sterols) are structural components of membranes determining the establishment, maintenance and identity of intracellular compartments. In the membrane matrix, the composition of lipids determines physical and chemical properties of the membrane. In addition, lipids, due to their ability to form subdomains with membrane proteins, create appropriate conditions for optimal catalytic activity and/or stability of proteins and thereby influence several regulatory and signalling functions associated with these membranes.

IZOLÁCIA A CHEMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA PŠENIČNÝCH
ARABINOXYLÁNOVLENKA BLAŽEKOVÁ, SILVIA BIELEČKOVÁ
a VIERA HORVÁTHOVÁ*Katedra biológie, Fakulta prírodných vied Univerzity
sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01
Trnava
lenka.blazekova@ucm.sk, viera.horvathova@ucm.sk*

Došlo 26.6.14, prepracované 26.11.14, prijaté 9.12.14.

Kľúčové slová: arabinoxylány, izolácia, pšenica,
neškrobové polysacharidy

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia chemickej štruktúry a vlastnosti arabinoxylánov
3. Izolácia arabinoxylánov
4. Zdraviu prospešné účinky arabinoxylánov
5. Záver

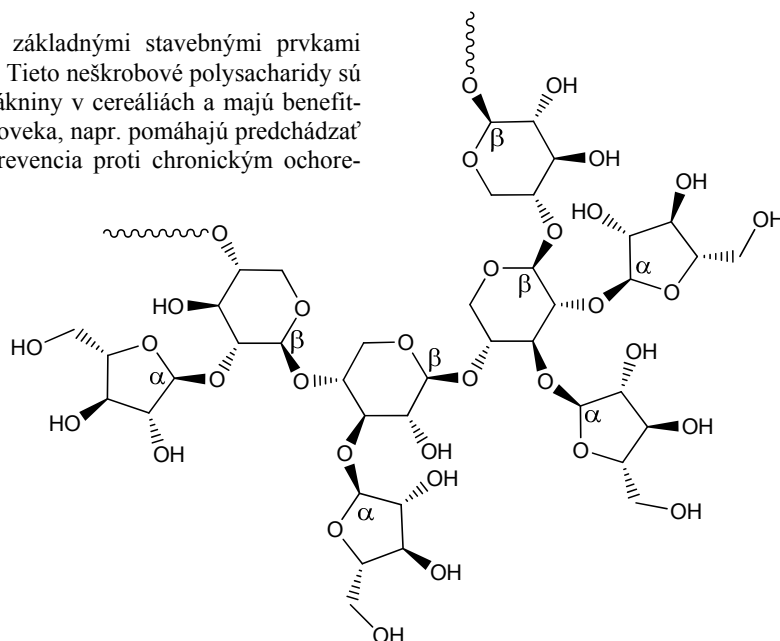
1. Úvod

Arabinoxylány sú základnými stavebnými prvkami bunkovej steny obilnín. Tieto neškrobové polysacharidy sú časťou potravinovej vlákniny v cereáliách a majú benefičné účinky na zdravie človeka, napr. pomáhajú predchádzať obezite a slúžia ako prevencia proti chronickým ochore-

niam typu diabetes, rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, ochorenia gastrointestinálneho traktu. Chemická štruktúra arabinoxylánov je založená na lineárnom reťazci β -(1-4)-D-xylopyranózových jednotiek, ktoré môžu byť substituované α -L arabinofuranózou v O-2 alebo O-3 pozícii alebo v oboch. Menšie zložky arabinoxylánov sú hydroxyškoricové kyseliny, najmä kyselina ferulová, ktoré sú viazané vo forme esteru na O-5 polohe arabinózy.

Na základe rozpustnosti a extrahovateľnosti je možné zaradiť arabinoxylány a glukuronarabinoxylány na vo vode extrahovateľné a neextrahovateľné, tie sa extrahujú alkalicky alebo enzýmovou degradáciou, pričom podľa extrahovateľnosti majú aj arabinoxylány rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti¹. V čiastočne zdrevnatených pletivách (napr. v otrubách) sa nachádzajú vodou neextrahovateľné arabinoxylány, zložené predovšetkým z arabinózy, xylózy a metylovanej kyseliny glukurónovej². V endosperme pletív sú prítomné aj vodou extrahovateľné aj vodou neextrahovateľné arabinoxylány. V pšeničnom endosperme predstavujú celkom 25–30% podiel vo vode extrahovateľných AX a ostatok tvorí vodou neextrahovateľná forma. Celkový obsah arabinoxylánov rovnako ako aj podiel vodou extrahovateľných arabinoxylánov a ich molekulovej hmotnosti závisí od odrôd pšenice³.

V súčasnosti poznáme množstvo metód izolácie a extrakcie arabinopolymérov z pšeničnej múky. Niektoré metódy zahŕňajú náročné kroky a operácie, pri iných vznikajú arabinoxylány obsahujúce značné množstvo kontami-

Obr. 1. Chemická štruktúra arabinoxylánov⁵

nujúcich proteínov a β -glukánov⁴. Jednotlivé postupy sa však môžu líšiť v teplote vody, jednotlivých časových intervaloch v určitých krokoch izolácie.

2. Charakterizácia chemickej štruktúry a vlastností arabinoxylánov

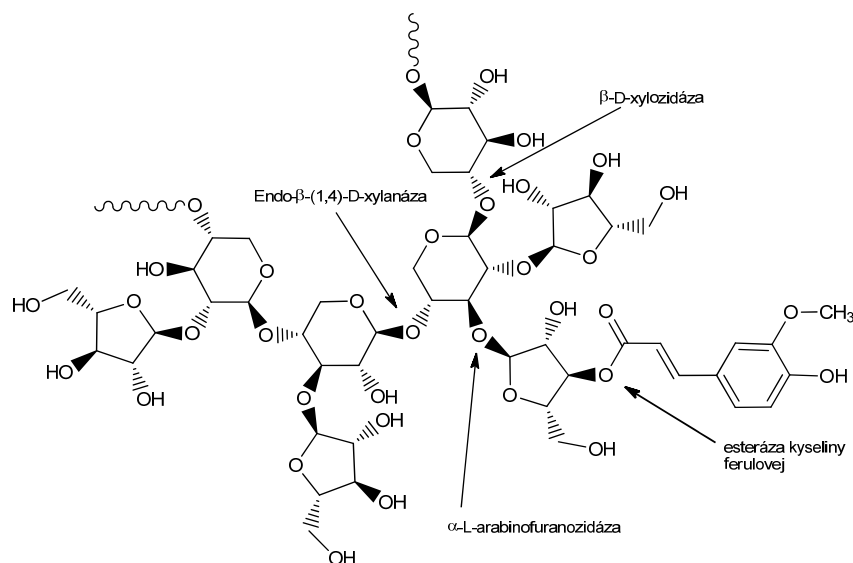
Arabinoxylány (AX) predstavujú hlavné neškrobové polysacharidy prítomné v obilninách⁴. Z hľadiska chemickej štruktúry patria k heteropolysacharidom, pričom základ tvoria pentóзовé jednotky arabinózy a xylózy (obr. 1). Primárnu kostru AX tvoria predovšetkým β -(1-4)-D-xylopyranózové jednotky spojené do polymérneho reťazca. Na polyxylánový reťazec sú naviazané zvyšky α -L-arabinofuranózy, pričom existujú aj prípady, kedy hlavný reťazec tvoria α -L-arabinofuranóze zvyšky, na ktoré sa viažu β -D-xylopyranózové zvyšky. V prípade polyxylánového reťazca sú pozície O-2, O-3 substituované α -arabinofuranózovými zvyškami. Na hlavnú kostru sú naviazané aj zvyšky kyseliny ferulovej a acetylové zvyšky. Kyselina ferulová spája AX s ďalšími komponentami bunkových stien rastlín⁶. V prípade nedostatočného obsahu arabinofuranózových zvyškov v hlavnej hemicelulóze sú v polohe O-2 polyxylánového reťazca naviazané zvyšky kyseliny 4-O-metyl- α -glukurónovej⁷. Acetylové, propiónové, resp. feruloylované zvyšky majú protektívny účinok v ochrane voľných hydroxylových skupín glykozylových zvyškov, ktoré sú tak pripojené k ďalším zložkám vlákny.

Z hľadiska konformácie patria k najstabilnejším arabinózové a xylánové zvyšky. Glukuronoarabinoxylány (GAX) prítomné v bunkových stenách sa líšia od arabinoxylánov naviazanými zvyškami 4-O-metyl- β -D-glukopyranózy kyseliny glukurónovej, ktoré sú substituované v pozícii O-2 na hlavnom polyxylánovom reťazci (obr. 2). GAX nachádzajúce sa prednostne v obalových vrstvách vo

vode neextrahovateľnej forme sa líšia od AX z hľadiska distribúcie bunkových stien pletív⁹. Vo vode extrahovateľné GAX majú 2-O- β -D-xylopyranozyl-L-arabinózový reťazec, ktoré v mitogénnych a komitogénnych testoch vykazujú vysokú imunomodulačnú aktivitu¹⁰. GAX prítomné v pšeničných otrubách majú však veľmi rozvetvenú štruktúru zloženú z β -(1-4)-xylánovej kostry, na ktorú sú pripojené postranné reťazce α -(1-2)- a α -(1-3)-arabinózy. Kyselina glukurónová a jeho 4-O-metyl étery sú prítomné aj v pozíciách neredukujúcich koncov reťazca^{11,12}.

Medzi základ monomérov tvoriach AX sa zaraďujú štyri jednotky: C-(O)-3-disubstituovaná xylóza, C-(O)-3-monosubstituovaná xylóza, nesubstituovaná xylóza a C-(O)-2-monosubstituovaná xylóza¹⁴.

V prípade štiepenia arabinoxylánov na xylooligosacharidy zohrávajú kľúčovú úlohu hlavne endo-1,4- β -xylanázy (EC 3.2.1.8)¹⁵. Ich úlohou je vnútorná hydrolýza xylánovej kostry arabinoxylánov, čím spôsobujú veľké zmeny vo fyzikálno-chemických vlastnostiach AX. β -D-xylanázy patria do rodiny glykozidových hydroláz. Väčšina týchto enzýmov patrí k rodine 10 a 11 glykozidových hydroláz¹⁶. Ako bolo spomínané, štruktúra AX sa skladá z β -(1,4)-xylozylovej kostry, ktorá je v polohe C-(O)-2 a C-(O)-3 substituovaná arabinózovými zvyškami, pričom viazané zvyšky kyseliny ferulovej môžu byť esterifikované v polohe C-(O)-5 na arabinózovom zvyšku. Endo- β -(1,4)-D-xylanáza štiepi vnútorne xylózovú chrbticu, po degradácii reťazca enzýmy β -D-xylozidázy (EC 3.2.1.27) následne štiepia monomérne jednotky xylózy z neredukujúceho konca xylooligosacharidu; α -L-arabinozidáza (EC 3.2.1.55) odstraňuje substituenty arabinózy z xylánového základu a esteráza kyseliny ferulovej (EC 3.1.1.73) hydrolyzuje kyslé skupiny kyseliny ferulovej z arabinózových substituentov¹⁷ (obr. 2).



Obr. 2. Štruktúra AX a miesta pôsobenia xylanolytických enzýmov podieľajúcich sa na degradácii na xylooligosacharid¹⁷

3. Izolácia arabinoxylánov

Na základe rozpustnosti a extrahovateľnosti je možné zatriediť arabinoxylány a glukuronoarabinoxylány (tzv. arabská guma) na vo vode extrahovateľné (VEAX) a neextrahovateľné (VNAX), tie sa extrahujú alkalicky alebo enzýmovou degradáciou (AEAX/ERAX) (obr. 3)¹⁴, pričom podľa extrahovateľnosti majú aj AX rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti¹. Arabinoxylány sú vo veľkej miere prítomné vo vode extrahovateľnej forme, v pšeničnom endosperme predstavujú celkom 25–30 % a ostatok tvorí vodou neextrahovateľná forma¹⁸. Táto je viazaná kovalentne alebo nekovalentne s proteínmi, β -glukánmi, lignínom, resp. pomocou ďalších arabinoxylánových molekúl^{19,20}. Čo sa týka väzieb vodou extrahovateľných arabinoxylánov, tie sú prítomné ako voľne viazané zložky v bunkových stenách frakcií obilného zrna^{21,22}. Neúplná krížová väzba AX s ďalšími komponentmi, štruktúrne rozdiely, resp. enzýmová degradácia v jadre sú faktory zodpovedné za voľnú väzbu VEAX²³.

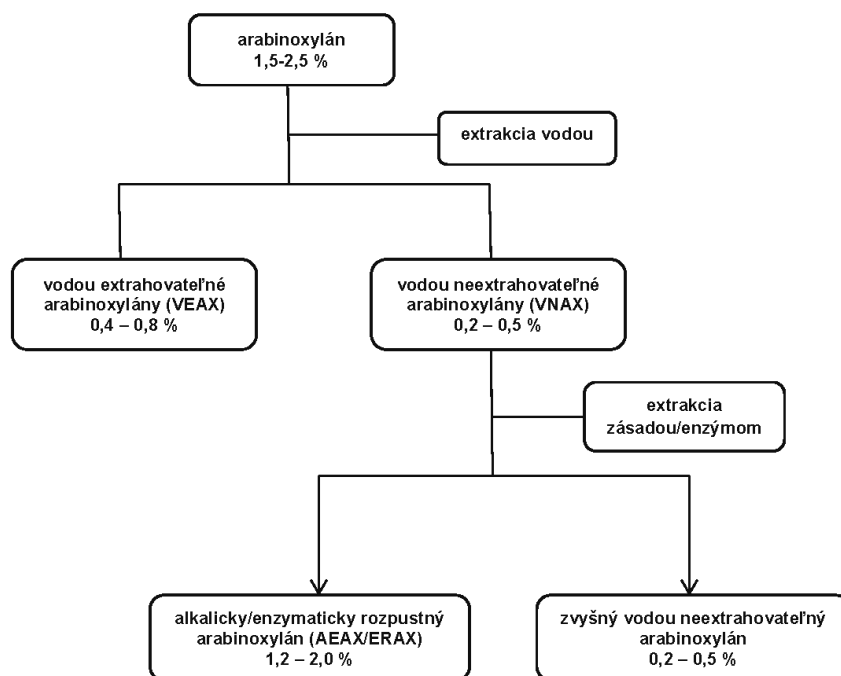
Podľa rozdelených AX sa uvádzajú viaceré spôsoby skúmajúce optimálnu a ekonomicky najvýhodnejšiu izoláciu. Počas izolácie však môže dôjsť k viacerým komplikáciám, napr. arabinoxylány môžu hydrolyzovať, tým dochádza aj k výslednému nižšiemu výťažku izolovaných AX, alebo v neposlednom rade komplikácie spôsobujú koseparované kontaminanty vo forme bielkovín, glukánov alebo polyfenolov.

Výskumy zameriavajúce sa na izoláciu arabinoxylánov používajú ako vstupný materiál najčastejšie pšeničné otruby, nakoľko obsahujú vysoký podiel AX. Práve extrakcia AX by mohla zlepšiť využívanie a zvýšiť tak aj potenciál otrúb, ktoré sú brané ako druhotná surovina pri spracovávaní pšenice na bielu múku²⁴.

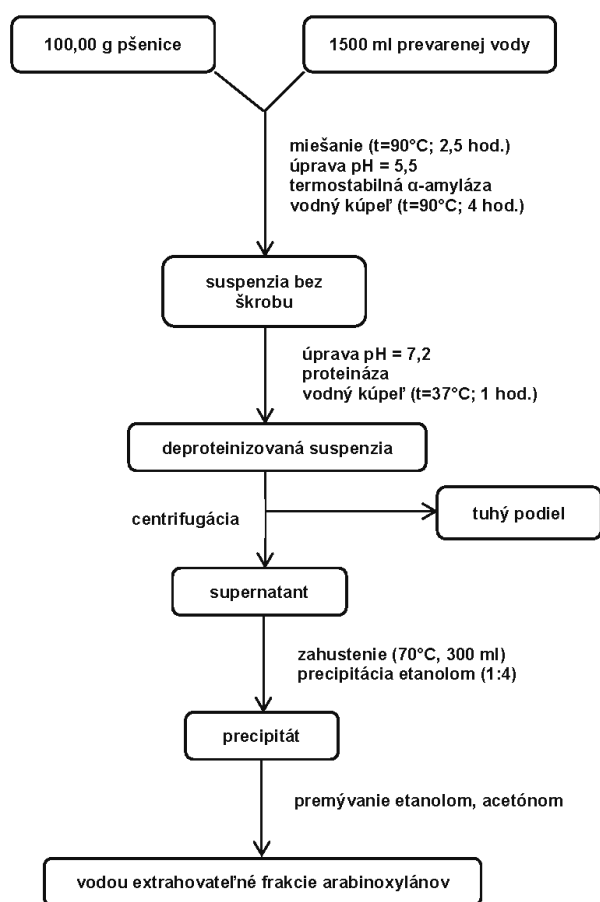
Izolácia vodou extrahovateľných arabinoxylánov

Vo vode extrahovateľná forma arabinoxylánov (VEAX) nie je zosietená v bunkových stenách zvyškami kyseliny ferulovej, čím sa stávajú veľmi dobre rozpustné vo vode. Na ich izoláciu sa používa najčastejšie zohriata destilovaná voda určitej teploty, na základe čoho je aj doba extrakcie časovo rozdielna²⁴.

V súčasnosti existuje čoraz viac jednotlivých postupov na izoláciu, resp. extrakciu AX, pričom postupy sa môžu odlišovať v teplote vody, jednotlivých časových intervaloch v určitých krokoch izolácie^{25,26}. Rao a Muralikrishna²⁷ izolovali vodou extrahovateľné arabinoxylány zo pšenice (obr. 4). Podľa Du a spol.²⁶ sú najvhodnejšou frakciou pšenice pre izoláciu práve otruby. Zaujímavosťou je, že sa neizolujú priamo VEAX, ale najskôr sa vzorka otrúb zmieša s 300 ml priemyselného metylalkoholu (70 %, v/v), ktorá sa pri teplote 80 °C mieša na magnetickom miešadle po dobu 4 h. Takto pripravená suspenzia sa ochladí na laboratórnu teplotu a prefiltruje sa. Filtrát sa premyje 30 ml 70% metylalkoholu a separovaný pevný



Obr. 3. Kategorizácia arabinoxylánov na základe ich extrahovateľnosti, rozpustnosti a ich percentuálne zastúpenie v pšeničnom endosperme¹⁴

Obr. 4. Izolácia vodou extrahovateľných arabinoxylánov²⁷

podiel sa následne suší pri 50 °C počas 12 h. Postup sa používa na purifikáciu otrúb, z ktorých sa následne izolujú VEAX precipitovaním metylalkoholom²⁶.

Vodou extrahovateľné arabinoxylány sú známe pre svoj viskózný charakter a želfovacíu schopnosť.

Izolácia arabinoxylánov pomocou zásad a enzýmov

Terminológia vodou extrahovateľné, vodou neextrahovateľné a alkalicky extrahovateľné arabinoxylány zvyčajne chýba v mnohých výskumných prácach. Courtin a Delcour¹⁴ jasne diskutujú o použití týchto výrazov.

Použitie zásad počas extrakcie AX naruší mostíky medzi arabinoxylánovými molekulami, arabinoxylány sa z bunkovej steny uvoľnia, stanú sa vo vode rozpustné a označujú sa ako alkalicky rozpustné. Alternatívne, enzýmy môžu byť použité na ovplyvnenie extrakcie arabinoxylánov. Endoxylanáza, enzým použitý na hydrolýzu AX, môže byť označený ako enzým extrahovateľný arabinoxylány. Použitie enzýmov zmení molekulovú hmotnosť a funkčnosť AX. Je tiež známe, že enzýmy ovplyvňujú vodou extrahovateľné arabinoxylány.

Alkalicky extrahovateľné arabinoxylány

Zvyšky kyseliny ferulovej viazané na arabinoxylánovú kostru majú podstatný vplyv na vlastnosti AX, aj keď kyselina je prítomná len v malých množstvách. Diméry a triméry naviazanej kyseliny ferulovej spôsobujú zosietenie AX, čoho dôsledkom dochádza k tvorbe vo vode neextrahovateľných arabinoxylánov (VNAX), ktoré sú rozpustné alkalicky alebo enzymaticky.

Je viacero štúdií zameriavajúcich sa na metódy izolácie AX z bunkovej steny obilných frakcií^{28,29}. V pšeničných otrubách tvorí veľkú časť celkových AX alkalicky extrahovateľnú formu. Ich extrakcia je komplikovanejšia v porovnaní s VEAX, nakoľko kovalentná väzba medzi karboxylovými skupinami kyseliny urónovej a hydroxylovými skupinami AX, ako aj tvorba diferulových mostíkov medzi susednými reťazcami arabinoxylánov, sú v priamom vzťahu k ich rozpustnosti³⁰.

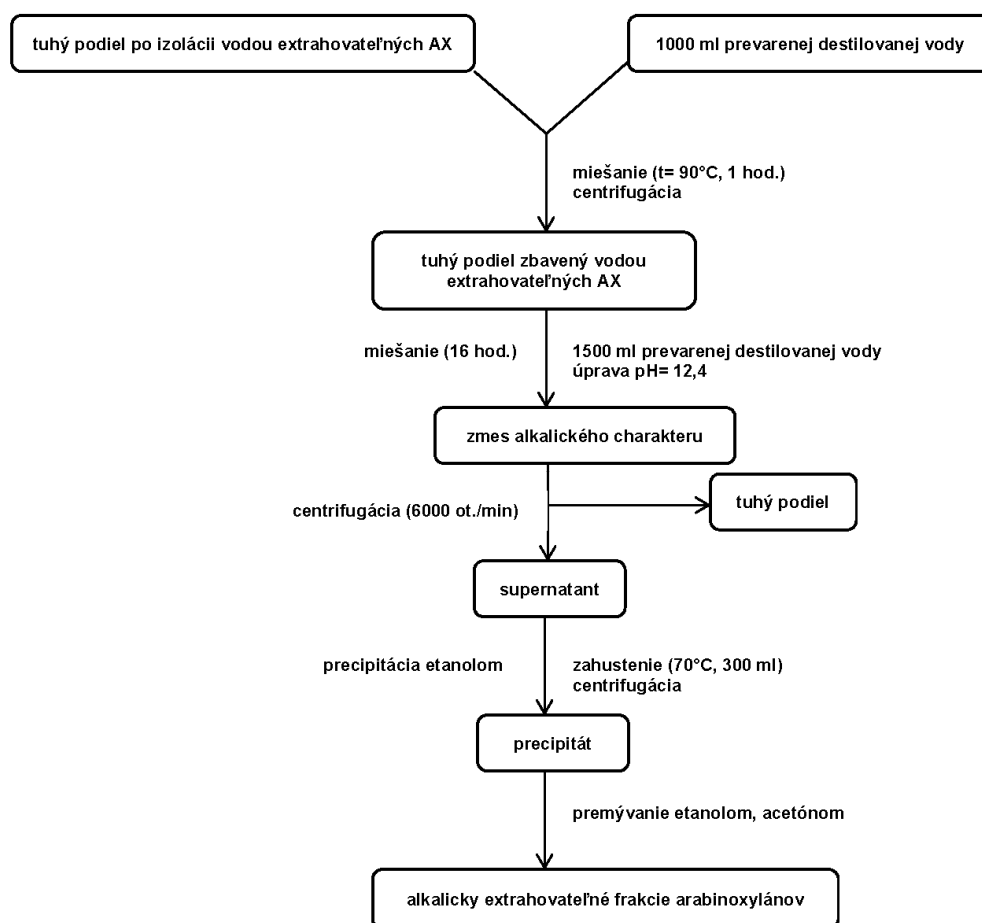
Extrakcia AX pomocou zásad (NaOH, Ca(OH)₂, Ba(OH)₂) je preferovaný spôsob extrakcie AX z bunkovej steny pšeničných otrúb, v niektorých prípadoch sa používa roztok peroxidu vodíka (obr. 5).

Počas alkalickej extrakcie dochádza k deesterifikácii esterov kyseliny ferulovej z α-L-arabinofuranozylového zvyšku, čím sa odstraňujú di- a triferulované zosietené väzby, a tým sa uvoľnia arabinoxylány²⁹. Je však potrebné poznamenať, že nie všetky prítomné molekuly kyseliny ferulovej sa podieľajú na zosietovaní, nezosietené zvyšky sa teda nachádzajú vo vode neextrahovateľných AX. Rizikom pri extrakcii VNAX alkalickými roztokmi je uvoľnenie funkčných skupín AX, hlavne kyseliny ferulovej, čím sa menia funkčné vlastnosti AX²⁸.

V prípade izolácie vo vode neextrahovateľných AX je možné použiť priamo tuhý podiel separovaný v poslednom kroku pri izolácii VEAX. Postup je princípom takmer rovnaký s izoláciou VEAX s rozdielom, že pri samotnej extrakcii VNAX sa používajú alkalické roztoky ako je hydroxid sodný, alebo hydroxid bárnatý²⁶. Niektoré vzorky pred samotnou izoláciou sa podrobia predúprave (v prípade pšeničných otrúb) premývaním priemyselným metylalkoholom.

Enzymaticky extrahovateľné arabinoxylány

Endoxylanáza, resp. (1-4)-β-D-xylohydroláza (EC 3.2.1.8.) je enzým hydrolyzujúci arabinoxylány, pričom často slúži na modifikáciu vlastností arabinoxylánov. Pôsobí vo vnútri hlavného reťazca arabinoxylánov, čím dochádza k uvoľneniu naviazaného vodou neextrahovateľného arabinoxylánu a zároveň degraduje vodou extrahovateľný AX a znižuje molekulovú hmotnosť rozpustného AX (cit.³¹). Endoxylanázy patriace do rodiny glykozidhydroláz (GH) sa líšia vo svojich preferenciách pre AX a teda aj ich substrátová selektivita má vplyv na použitie AX v rôznych aplikáciách. Endoxylanáza, ktorá sa zatrieduje do GH rodiny 10 z *Aspergillus aculeatus*, degraduje VEAX a rozpustný arabinoxylán, čím sa zlepšuje aglomerácia lepku. Naproti tomu endoxylanáza (GH rodina 11) z *Bacillus subtilis* má rozdielnú špecifitu, extrahuje vodou ne-

Obr. 5. Izolácia alkalicky extrahovateľných arabinoxylánov²⁸

extrahovateľné AX, avšak neatakuje vodou extrahovateľné a rozpustné AX, čo má priaznivý vplyv na objem chleba^{32,33}.

V princípe je izoláciou enzymaticky extrahovateľných arabinoxylánov (ERAX) ich samotné uvoľňovanie/rozpúšťanie, ktoré sa hodnotí polymerizačným meraním rozpustnej xylózy uvoľnenej do supernatantu po inkubácii s rôznymi hmotnosťami endoxylanázy. Výsledky štúdie ukazujú, že rozpúšťanie ERAX je priamo úmerné s množstvom použitej endoxylanázy, čo umožňuje definovať tzv. rozpúšťaciu aktivitu rozpustného a vodou extrahovateľného arabinoxylánu. V prípade použitia nižších koncentrácií endoxylanázy dochádza k rozpúšťaniu rozpustných fragmentov AX a pri vyššej koncentrácii sa okrem zvýšeného rozpúšťania rozpustného AX tieto fragmenty degradujú na fragmenty s nižšou molekulovou hmotnosťou¹.

4. Zdraviu prospešné účinky arabinoxylánov

Viac ako 64 % svetovej populácie využíva prírodné zdroje v boji a prevencii proti ochoreniam³⁴, pričom takmer 50 % syntetických liekov bolo odvodených po chemickej stránke zo zdrojov rastlinného pôvodu. V posledných rokoch boli uskutočnené výskumy vlastností obilných polysacharidov, pričom boli potvrdené ich zdraviu prospešné vlastnosti^{35,36}. Arabinoxylány predstavujú cieľovú skupinu (popri β -glukánach) epidemiologických výskumov, ktoré sú dôkazom, že potraviny s ich vysokým obsahom majú prospešnú funkciu a slúžia ako prevencia proti chronickým ochoreniam typu diabetes, rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, ochorenia gastrointestinálneho traktu a iné^{37,38}. Sú známe fyziologické vlastnosti obilných vodou rozpustných aj nerozpustných AX vrátane stimulácie lepšej priechodnosti čriev, čím sa zlepšuje aj účinok črevnej mikróflóry, zlepšuje sa adsorpcia mutagénov v potravinách, redukuje hladina sacharidov v krvi, pozitívne ovplyvňuje reguláciu inzulínu, zabraňuje zvyšovaniu hladiny cholesterolu v krvnom sére a pečeni³⁹. Na

základe týchto poznatkov je potrebné preskúmať uvedené vlastnosti AX na ľudský organizmus, ich izoláciu a identifikáciu aktívnych zlúčenín, ktoré sa podieľajú na týchto činnostiach.

AX zo pšeničných otrúb preukazujú silné účinky na vrodene a získané imunitné odpovede organizmu, ktoré boli testované aj na myšiach⁴⁰. Bolo navrhnuté, že arabinoxylány izolované alkalicky/enzymaticky z pšeničných otrúb by mohli byť potenciálnym zdrojom zvyšovania obranyschopnosti organizmu. Štúdie potvrdili, že imunomodulačná aktivita AX je úzko spätá s antikarcinogénnou aktivitou, pričom sa zvyšuje aktivačný potenciál T- a B-buniek a tiež humorálna a celková imunitná aktivita u myši⁴¹. Dá sa povedať, že AX stimulujú protilátky, ktoré sprostredkujú imunitnú odpoveď, medzi ktoré patria fagocyty (monocyty, neutrofilné granulocyty), interleukíny⁴².

V pšeničných arabinoxylánoch prítomné zvyšky kyseliny hydroxyškoricevej vykazujú chemoprotektívnu a anti-oxidačnú aktivitu, pričom ich obsah predstavuje cca 0,4 až 0,7 % celkového obsahu kyseliny škoricevej⁴³.

AX z pšeničných otrúb ako skvasiteľný substrát pomáhajú v raste fakultatívne anaeróbnym, Gram-pozitívnym baktériám vo fermentovaní kyseliny mliečnej a tvorení peroxidu vodíka, pričom sa tak potláča rast črevných patogénov, zlepšuje sa trávenie a prispieva tým k lepšiemu využitiu živín^{44,45}. V rámci *in vitro* testov pôsobí AX, resp. ich komponenty ako kyselina hydroxyškoricevá a jej konjugáty, prostredníctvom imunomodulačnej aktivity nepriamo na antimikrobiálnu aktivitu^{46,47}.

5. Záver

V poslednej dobe vzrástol záujem o arabinoxylány aj arabinoxylánové oligosacharidy najmä v potravinárskom a kŕmnom priemysle. Sú známe rôzne metódy extrakcie a izolácie pšeničných arabinoxylánov, avšak preferovaným spôsobom extrakcie arabinoxylánov z bunkovej steny pšeničných otrúb je izolácia pomocou zásad. Štúdie, ktorých predmetom je izolácia arabinoxylánov, sú zamerané predovšetkým na pšeničné otruby, nakoľko obsahujú ich vysoký podiel. Práve extrakcia by mohla zlepšiť využívanie a zvýšiť tak aj potenciál otrúb, ktoré sú brané ako druhotná surovina pri spracovávaní pšenice na bielu múku. Na izoláciu vodou extrahovateľných arabinoxylánov sa najčastejšie využíva zohriata voda (80–90 °C) s rôznou dobou extrakcie, kým na separáciu vodou neextrahovateľných rôzne metódy alkalickéj hydrolýzy kovalentných väzieb (využitie NaOH, Ca(OH)₂ či Ba(OH)₂).

LITERATÚRA

- Moers K., Celus I., Brijs K., Courtin C. M., Delcour J. A.: *Carbohydr. Res.* 340, 1319 (2005).
- Pomeranz Y. (ed.): *American Association of Cereal Chemists*. St. Paul, Minnesota 1986.
- Bonnin E., Le Goff A., Saulnier L., Chaurand M., Thibault J. F.: *J. Cereal Sci.* 28, 53 (1998).
- Dervilly-Pinel G., Rimsten L., Saulnier L., Andersson R., Aman P.: *J. Cereal Sci.* 34, 207 (2001).
- Izydordzyk M., Cui S. W., Wang Q., v knihe: *Food Carbohydrates. Chemistry, Physical Properties, and Applications* (Cui S. W., ed.). CRC Press, New York 2005.
- Ebringerová A., Hromádková Z., Heinze T.: *Adv. Polym. Sci.* 128, 1 (2005).
- Sinnot M. L. (ed.): *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. RSC Publishing, Cambridge 2007.
- Royer W. E., Zhu H., Gorr T. A., Flores J. F., Knapp J. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 526 (1996).
- Saulnier L., Sado P. E., Branlard G., Charmet G., Guillon F.: *J. Cereal Sci.* 46, 261 (2007).
- Ebringerová A., Hromádková Z., Alföldi J., Hribalová V.: *Carbohydr. Polym.* 37, 231 (1998).
- Ring S. G., Selvedran R. R.: *Phytochem.* 19, 1723 (1980).
- Brillouet J. M., Mercier C.: *J. Sci. Food Agric.* 32, 243 (1981).
- Stephen A. M., Philips G. O., Williams P. A. (ed.): *Food polysaccharides and their applications*. CRC Press, New York 2006.
- Courtin C. M., Delcour J. A.: *J. Cereal Sci.* 35, 225 (2002).
- Dekker R. F., Richards G. N.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 277 (1976).
- Henrissat B.: *Biochem. J.* 280, 309 (1991).
- Dornez E., Gebruers K., Delcour J. A., Courtin C. M.: *Trends Food Sci. Technol.* 20, 495 (2009).
- Meuser F., Sucklow P.: *Chemistry and physics of baking*. The Royal Society of Chemistry, London 1986.
- Lam T. B. T., Iiyama K., Stone B. A.: *Phytochem.* 31, 2655 (1992).
- Iiyama K., Lam T. B. T., Stone B. A.: *Covalent crosslinks in the cell wall. In Plant Physiology*. University of Agriculture, Brno 1994.
- Mares D. J., Stone B. A.: *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 793 (1973).
- Mares D. J., Stone B. A.: *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 813 (1973).
- Neukom H.: *Food Sci. Technol.* 9, 143 (1976).
- Wang J., Sun B. G., Cao Y. P., Wang C. T.: *Food Chem.* 123, 472 (2010).
- Bataillon M., Mathali P., Cardinali A. P., Duchiron F.: *Ind. Crops Prod.* 8, 37 (1998).
- Du C., Campbell G. M., Misailidis N., Mateos-Salvador F., Sadhukhan J., Mustafa M.: *Chem. Eng. Res. Des.* 87, 1232 (2009).
- Rao R. S. P., Muralikrishna G.: *Phytochem.* 67, 91 (2006).
- Zhou S., Liu X., Guo Y., Wang Q., Peng D., Cao L.: *Carbohydr. Polym.* 81, 784 (2010).
- Kale M. S., Hamaker B. R., Campanella O. H.: *Food Hydrocolloids* 31, 121 (2013).
- Gruppen H., Hoffmann R. A., Kormelink F. J. M., Voragen A. G. J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F.

- G.: Carbohydr. Res. 233, 45 (1992).
31. Petit-Benvegnen M. D., Saulnier L., Rouau X.: Cereal Chem. 75, 551(1998).
 32. Courtin C. M., Gelders G. G., Delcour J. A.: J. Cereal Sci. 78, 564 (2001).
 33. Courtin C. M., Delcour J. A.: J. Cereal Sci. 33, 301 (2001).
 34. Farnsworth N. R. (ed.): *The role of ethnopharmacology in drug development. Bioactive compounds from plants*. Wiley Interscience, New York 1990.
 35. Neyrinck A. M., Possemiers S., Druart C., Van de Wiele T., Backer F., Cani P. D., Larondelle Y., Delzenne N. M.: Open Access. 6, 20944 (2011).
 36. Paulsen B. S.: Phytochem. 1, 379 (2002).
 37. Aruoma O. I.: Mutat. Res. 544, 9 (2003).
 38. Slavin J. L.: J. Am. Coll. Nutr. 19, 300 (2000).
 39. Ogawa K., Takeuchi M., Nakamura N.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 19 (2005).
 40. Cao L., Liu X., Qian T., Sun G., Guo Y., Chang F., Zhou S., Sun X.: Int. J. Biol. Macromol. 48, 160 (2011).
 41. Akhtar M., Tariq A. F., Muhammad Awais M., Iqbal Z., Muhammad F., Shahid M., Hiszczynska-Sawicka E.: Carbohydr. Polym. 90, 333 (2012).
 42. Ghoneum M., Gollapudi S.: Cancer Lett. 201, 41 (2003).
 43. Clifford M. N.: J. Sci. Food Agric. 80, 1033 (2000).
 44. Brisbin J. T., Zhou H., Gong J., Sabour P., Akbari M. R., Haghghi H. R., Yu H., Clarke A., Sarson A. J., Sharif S.: Dev. Comp. Immunol. 32, 563 (2008).
 45. Kabir S. M. L.: Int. J. Mol. Sci. 10, 3531(2009).
 46. Ebringerová A., Kardošová A., Hromádková Z., Malovíková A., Hribalová V.: Int. J. Biol. Macromol. 30, 1 (2002).
 47. Ghoneum M., Matsuura M.: Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 17, 283 (2004).

L. Blažeková, S. Bielečková, and V. Horváthová
(Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, St. Cyril and Methodius University, Trnava, Slovakia): **Isolation and Chemical Characterisation of Wheat Arabinoxylans**

The main building components of arabinoxylans (AX) are α -L-arabinose and β -D-xylose, but their structure varies largely with cultivar source and tissue. Cereal grains are the best known and most studied source of AX. Traditionally, AX are classified into water-extractable (WE-AX) and non-extractable AX (WN-AX). WN-AX are fixed in the cell wall by non-covalent and covalent bonds with other AX molecules or with other cell wall constituents. In contrast, WE-AX are loosely bonded to the cell wall by crosslinking with other components. A part of the AX from wheat flour, wheat bran can be extracted with water, yielding a WE-AX-containing fraction. Treatment of the water-non-extractable residue with $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solutions or with an alkaline solution of H_2O_2 partly solubilizes WN-AX, yielding an alkali-solubilized AX-rich fraction.

VLIV SPOLEČENSTVA ŘAS A BAKTERIÍ NA TVORBU KOROZIVNĚ AKTIVNÍCH SLOUČENIN, KTERÉ DEGRADUJÍ SILIKÁTOVÉ STAVEBNÍ MATERIÁLY

**RICHARD WASSERBAUER, ZUZANA RÁCOVÁ
a IVANA LOUŠOVÁ**

*Mikrobiologická a chemická laboratoř, Katedra konstrukcí pozemních staveb, Fakulta stavební ČVUT v Praze, Thákurova 7, 166 29 Praha 6
richard.wasserbauer@fsv.cvut.cz*

Došlo 30.10.14, přepracováno 12.2.15, přijato 12.3.15.

Klíčová slova: fototrofi, sinice, bakterie, společenstvo, metabolismy

Úvod

Mikrobiální kolonizace stavebního kamene začíná obvykle fototrofními organismy, které vytvářejí viditelný biofilm na povrchu zdiva¹. Dlouho se předpokládalo, že fototrofi působí pouze estetické škody a nemají přímý vliv na poškození stavebního kamene (tzv. funkční degradace neboli soiling)². Nyní je zřejmé, že fototrofi působí fyzikální a chemickou deterioraci kamene, a to zvláště tam, kde dochází ke znečištění staveb polutanty antropogenního původu³. Biodeteriorační procesy jsou provázeny exkrecí organických kyselin, a to především na vápencích a mramorech, ale také na pískovci, žule a čediči⁴.

Agresivní působení sinic a řas popsali autoři⁵, kteří se snažili objasnit drobení mramoru za přítomnosti sinic produkci dihydrátu šťavelanu vápenatého. Další autoři⁶ analyzovali biomasu endolithických sinic, kde jako typický biomarker našli 7-methyl-heptadekan. V současnosti je zřejmé, že řasy jsou schopny syntetizovat relativně velké množství organických látek. Bakterie zúčastněné v konsorciu s fototrofy přetvářejí tyto látky na minerální živiny a růstové faktory, které zpětně stimulují rozvoj řas^{7,8}.

U vybraných fototrofů jsme se proto pokusili izolovat jejich průvodní mikroflóru, identifikovat látky vytvořené v průběhu kultivace na opuce, a analyzovat základní metabolismy bakterií při asimilaci produktů řas.

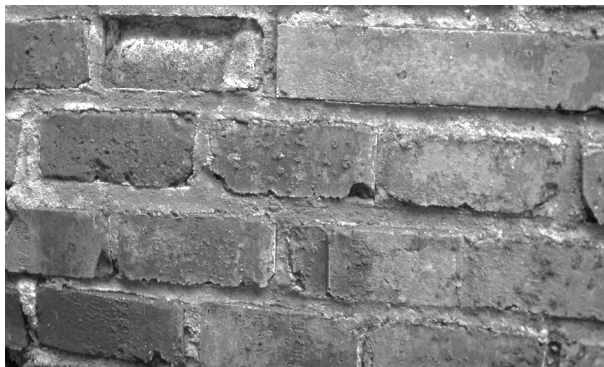
Experimentální část

Materiál a metody

Vzorky sinic a zelených řas byly sejmuty ze stavebních materiálů rýhováním povrchu stavebního kamene

sterilním skalpelem. Vzorky z cihel bastionů na Vyšehradě a z kamenného obložení oblouků Karlova mostu (obr. 1 a 2) byly kultivovány v minerální půdě podle Knopa a v Bold-Basal/Bristol mediu. Kultivace probíhala po dobu 20 dnů při teplotě 18–20 °C. Vzorky byly ozařovány 20 hodin denně výbojkou o celkové intenzitě 2,5 kLux.

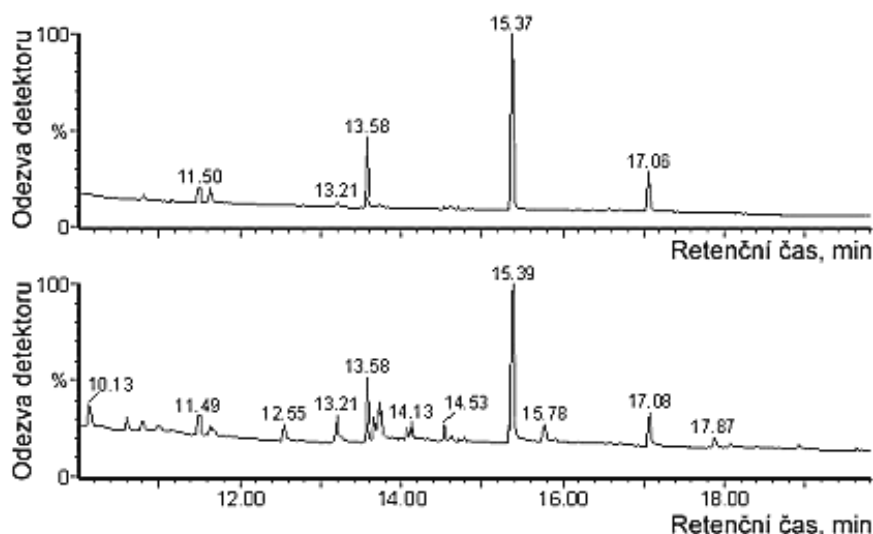
Izolace fototrofů byla provedena očkováním na minerální půdu podle Knopa ztuženou agarem. Pro získání dostatečného kvanta extracelulárních polymerních substancí (EPS) z jednotlivých druhů řas byly použity sterilní vzorky opuky o rozměrech 70 × 70 × 5 mm. Vzorky stavebního kamene byly uloženy v lůžku z vlhkého sterilního vermikulitu. Na vzorky byly nanášeny jednotlivé kmeny řas. Doba kultivace byla 30 dnů, teplota 20 °C, způsob ozařování jako v minulém případě. Identifikace fototrofů byla provedena mikroskopicky (mikroskop BX41), podle klíče⁹.



Obr. 1. Řasy na povrchu cihel bastionu na Vyšehradě



Obr. 2. Společenstvo řas na obloucích Karlova mostu



Obr. 3. Příklad identifikace EPS na plynovém chromatografu GC-MS Perkin Elmer AutoSystemXL-Turbomass. Osa x – retenční čas, osa y – odezva detektoru. RT (min) pro jednotlivé aminokyseliny: 10,3 TMS alanin, 12,6 TMS valin, 13,7 TMS Leucin, 14,3 TMS prolin, 15,3 TMS serin, 15,8 TMS threonin, 17,8 TMS C6 dikarboxylová kyselina

Identifikace produktů řas byla uskutečněna ve vodné suspenzi, která vznikla po smytí opuky destilovanou vodou. Suspenze byla odstředěna (6000 ot/min; 6 min) a supernatant převeden do skleněných vialek. Pod IR lampou a v proudu dusíku byly roztoky odpařeny do sucha. EPS produkované řasami byly nejdříve podrobeny kyselé hydrolyze a následně derivatizaci BSTFA (bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid).

Derivatizované složky odpadků byly analyzovány na plynovém chromatografu GC-MS Perkin Elmer AutoSystemXL-Turbomass. Data z GC-MS byla shromažďována a zpracována s použitím software TurboMass a NIST knihovny MS spekter. Chromatografické podmínky: kolo na PE5MS, 20 m, i. d. 0,18 mm; tloušťka filmu 0,18 μ m; teplotní program: 60 °C 5 min, vzestup 8 °C/min do 280 °C za cca 30 min, prodleva 280 °C 20 min; nosný plyn helium (obr. 3).

Izolace průvodních bakterií byla provedena očkováním suspenze jednotlivých řas na masopeptonovém agar (MPA) a uložením ve tmě v termostatu při teplotě 24 °C po dobu 10 dnů. Vlastní identifikace vybraných kmenů bakterií proběhla za použití diagnostických destiček Mikro-La-Test a Nefermtest Oxi, výrobce Pliva-Lachema a.s. Brno, souhlas s tabelovanými daty byl větší než 95 %.

Rychlost růstu bakterií v minerálním médiu s jednotlivými aminokyselinami identifikovanými na plynovém chromatografu byla stanovena na spektrometru MR OPSYS (Dyrex). Pro tyto účely bylo použito jednoduché minerální medium¹⁰. Počáteční koncentrace inokula bakterií byla cca $1 \cdot 10^4$, teplota kultivace 24 ± 2 °C.

Orientační identifikace produktů asimilace jednotlivých aminokyselin bakteriemi byla provedena tenkovrst-

vou chromatografií. Metabolity bakterií byly identifikovány v soustavě pyridin-petroleter (1:2) a v soustavě ethanol-voda-25% amoniak (25:3:4), vyvíjení vzestupně, detekce bromkresolovou zelení.

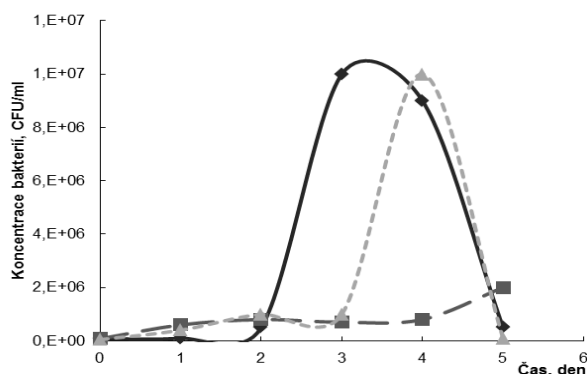
Výsledky a diskuse

Řasy izolované z povrchu bastionů na Vyšehradě a z kamenného obložení Karlova mostu jsme identifikovali jako *Aphanothece saxicola*, *Chroococcus turgidus* a *Chlorobotrys* sp.

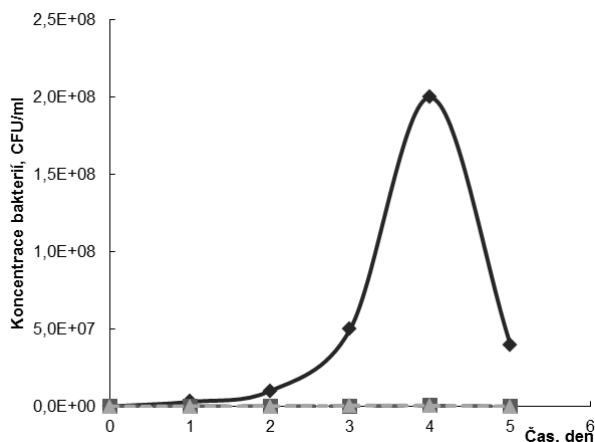
Jejimi pravděpodobnými symbionty byly bakterie *Burgholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Sphingobacterium multivorum*.

TMS (trimethylsilyl) deriváty aminokyselin vznikajících hydrolyzou rozpuštěných peptidů byly následující: alanin, glycin, valin, leucin, prolin, serin a threonin. Navíc u některých vzorků z odpadků derivatizovaných BSTFA byly zjištěny píky, které bylo možné přiřadit k TMS derivátu C6 dikarboxylové kyseliny, k derivátům sacharidů a jim podobným sloučeninám. To dobře souhlasí s nálezem Wanga a spol.¹¹, který detegoval tytéž sloučeniny a navíc také polyalkoholy a toxiny.

Přístupnost aminokyselin v médiu se pro bakterie lišila podle počáteční koncentrace aminokyselin a koncentrace inokula. Pokud počáteční koncentrace aminokyselin v roztoku činila méně než 1 mg/5 ml média a koncentrace inokula byla přibližně $1 \cdot 10^4$, potom pouze *Burgholderia cepacia* byla schopna větší část aminokyselin produkovaných řasami asimilovat a využívat pro stavbu buňky. Je tedy pravděpodobné, že právě tento kmen je schopen rozvoje na fasádách stavebních objektů.



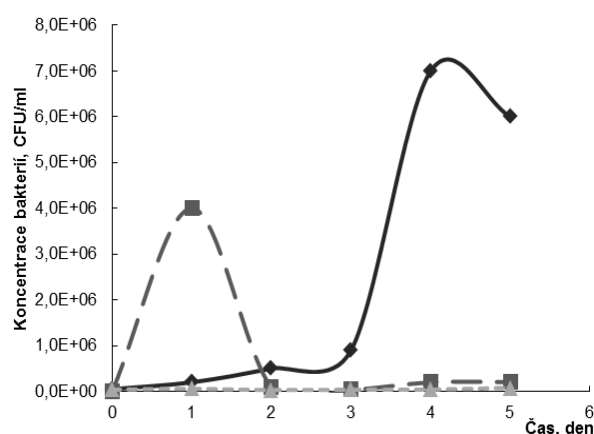
Obr. 4. Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaldinova¹⁰ s alaninem. Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*



Obr. 5. Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaldinova¹⁰ s glycinem. Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*

Kmen *Sphingomonas paucimobilis* byl schopen slabě asimilovat pouze alanin a valin, další aminokyseliny nevyužíval. *Sphingobacterium multivorum* asimiloval pouze alanin. Oba kmeny zřejmě nejsou typičtí symbionti, ale spíše členy specifického společenství na povrchu Karlova mostu a bastionu na Vyšehradě (obr. 4 až 6).

Při orientačních analýzách metabolitů bakterie *Burgolderia cepacia*, která rostla na jednotlivých aminokyselinách, jsme našli především kyselinu octovou, dále kyselinu propionovou, ve stopách i kyselinu glutarovou. To naznačuje, že došlo k neúplnému zkvašování jednotlivých aminokyselin a k tvorbě typických koncových produktů¹².



Obr. 6. Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaldinova¹⁰ s leucinem. Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*

U dalších dvou bakterií byla produkce kyselin nedetegovatelná, a proto zde bylo od analýzy metabolitů upuštěno.

Získané výsledky částečně souhlasily i s dřívějšími analýzami povrchu kamenů Karlova mostu v Praze. Zde jsme našli¹³ velké množství derivátů kyseliny octové, především octan vápenatý, železnatý a octan amonný. Je zřejmé, že uvedené látky vznikaly interakcí stavebního kamene, řas a bakterií, které byly hojně přítomny na povrchu kamenné obšívky Karlova mostu. Protože kyselina glutarová, glyoxalová, oxalová a další jsou schopny chelatizace kationů Ca, Al, Si, Fe a Mn, se kterými vytváří komplexy, dochází tak k mobilizaci minerálů, což vede k zpráškování a degradaci povrchu stavebního kamene¹⁴. O rychlosti destrukce rozhoduje především druh kyseliny produkované mikroorganismy. Ta stoupá v řadě kyselina citronová, salicylová, asparagová a octová. Produktem bakteriální destrukce minerálů jsou koagulované gely alofanové povahy, složené z hydratovaných oxidů křemíku a hliníku se sorbovanými ionty K^+ , Mn^{2+} a Ca^{2+} . Mobilizace minerálů organickými kyselinami je daleko rychlejší než kyselinami anorganickými¹⁵.

Závěr

Byl prokázán vliv symbionta *Burgolderia cepacia*, který tvoří spolu s řasou *Aphanothece saxicola* organické kyseliny. Ty mohou zásadním způsobem urychlit zpráškování a degradaci povrchu silikátových materiálů. Práce tak podpořila názor o transformaci aminokyselin bakteriemi přítomných na povrchu fasád a o dominantním vlivu bakterií, nikoliv řas na degradaci stavebního kamene.

Príspevek vznikl za podpory grantu NAKI DF 12P010VVO37.

LITERATURA

1. Herrera L. K., Videla H. A.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 54, 125 (2004).
2. Ortega-Calvo J. J., Arino X., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C.: Sci. Total Environ. 167, 329 (1995).
3. Gaylarde P. M., Gaylarde C. C.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 46, 93 (2000).
4. Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M.: *Mikrobiální biofilmy*, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2011.
5. Del Monte M., Sabbioni C.: Environ. Sci. Technol. 17, 518 (1983).
6. Saiz-Jimenes C., Hermosin B., Ortega-Calvo J., Gómez-Alarcon G.: J. Anal. Appl. Pyrolysis 20, 239 (1991).
7. Laiz L., Romanovska-Deskins A., Saiz-Jimenez C.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 85, 1100 (2011).
8. Vishal G., Sachitra K. R., Sood A., Chaudhary V., Prasana R.: Algal Res. 2, 79 (2013).
9. Hindák F., Cyrus Z., Marvan P., Javornický P., Komárek J., Ettl H., Rosa J. K., Sládečková A., Popovský J., Punčochářová M., Lhotský O.: *Sladkovodné riasy*, SPN, Bratislava 1978.
10. Ilyaletdinov A. V., Aliev R. M., Djusupova D. B.: Microbiologia 52, 609 (1983).
11. Wang X., Li Z., Su, J., Tasan Y., Ning X., Hong H., Zheng T.: Biol. Control 52, 123 (2010).
12. Rodwell W. V.: *Katabolismus uhlikového řetězce aminokyselin*. Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 1998.
13. Witzany J., Mencl V., Wasserbauer R., Gregerová M., Pospíšil P., Čejka T., Zigler R., Burgetová E.: Stavební Obzor 14, 65 (2005).
14. Warscheid Th., Brahm J.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 46, 343 (2000).
15. Wasserbauer R.: *Biologické znehodnocení staveb*. ABF, a.s., Nakladatelství ARCH, Praha 2000.

R. Wasserbauer, Z. Rácová, and I. Loušová
(Microbiological and Chemical Laboratory, Department of Building Structures, Faculty of Civil Engineering, Czech Technical University, Prague): **The Effect of Algal and Bacterial Colonies on the Formation of Corrosion-active Compounds Degrading Silicate Building Materials**

The present study confirmed the effect of the *Burkholderia cepacia* symbiont, which, together with the *Aphanothece saxicola* algae, produces organic acids. These may significantly speed up the powder formation and surface degradation of silicate building materials. The study has supported the expert opinion on the transformation of amino acids by the bacteria present on the surface of facades.

ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY MATERSKEJ KAŠIČKY

MÁRIA ŠEDIVÁ a JAROSLAV KLAUDINÝ

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská
cesta 9, 845 38 Bratislava
chemsedm@savba.sk, chemjakl@savba.sk

Došlo 19.12.14, prijaté 12.2.15.

Kľúčové slová: materská kašička, antimikrobiálne peptidy, defenzín1, jelleíny, masné kyseliny, kyselina 10-hydroxy-2-decénová, antimikrobiálne účinky, mor včelieho plodu

Obsah

1. Úvod
2. Materská kašička (MK)
3. Antimikrobiálne látky MK proteínového charakteru
4. Mechanizmy účinku antimikrobiálnych peptidov
5. Antimikrobiálne látky MK lipidového charakteru
6. Antimikrobiálna aktivita a mechanizmy účinku masných kyselín
7. Záver

1. Úvod

Súčasný trend nadmerného používania antibiotík spôsobuje neustále narastajúcu mieru rezistencie širokého spektra bakteriálnych a fungálnych patogénnych mikroorganizmov. Preto je výskum nových potenciálne terapeuticky použiteľných antimikrobiálnych látok stále aktuálny a nevyhnutný. Zdrojom mnohých prirodzených sa vyskytujúcich látok účinných voči mikrobiálnym patogénom sú rôzne rastlinné extrakty, esenciálne oleje a produkty živočíšneho pôvodu. Významným zdrojom takýchto látok sú včelie produkty, materská kašička (MK), propolis a med. Materská kašička zohráva primárnu úlohu ako potrava lariev a matiek vo včelstvách, a zároveň reprezentuje včelí produkt, ktorý obsahuje mnoho bioaktívnych látok s pozitívnymi účinkami aj na ľudský organizmus. Obsahuje tiež antimikrobiálne látky rôzneho chemického charakteru. Ich úloha v prirodzenej ochrane včelích lariev pred pôsobením mikrobiálnych patogénov spôsobujúcich choroby včelieho plodu je predmetom súčasného apidologického výskumu. Rovnako však je možné uvažovať o perspektíve využitia týchto látok v prevencii alebo liečení mikrobiálnych infekcií vo veterinárnej aj humánnej sfére.

2. Materská kašička

MK je jedinečnou zložkou výživy včely medonosnej (*Apis mellifera*), ktorú produkujú včely dojkčičky. Tie produkujú dva typy kašičky: materskú kašičku pre larvy budúcich kráľovien a pre samotnú kráľovnú (matku), a včeliu kašičku (VK) pre larvy robotníč¹. MK je podávaná larvám kráľovien vo veľkých množstvách počas celého ich vývinu až do štádia predkukly na rozdiel od VK, ktorou sú kŕmené mladé larvy robotníč v menších množstvách do veku 3 dní. Staršie larvy robotníč dostávajú ako potravu zmes VK, medu a peľu. Obe larválne kašičky sú produkované v hlavách dojkčičiek, v hypofaryngeálnych a mandibulárnych žľazách². MK obsahuje 12–15 % proteínov, 10–16 % cukrov, 3–6 % lipidov, voľné aminokyseliny, vitamíny, soli a zvyšok, 60–70 %, je voda³. VK sa od MK čiastočne odlišuje v množstvách niektorých komponentov; proteínov, sacharidov a nízkomolekulárnych látok^{2,4}. Tieto rozdiely v zložení neovplyvňujú významne vývojové procesy v larvách robotníč mladších ako 3 dni. Aj z týchto lariev sa môžu vyliahnúť kráľovné, ak sú počas ďalších dní vývinu kŕmené MK. Obsah niektorých látok v kašičkách môže kolísať aj v závislosti od environmentálnych podmienok.

Sacharidová frakcia MK je tvorená najmä monosacharidmi fruktózou a glukózou. Minoritne obsahuje sacharózu, maltózu a trehalózu⁵.

Lipidová frakcia pozostáva z 80–90 % z voľných masných kyselín, z ktorých najhojnejšou je kyselina 10-hydroxy-2-decénová. Zvyšok lipidovej frakcie tvoria neutrálne lipidy a steroly⁶.

Proteínová frakcia MK obsahuje vo vode rozpustné aj nerozpustné proteíny⁷, z ktorých najvýznamnejšie sú hlavné proteíny materskej kašičky MRJP1–MRJP9 (skratky z angl. major royal jelly protein). Tieto proteíny patria do MRJP/Yellow proteínovej rodiny⁸ a tvoria viac ako 80 % z celkového množstva proteínového obsahu MK (cit.⁹). Najviac zastúpené sú MRJP1-5, ktoré majú nutričnú funkciu. Analýzy MK dokázali, že obsahuje aj mnoho enzýmov; α -glukozidázu, glukózooxidázu, glukózodehydrogenázu, askorbinoxidázu, katalázu, amylázu a kyslú fosfatázu¹⁰.

Významnou zložkou MK sú antimikrobiálne látky, ktoré na základe chemickej štruktúry možno rozdeliť na dve skupiny: proteínové a lipidové. K antimikrobiálnym látkam proteínového charakteru patria peptidy defenzín1 (royalizín)^{11,12}, jelleíny¹³ a proteín apalbumín2a (cit.¹⁴). Lipidové antimikrobiálne látky sú rôzne masné kyseliny s rozdielnymi štruktúrami^{15–17}.

3. Antimikrobiálne látky MK proteínového charakteru

3.1. Defenzín1

Defenzín1 je kationický antimikrobiálny peptid (AMP) s amfipatickými vlastnosťami, ktorého prvotný názov royalizín (angl. royalisin) bol odvodený od zdroja izolácie – MK (angl. royal jelly). Patrí medzi peptidy bohaté na cysteín. Má molekulovú hmotnosť 5,5 kDa. Pozostáva z 51 aminokyselinových zvyškov, medzi ktorými sa nachádza 6 cysteínových zvyškov tvoriacich 3 intramolekulové disulfidové väzby. Je stabilný pri nízkom pH a odoláva aj teplote 100 °C (15 min)¹¹. N-Terminálna časť molekuly je relatívne hydrofóbná (pozícia 1–22), C-terminálna časť je hydrofilná (pozícia 23–45). Na rozdiel od defenzínov iných druhov hmyzu obsahuje molekula defenzínu1 na C-terminálnom konci špecifickú 11 aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je amidovaná¹⁸. Defenzín1 mRNA kóduje ešte 52. aminokyselinu – glycín, ktorý je v maturovanom peptide donorom C-terminálneho amidu. Predpokladá sa, že helikálna štruktúra je všeobecne stabilizovaná C-terminálnym amidom¹⁹.

Klaudiny a spol.²⁰ skúmali produkciu defenzínu1 v rôznych včelstvách a zistili, že obsah defenzínu1 v MK kolíše. V testovaných vzorkách MK stanovili obsah defenzínu1 v rozmedzí 0,159–0,524 µg mg⁻¹ MK, pričom väčšie rozdiely pozorovali medzi MK z rôznych včelstiev ako medzi MK z jedného včelstva.

Defenzín1 vykazuje antibakteriálnu aktivitu voči Gram-pozitívnym baktériám (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Eubacterium aerofaciens*) v rozsahu 0,094–0,528 mg ml⁻¹, nie však voči Gram-negatívnym baktériám¹¹. Boli popísané aj jeho antibakteriálne účinky voči *Paenibacillus larvae*^{21,22}, ktorý je pôvodcom závažného ochorenia včelstiev postihujúceho larvy včiel – mor včelieho plodu. Okrem toho bola zistená aj antifungálna aktivita defenzínu1 voči rastlinnému patogénu *Botrytis cinerea* pri minimálnej inhibičnej koncentrácii 0,027 mg ml⁻¹ (cit.²¹).

3.2. Jelleíny

Jelleíny tvoria rodinu krátkych AMP izolovaných z MK. Sú zložené len z 8–9 aminokyselinových zvyškov. Na C-terminálnom konci sú amidované a majú celkový kladný náboj +1 alebo +2. Na základe analýz jelleínových sekvencií sa zistilo, že sú produkované procesingom C-koncovej časti najhojnejšieho proteínu MK – MRJP1. Existujú 4 jelleíny, ktoré sa odlišujú v aminokyselinách na N-terminálnych alebo C-terminálnych koncoch molekúl (tab. I). Okrem jelleínu IV sú všetky aktívne proti Gram-pozitívnym baktériám (*Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*) v rozsahu 0,01–0,03 mg ml⁻¹ a Gram-negatívnym baktériám (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) v rozsahu 0,003–0,03 mg ml⁻¹ (cit.¹³).

Tabuľka I

Peptidy jelleíny, ich primárna štruktúra a antimikrobiálna aktivita¹³

Jelleín	Sekvencia aminokyselín	Antimikrobiálna aktivita
Jelleín I	PFKLSLHL-NH ₂	G+, G– baktérie
Jelleín II	TPFKLSLHL-NH ₂	G+, G– baktérie
Jelleín III	EPFKLSLHL-NH ₂	G+, G– baktérie
Jelleín IV	TPFKLSLH-NH ₂	–

3.3. Apalbumín2a

Apalbumín2a je minoritný antimikrobiálny proteín MK s molekulovou hmotnosťou 48,6 kDa. Predstavuje na oboch koncoch skrátenú formu apalbumínu2 (proteín MRJP2), ktorá je špecificky N-glykozylovaná. Apalbumín2a je aktívny proti Gram-pozitívnym baktériám, vrátane *P. larvae*, na rozdiel od apalbumínu2, ktorý nevykazuje žiadne antimikrobiálne účinky proti testovaným baktériám ani pri vyšších koncentráciách. Predpokladá sa, že antimikrobiálne vlastnosti apalbumínu2a súvisia s uvedenými modifikáciami apalbumínu2 (cit.¹⁴).

4. Mechanizmy účinku antimikrobiálnych peptidov

Základom účinnosti väčšiny AMP je ich pôsobenie na cytoplazmatickú membránu patogénov. Toto pôsobenie súvisí s ich vlastnosťami, ako sú pozitívny náboj, hydrofobicita a flexibilita, ktoré umožňujú ich interakciu s membránou²³. Prvým krokom v procese interakcie je väzba peptidových molekúl na cieľovú bunku. Je sprostredkovaná elektrostatickými silami medzi pozitívne nabitými molekulami peptidu a záporne nabitými zložkami prítomnými vo vonkajšej vrstve bunkovej steny baktérii. Peptidy sú následne včlenené do cytoplazmatickej membrány prostredníctvom hydrofóbných interakcií, kde dochádza k ich akumulácii a narušeniu integrity membrány^{24,25}. Integrita membrány môže byť narušená viacerými mechanizmami, ktoré prebiehajú na oboch jej stranách. Môže dôjsť k sfornovaniu prechodového kanála, micelarizácii a inému narušeniu membrány, alebo dochádza k translokácii AMP cez membránu do cytoplazmy. Vo všeobecnosti AMP buď zapríčinia permeabilizáciu membrány, následkom čoho nastáva smrť bunky, alebo preniknú do bunky, pričom membrána ostáva neporušená a ich cieľom sú esenciálne intracelulárne procesy, ktorých narušenie spôsobí smrť bunky²⁵.

Existuje niekoľko modelov popisujúcich rôzne mechanizmy, ktoré môžu viesť k rozrušeniu integrity membrány a smrti bunky.

4.1. Model agregácie

Model agregácie vysvetľuje permeabilizáciu cytoplazmatickej membrány tak, že sa v nej formujú kanály s variabilnou veľkosťou a životnosťou²⁶, ktoré umožňujú aj translokáciu AMP cez dvojvrstvu membrány²⁷. Podľa tohto modelu sa peptidy v membráne usporiadajú do micelám podobných agregátov tvorených komplexami peptidov a membránových lipidov, ktoré na rozdiel od iných modelov nemajú špecifickú orientáciu. Komplexy formujú nestabilné kanálové štruktúry s variabilným charakterom, ktoré umožnia preniknúť niektorým molekulám peptidov cez membránu²⁵.

4.2. Toroidálny model

Toroidálny model popisuje účinok AMP na základe vzniku agregátov peptidov, ktoré sú včlenené kolmo do membránovej dvojvrstvy, pričom dochádza k sformovaniu póru. Hydrofilné časti peptidov sú asociované

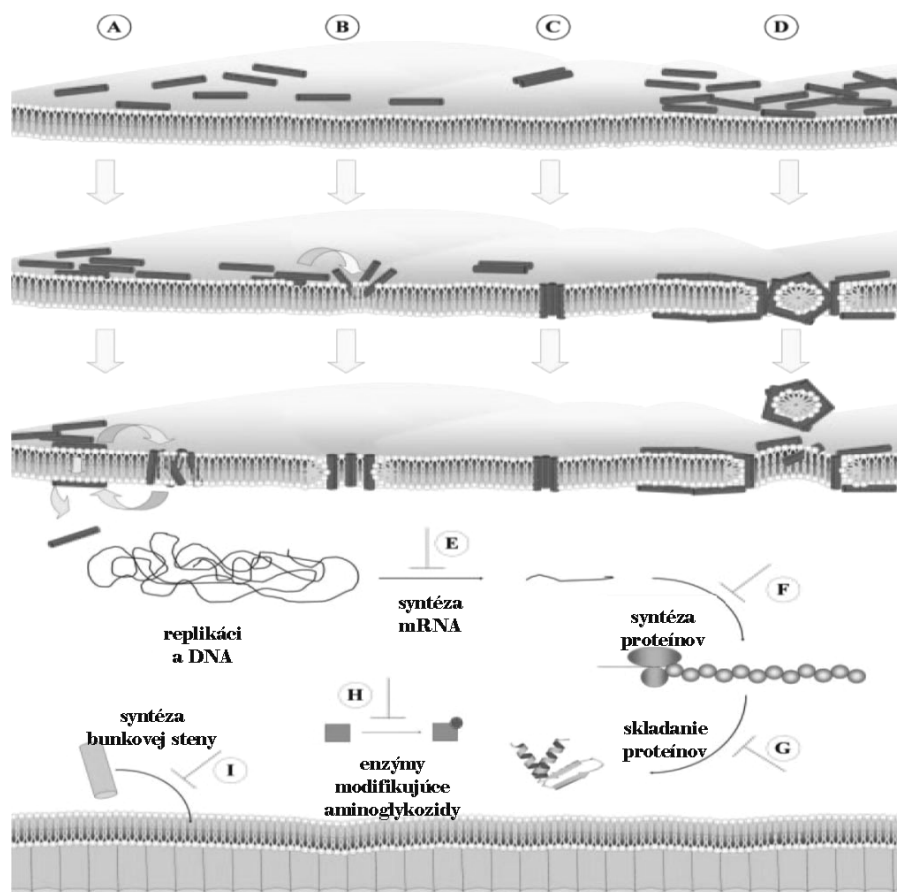
s fosfolipidovými hlavičkami membrány, hydrofóbne časti potom asociujú s jej lipidovým jadrom. Počas tohto procesu sa membrána zakrivuje a dochádza k ohnutiu a spojeniu vonkajšej a vnútornej časti membrány a vzniku otvoru, ktorý je zvnútra vystlaný vrstvou AMP interagujúcich s membránou^{28,29}.

4.3. Sudový model

Podľa tohto modelu AMP formujú dimérne, prípadne multimerne štruktúry, viažuce sa na negatívne nabitú časť membrány, ktoré sú usporiadané kolmo na membránu. Hydrofóbne oblasti sú orientované smerom k lipidovému jadru a hydrofilné časti smerujú do lumenu novovytvoreného transmembránového póru. Orientácia a usporiadanie peptidov vytvára otvor podobný sudu^{25,30}.

4.4. Kobercový model

Na rozdiel od predchádzajúcich modelov, kobercový model popisuje vznik agregátov AMP, ktoré sú usporiada-



Obr. 1. Mechanizmy účinku antimikrobiálnych peptidov: Pôsobenie na cytoplazmatickú membránu; A – model agregácie, B – toroidálny model, C – sudový model, D – kobercový model; Intracelulárne ciele AMP: E – syntéza mRNA, F – proteosyntéza, G – skladanie proteínov, H – enzýmová modifikácia aminoglykozidov, I – syntéza bunkovej steny (obrázok prebratý z publikácie²⁵, preložený)

né paralelne s membránovou dvojvrstvou a vytvárajú vrstvu podobajúcu sa kobercovej štruktúre. Po dosiahnutí dostatočnej koncentrácie agregátov dochádza k aktivite podobnej účinku detergentov, t. j. k vzniku micelárnych štruktúr a následne vytváraniu membránových pórov³¹ (obr. 1).

5. Antimikrobiálne látky MK lipidového charakteru

K týmto látkam patria masné kyseliny, ktoré sú unikátnou zložkou lipidovej frakcie MK syntetizovanou v mandibulárnych žľazách včiel³². Na rozdiel od živočíšnych a rastlinných zdrojov obsahujúcich najmä mono-, di- a triglyceridové formy masných kyselín, MK je výnimočným zdrojom veľkého počtu derivátov voľných masných kyselín (VMK) s krátkymi reťazcami zloženými z 8–12 uhlíkov^{17,33–35}. Najpočetnejšími derivátmi VMK sú rôzne hydroxyderiváty.

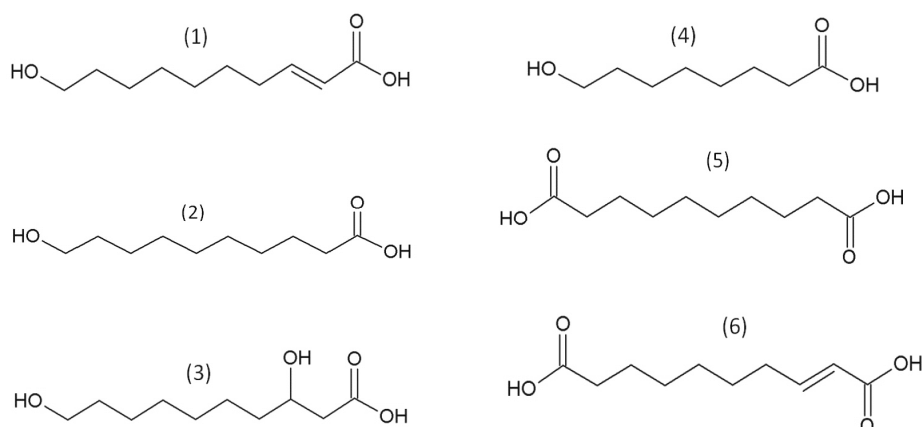
Najhojnejšou masnou kyselinou v MK je kyselina 10-hydroxy-2-decénová (10-HDA)¹⁵. Jej množstvo v MK je významným indikátorom autenticity a čerstvosti MK. Analýzy rôznych vzoriek MK ukázali, že obsah 10-HDA v kašičkách koliše v rozsahu 0,75 g – 6,4 g/100 g MK (cit.^{35–40}). Ďalšími, relatívne hojne zastúpenými masnými kyselinami v MK sú kyseliny 10-hydroxydekánová (15,9 ± 1,4 %), 3,10-dihydroxydekánová (5,9 ± 1,3 %), 8-hydroxyoktánová (4,9 ± 1,0 %), 2-decén-1,10-diová (4,1 ± 0,8 %) a sebaková (3,3 ± 0,6 %) (hodnoty stanovené v éterových extraktoch MK)³⁵ (obr. 2).

Antimikrobiálna aktivita a účinnosť bola skúmaná len u niektorých masných kyselín MK. Z majoritne zastúpených masných kyselín to boli 10-HDA, kyselina 10-hydroxydekánová, 3,10-dihydroxydekánová a kyselina sebaková. Tieto kyseliny okrem 10-hydroxydekánovej vykazovali antibakteriálne a antifungálne aktivity voči

Gram-pozitívnym aj Gram-negatívnym baktériám (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) s účinnosťami v rozsahu 0,40–1,64 mg ml⁻¹ a kvasinkám (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) s účinnosťami 0,15–1,25 mg ml⁻¹. Účinnosti vykazovali rozdiely v rámci jednotlivých druhov mikroorganizmov a jednotlivých masných kyselín¹⁷. Antimikrobiálne účinky 10-HDA a kyseliny sebakovej boli testované aj na viacerých kmeňoch včelieho patogéna *P. larvae*, pričom sa zistili ich účinnosti v rozsahu 0,58–1,5 mg ml⁻¹ (cit.⁴¹). U minoritne zastúpených masných kyselín bola zistená antimikrobiálna aktivita u nasledovných kyselín: 10-acetoxyldekánovej, 10-acetoxyl-*trans*-2-decénovej, 11-oxododekánovej, (11*S*)-hydroxydodekánovej, (10*R*,11*R*)-dihydroxydodekánovej, 3,11-dihydroxydodekánovej a (11*S*),12-dihydroxydodekánovej. Tieto kyseliny vykazovali voči vyššie uvedeným baktériám a kvasinkám antimikrobiálne účinnosti v podobnom rozsahu koncentrácií ako majoritné masné kyseliny MK (cit.¹⁷).

6. Antimikrobiálna aktivita a mechanizmy účinku masných kyselín

Antimikrobiálna aktivita VMK je podmienená ich štruktúrou, pričom úlohu zohráva dĺžka uhlíkového reťazca, prítomnosť alebo neprítomnosť, počet, pozícia a izoméria dvojitého väzby. V literatúre možno nájsť protichodné tvrdenia o vzťahu medzi štruktúrou VMK a ich antimikrobiálnou aktivitou, ale boli popísané niektoré všeobecné súvislosti. Dôležitú úlohu pravdepodobne zohráva –OH časť karboxylovej skupiny VMK, pretože jej metyláciou dochádza k zníženiu alebo úplnej strate antimikrobiálnej aktivity⁴⁰. Vo všeobecnosti, nenasýtené masné kyseliny majú väčší antimikrobiálny potenciál než nasýtené masné kyseliny s rovnakou dĺžkou reťazca^{40,42} a existuje



Obr. 2. Hlavné masné kyseliny materskej kašičky; (1) kyselina 10-hydroxy-2-decénová, (2) kyselina 10-hydroxydekánová, (3) kyselina 3,10-dihydroxydekánová, (4) kyselina 8-hydroxyoktánová, (5) kyselina sebaková, (6) kyselina 2-decén-1,10-diová

priama korelácia medzi počtom dvojitych väzieb a antimikrobiálnou účinnosťou. Dvojité väzby sa vyskytujú prevažne v *cis* orientácii, ktorá je spojená s vyššou antimikrobiálnou aktivitou VMK, než v prípade väzby v *trans* orientácii⁴³. Okrem schopnosti priamej inhibície rastu vytvárajú VMK nevyhovujúce podmienky pre rast mikroorganizmov pomocou udržiavania nízkeho pH, napríklad na povrchu pokožky⁴⁴.

V súčasnosti neexistujú exaktné poznatky o tom, ako pôsobia VMK na baktérie, ale boli popísané viaceré možné mechanizmy ich účinku. Cieľom VMK je cytoplazmatická membrána a rôzne esenciálne procesy spojené s membránou. Vďaka amfipatickej štruktúre môžu VMK vytvárať dočasné, prípadne trvalé póry v membránach a pri vyšších koncentráciách môžu solubilizovať časti membrán, pričom môže dochádzať k uvoľňovaniu membránových proteínov alebo väčších agregátov fosfolipidovej dvojvrstvy^{45,46}. V dôsledku toho sa permeabilizuje membrána a môže dôjsť až k celkovej lýze bunky⁴⁷. Kľúčovými membránovými procesmi, ktoré sú atakované VMK, sú elektrónový transport a s tým súvisiaca oxidatívna fosforylácia⁴⁸. Ďalšie mechanizmy inhibujúce bakteriálny rast môžu spočívať v inhibícii membránových a cytoplazmatických enzýmov zahŕňajúcich aj enzýmy potrebné pre syntézu mastných kyselín^{49,50} a v produkcii toxických peroxidov a autooxidačných produktov⁵¹ (obr. 3).

6.1. Narušenie elektrón-transportného reťazca

Elektrón-transportný reťazec baktérií je lokalizovaný na vnútornej strane plazmatickej membrány. VMK sú

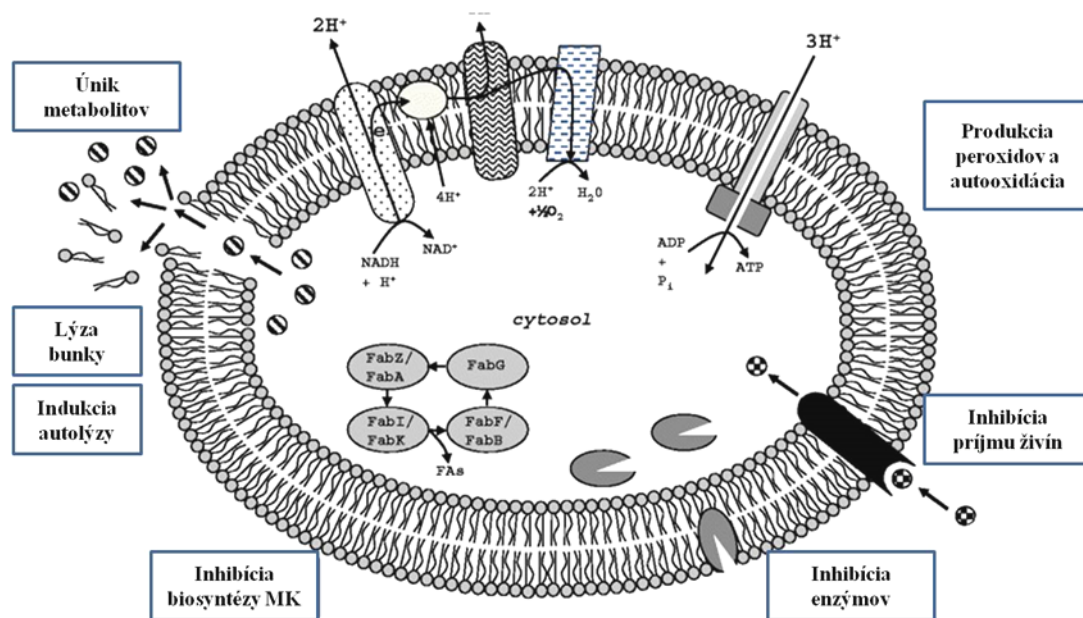
pravdepodobne schopné priamej väzby na prenášače cytoplazmatickej membrány transportujúce elektróny, prípadne sú tieto premiestnené alebo vytlačené z pôvodného miesta v dôsledku inkorporácie VMK. Narušenie reťazca môže byť spôsobené tiež inzerciou VMK medzi molekuly prenášačov, čím sa zabráni ich interakcii⁵³. Nenasýtené VMK môžu tiež zvyšovať fluiditu membrány, a to vďaka *cis*-väzbám. Tie spôsobujú prehnutie a skrútenie uhlíkového reťazca molekuly, ktoré znemožňuje pevnú inkorporáciu molekuly mastnej kyseliny do membrány⁴⁶.

6.2. Narušenie oxidatívnej fosforylácie

Tento mechanizmus je spojený s predpokladanou priamou väzbou VMK na ATP-syntázu, ktorá je lokalizovaná na vnútornej časti membrány. To môže spôsobiť obmedzenie alebo úplné vyradenie enzýmu, a tým redukciu tvorby ATP (cit.⁵⁴). Okrem toho by mohli VMK narušiť protónový gradient a membránový potenciál bunky zvýšením permeability membrány pre protóny⁵⁵.

6.3. Permeabilizácia membrány a lýza buniek

Nenasýtené VMK môžu zvyšovať fluiditu a permeabilitu membrány, čím dochádza k zníženiu jej stability. Následkom môže byť inhibícia rastu, prípadne usmrtenie bunky. Vo vysokých koncentráciách majú VMK pravdepodobne schopnosť pôsobiť ako detergenty. Destabilizujú veľké časti membrán, čo má za následok celkovú lýzu bunky⁴⁷.



Obr. 3. Možné mechanizmy účinku voľných mastných kyselín (prebraté z práce⁵², preložené, nepatrne modifikované)

6.4. Produkcia peroxidov a autooxidácia

Niektorí autori popisujú, že za antibakteriálne aktivity VMK sú zodpovedné aj ich sekundárne degradačné produkty. Významnú úlohu zohráva peroxid vodíka a voľné radikály⁵⁰, prípadne autooxidačné produkty nenasýtených VMK, konkrétne oxylipíny a aldehydy s krátkymi reťazcami, u ktorých boli pozorované antibakteriálne účinky⁵⁶.

7. Záver

Antimikrobiálne látky MK proteínového a lipidového charakteru predstavujú pomerne rozsiahlu skupinu látok. Môžu pôsobiť rôznymi mechanizmami voči Gram-pozitívnym aj Gram-negatívnym mikroorganizmom, ktoré zahŕňajú pôsobenie na povrchové, ako aj intracelulárne ciele bakteriálnych buniek. V porovnaní s antibiotikami sú menej účinné. To znižuje atraktivitu ich použitia v terapeutickú praxi. Oproti antibiotikám majú však výhodu (najmä AMP) v tom, že vytvorenie rezistencie mikroorganizmov voči týmto látkam je menej pravdepodobné⁵⁷. Z tohto dôvodu je možné uvažovať o terapeutickom využití najúčinnějších z nich, a to buď samostatne alebo ako synergických zložiek vo vhodných kombináciách s inými antimikrobiálnymi látkami a antibiotikami. Preparáty s ich obsahom by mohli pomôcť aj v boji s multirezistentnými kmeňmi patogénnych mikroorganizmov. Najperspektívnejšie sa zdá byť ich využitie pri liečení kožných infekcií. Veľký potenciál pre terapeutické účely predstavuje 10-HDA. Okrem antimikrobiálnych účinkov boli popísané jej neurogéne⁵⁸, antitumorové⁵⁹ a imunomodulačné⁶⁰ účinky, čo naznačuje možnosť jej širšieho terapeutického použitia.

Najpravdepodobnejšie sa javí využitie antimikrobiálnych látok MK v prirodzenej ochrane včelstiev pred pôsobením mikrobiálnych patogénov spôsobujúcich choroby včelieho plodu. Vyššie uvedené poznatky o účinnosti niektorých látok MK voči patogénu *P. larvae* spôsobujúcemu mor včelieho plodu naznačujú, že MK by mohla byť jedným z faktorov, ktoré by mohli mať vplyv na rezistenciu včelstiev voči tejto chorobe. Šľachtenie včelstiev smerom k ich schopnosti produkovať MK s vyššou antipatogénnou aktivitou by mohlo pomôcť v boji proti tejto závažnej chorobe spôsobujúcej významné ekonomické straty včelárom a poľnohospodárom závislým od opeľovania.

Je zrejmé, že je potrebný ďalší výskum, aby sa získalo viac poznatkov o individuálnom a kombinovanom pôsobení antimikrobiálnych látok MK voči rôznym cieľovým patogénom v *in vivo* systémoch. Nové poznatky by mohli posunúť diskutované aplikačné potenciály týchto látok do oblasti ich reálneho využívania.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, projekt VEGA 2/0175/15.

LITERATÚRA

1. Beetsma J.: *Bee World* 60, 24 (1979).
2. Brouwers E. V. M., Ebert R., Beetsma J.: *J. Apicult. Res.* 26, 11 (1987).
3. Howe S. R., Dimick P. S., Benton A. W.: *J. Apicult. Res.* 24, 52 (1985).
4. Asencot M., Lensky Y.: *Insect Biochem.* 18, 127 (1988).
5. Sabatini A. G., Marcazzan G. L., Caboni M. F., Bogdanov S., Almeida-Muradian L. B.: *J. Apicult. Res.* 1, 1 (2009).
6. Lercker G., Caboni M. F., Vecchi M. A., Sabatini A. G., Nanetti A.: *Apicoltura* 8, 27 (1992).
7. Takenaka T., Echigo T.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 57, 1203 (1983).
8. Albert Š., Klaudiny J.: *J. Insect Physiol.* 50, 51 (2004).
9. Schmitzová J., Klaudiny J., Albert S., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Šimúth J.: *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020 (1998).
10. Schonleben S., Sickmann A., Mueller M. J., Reinders J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1087 (2007).
11. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. J.: *Biol. Chem.* 265, 11333 (1990).
12. Klaudiny J., Albert S., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J.: *Insect Biochem. Mol.* 35, 11 (2005).
13. Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M., Malaspina O., Palma M. S.: *Peptides* 25, 919 (2004).
14. Biliková K., Mirgorodskaya E., Bukovská G., Gobom J., Lehrach H., Šimúth J.: *Proteomics* 9, 2131 (2009).
15. Blum M. S., Novak A. F., Taber S.: *Science* 130, 452 (1959).
16. Yatsunami K., Echigo T.: *Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ.* 25, 13 (1985).
17. Melliou E., Chinou I.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 8987 (2005).
18. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffmann D.: *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329 (1999).
19. Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P.: *J. Biol. Chem.* 269, 28569 (1994).
20. Klaudiny J., Bachanová K., Kohútová L., Džúrová M., Kopernický J., Majtán J.: *Biologia* 67, 200 (2012).
21. Biliková K., Gusui W., Šimúth J.: *Apidologie* 32, 275 (2001).
22. Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J., Šimúth J.: *Apidologie* 33, 259 (2002).
23. Hancock R. E., Rozek A.: *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 143 (2002).
24. Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).
25. Jenssen H., Hamill P., Hancock E. W.: *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491 (2006).
26. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E.: *Biochemistry* 38, 7235 (1999).
27. Powers J. P., Tan A., Ramamoorthy A., Hancock R.

- E.: *Biochemistry* 44, 15504 (2005).
28. Leontiadou H., Mark A. E., Marrink S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 12156 (2006).
 29. Mihajlovic M., Lazaridis T.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1798, 1485 (2010).
 30. Pálffy R., Gardlik R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J., Celec P.: *Mol. Med.* 15, 51 (2008).
 31. Mátyus E., Kandt C., Tieleman D. P.: *Curr. Med. Chem.* 14, 2789 (2007).
 32. Plettner E., Slessor K. N., Winston M. L., Oliver J. E.: *Science* 271, 1851 (1996).
 33. Lercker G., Capella P., Conte L. S., Ruini F., Giordani G.: *Lipids* 16, 912 (1981).
 34. Noda N., Umebayashi K., Nakatani T., Miyahara K., Ishiyama K.: *Lipids* 40, 833 (2005).
 35. Isidorov V. A., Bakier S., Grzech I.: *J. Chromatogr. B* 885–886, 109 (2012).
 36. Bloodworth B. C., Harn C. S., Hock C. T., Boon Y. O.: *J. AOAC Int.* 78, 1019 (1995).
 37. Antinelli J. F., Zeggane S., Davico R., Rognone C., Faucon J. P., Lizzani L.: *Food Chem.* 80, 85 (2003).
 38. Ferioli F., Marcuzzan G. L., Caboni M. F.: *J. Sep. Sci.* 30, 1061 (2007).
 39. Zhou J. H., Xue X. F., Li Y., Zhang J. Z., Zhao J.: *J. AOAC Int.* 90, 244 (2007).
 40. Zheng C. J., Yoo J. S., Lee T. G., Cho H. Y., Kim Y. H., Kim W. G.: *FEBS Lett.* 579, 5157 (2005).
 41. Šedivá M.: *Dizertačná práca*. Univerzita Komenského, Bratislava 2014.
 42. Desbois A. P., Lebl T., Yan L., Smith V. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 755 (2008).
 43. Feldlaufer M. F., Knox D. A., Lusby W. R., Shimanuki H.: *Apidologie* 24, 95 (1993).
 44. Takigawa H., Nakagawa H., Kuzukawa M., Mori H., Imokawa G.: *Dermatology* 211, 240 (2005).
 45. Chamberlain N. R., Mehrtens B. G., Xiong Z., Kapral F. A., Boardman J. L., Rearick J. I.: *Infect. Immun.* 59, 4332 (1991).
 46. Stulnig T. M., Huber J., Leitinger N., Imre E.-M., Angelisová N. P., Waldhäusl W.: *J. Biol. Chem.* 276, 37335 (2001).
 47. Shin S. Y., Bajpai V. K., Kim H. R., Kang S. C.: *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 1515 (2007).
 48. Wojtczak L., Więckowski M. R.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 447 (1999).
 49. Won S. R., Hong M. J., Kim Y. M., Li C. Y., Kim J. W., Rhee H. I.: *FEBS Lett.* 581, 4999 (2007).
 50. Hamel F. G.: *Metabolism* 58, 1047 (2009).
 51. Schönfeld P., Wojtczak L.: *Free Radical Biol. Med.* 45, 231 (2008).
 52. Desbois A. P., Smith J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629 (2010).
 53. Peters J. S., Chin C. K.: *Plant Physiol. Biochem.* 41, 117 (2003).
 54. Galbraith H., Miller T. B.: *J. Appl. Bacteriol.* 36, 659 (1973).
 55. Boyaval P., Corre C., Dupuis C., Roussel E.: *Lait* 75, 17 (1995).
 56. Adolph S., Bach S., Blondel M., Cueff A., Moreau M., Pohnert G., Poulet S. A., Wichard T., Zuccaro A.: *J. Exp. Biol.* 207, 2935 (2004).
 57. Bulet P., Stöcklin R.: *Protein Peptide Lett.* 12, 3 (2005).
 58. Hattori N., Nomoto H., Fukumitsu H., Mishima S., Furukawa S.: *Biomed. Res.* 28, 261 (2007).
 59. Izuta H., Chikaraishi Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H.: *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 6, 489 (2009).
 60. Mihajlovic D., Vucevic D., Chinou I., Colic M.: *Eur. Food Res. Technol.* 238, 881 (2014).

M. Šedivá and J. Klaudiny (*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **The Antimicrobial Substances of Royal Jelly**

Royal jelly (RJ) is an important product of bees. It is a unique source of bioactive compounds, among others of the substances with antimicrobial properties. Five antimicrobial compounds with protein and lipid structures occur in RJ: peptides defensin 1, jelleins and protein apalbumin 2a as well as various derivatives of saturated and unsaturated fatty acids with 8–12 C atoms. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, one of the main components of RJ, shows various biological activities. Antimicrobial substances of RJ are active against the tested strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Their antimicrobial activity is mediated by mechanisms leading to the increased permeability of the cytoplasmic membrane or consists in the inhibition of intracellular processes. Several RJ antimicrobial compounds deserve further research due to their potential applications in medical, veterinary and apidological practice.

STRIGOLAKTONY – STRUKTURA A FUNKCE V ROSTLINÁCH

MARCELA DVOŘÁKOVÁ a TOMÁŠ VANĚK

Laboratoř rostlinných biotechnologií, Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
vanek@ueb.cas.cz

Došlo 21.1.15, přijato 26.3.15.

Klíčová slova: strigolaktomy, fytohormony, arbuskulární mykorhizní houby, parazitické rostliny, mechanismus

Obsah

1. Úvod
2. Funkce strigolaktonů v rostlinách
 - 2.1. Parazitické rostliny
 - 2.2. AM houby
 - 2.3. Fytohormony
3. Chemie strigolaktonů
 - 3.1. Biosyntéza strigolaktonů
 - 3.2. Přírodní strigolaktomy – chemická struktura
 - 3.3. Syntetické deriváty strigolaktonů
 - 3.4. Vliv struktury na aktivitu strigolaktonů
 - 3.4.1. Klíčení parazitických rostlin
 - 3.4.2. Symbióza s AM houbami
 - 3.4.3. Vývoj rostliny
 - 3.5. Mechanismus účinku strigolaktonů
4. Závěr

1. Úvod

Strigolaktomy, seskviterpenoidní laktomy biogeneticky příbuzné karotenoidům, jsou nejmladší identifikovanou skupinou fytohormonů regulující růst a větvení výhonků a kořenů, klíčení semen či fotomorfogenezi^{1,2}. Strigolaktomy byly známy již dříve, ale pouze jako signální molekuly rostlin hrající zásadní roli v symbióze rostlin a parazitických plevelů nebo arbuskulárních mykorhizních hub (AM hub)³.

Strigolaktomy jsou produkovány ve velmi nízkých koncentracích především v kořenech rostlin a následně jsou částečně uvolňovány do rhizosféry. Strigolaktomy byly dosud nalezeny u všech zkoumaných suchozemských rostlin, a to i u těch, které netvoří symbiózu s AM houbami či parazitickými rostlinami³.

2. Funkce strigolaktonů v rostlinách

2.1. Parazitické rostliny

Prvotně byly strigolaktomy identifikovány jako látky hostitelské rostliny ovlivňující klíčení semen parazitických rostlin rodu *Orobanch* či *Striga*⁴. Tyto parazitické rostliny napadají celou řadu zemědělských plodin, jako jsou kukuřice, rýže, čirok, proso, rajče, slunečnice, tabák či luštěniny, a to zejména v oblastech subsaharské Afriky a ve východní a jižní Evropě⁵. Parazitické rostliny dokáží vyprodukovat až 100 000 semen za jedno vegetační období a tato semena jsou navíc schopna přežít v půdě v dormanci až několik let⁶. I proto tyto parazitické rostliny způsobují masivní ztráty v produkci zemědělských plodin odhadnuté jen pro rod *Striga* přes 7 miliard dolarů ročně³. Z tohoto důvodu je velmi důležitá možnost ovlivnění klíčení semen parazitických rostlin k regulaci jejich výskytu a růstu.

Regulace růstu a vývoje parazitických rostlin je extrémně složitá kvůli jejich složitému životnímu cyklu, vaskulárnímu propojení s hostitelem, produkci spousty dlouhožijících semínek a schopnosti zničit hostitele ještě pod zemí⁶. Semena parazitických rostlin klíčí pouze na základě přijetí signálu vyvolaného stimulatory klíčení, například právě strigolaktomy, přítomnými v půdě⁵. Vyklíčená semena jsou pak schopná navázat se na kořeny hostitelské rostliny, přičemž vzniká speciální orgán, haustorium, který vytvoří propojení s vaskulárním systémem rostliny⁵. Parazitická rostlina pak odebírá hostitelské rostlině vodu, živiny i hormony, což snižuje produkci této hostitelské rostliny.

Napojení vyklíčených semen na hostitelskou rostlinu musí proběhnout v řádu několika dnů, jinak vyklíčené semeno zahyne. Tuto kritickou fázi ve vývoji parazitické rostliny by bylo možné využít pro regulaci jejich výskytu tzv. „sebevražedným klíčením“, kdy se pomocí stimulatoru klíčení nechají semena v půdě vyklíčit bez přítomnosti hostitelské rostliny. Vyklíčená semena se tak nemohou dále vyvíjet a zahynou a teprve poté se do takto ošetřené půdy vysadí průmyslové plodiny^{5,7}. Jinou možností využití strigolaktonů pro regulaci klíčení semen parazitických rostlin je jejich aplikace ve formě disperze s pomocí vhodného emulzifikátoru, jež se využívá u jiných herbicidů^{8,9}.

2.2. AM houby

V roce 2005 bylo poprvé publikováno, že strigolaktomy v rhizosféře ovlivňují také interakci hostitelské rostliny a AM hub. Strigolaktomy slouží jako signál k rozeznání hostitele a vyvolávají u hub vývoj výtrusnic a hyf důležitých pro kolonizaci kořenů. Na základě signálu se na hyfě vytvoří apresorium schopné pronikat kořeny rostlin, kde se hyfy diferencují na hustě větvené struktury zvané arbusku-

ly zajišťující výměnu živin¹⁰.

AM houby jsou závislé na uhlíku, který přijímají od hostitele ve formě cukrů, jehož kořeny kolonizují a výměnou mu zajišťují lepší příjem živin (P, N, minerálů). Symbióza rostlin s AM houbami je stará více než 400 milionů let a tvoří ji přes 80 % suchozemských rostlin, AM houby tak hrály zásadní roli v kolonizaci Země rostlinami³. Lepší příjem živin zvyšuje schopnost rostlin růst a vyvíjet se jako i odolávat stresu a patogenům¹⁰.

2.3. Fytohormony

Teprve nedávno bylo zjištěno, že strigolaktony působí také jako fytohormony^{1,2}. Tato jejich funkce byla objevena v souvislosti s potvrzením jejich role v ovlivnění větvení výhonků^{1,2}. Následně bylo zjištěno, že ovlivňují vývoj kořenů a dalších částí rostliny.

Strigolaktony interagují také s dalšími rostlinnými hormony jako jsou auxiny, gibereliny nebo kyselina abscisová³. Vypadá to, že funkce strigolaktonů jako fytohormonů souvisí s jejich schopností modulovat transport auxinů, dělení buněk, či rozdělení živin. Bylo například zjištěno, že strigolaktony inhibují dělení buněk kořenů, a tím inhibují jejich náhodný růst; podporují prodlužování kořenových vlásečnic; podporují růst stonku; ovlivňují vývoj hlízek; inhibují vývoj nových výhonků; podporují růst kambia; a také zachovávají fosforovou a dusíkovou rovnováhu v rostlinných buňkách^{1–3,8,11}. V podstatě lze říci, že rostlina reaguje na změny v prostředí změnou v produkci strigolaktonů a zajišťuje si tak optimální růst za daných podmínek^{3,11}.

Produkce strigolaktonů je v rostlinách výrazně stimulována (může vzrůst až 100 000×) za nedostatku fosforu v půdě, což může znamenat, že strigolaktony jsou klíčovým endogenním signálem, pomocí kterého je ovlivňována dostupnost živin a růst a vývoj rostliny¹¹. To souvisí také se schopností rostlin adaptovat růst kořenů a výhonků na chudé nutriční podmínky. Při nedostatku fosforu je inhibován růst primárních kořenů, ale zpočátku rostou vedlejší kořeny, jejichž růst se po čase zastaví a stimulováno je pouze zvětšování jejich hustoty¹¹. Některé rostlinné druhy zvyšují produkci strigolaktonů za účelem zvýšení přijímání fosforu z prostředí vlivem lepší spolupráce s AM houbami¹¹.

3. Chemie strigolaktonů

3.1. Biosyntéza strigolaktonů

Hlavním místem biosyntézy strigolaktonů v rostlinách jsou kořeny, odkud jsou strigolaktony transportovány do nadzemních částí rostliny a uvolňovány do rhizosféry¹⁰.

Biosyntéza strigolaktonů vychází z karotenoidů vedoucí ke karlaktону jako výchozí látce pro následnou syntézu strigolaktonů. Jedná se o oxidativní štěpení C40 karotenoidů vzniklých nemevalonátovou (methylerytritol fosfátovou) cestou v plastidech buněk¹⁰. Způsob biosyntézy

strigolaktonů byl zjištěn na základě použití fluoridonu, inhibitoru biosyntézy karotenoidů¹².

Mezi enzymy podílející se na biosyntéze strigolaktonů patří karotenoidy štěpící deoxygenasy (carotenoid cleavage deoxygenase) CCD7 a CCD8 a karotenoid-isomerasa DWARF27 (D27)¹². Pomocí těchto enzymů vzniká z *trans*-β-karotenu jediný stereoisomer karlaktónu, 11*R*-karlaktón (Schéma 1). Enzymy následně metabolizují 11*R*-karlaktón na strigolaktony zůstávaly donedávna neznámé¹². Prvním enzymem u něhož byla potvrzena jeho schopnost metabolizovat 11*R*-karlaktón na strigolaktón, a to na (–)-(3*aR*,4*R*,8*bR*,2′*R*)-5-deoxystrigol, byl člen CYP711, CYP711A1, podskupiny enzymů cytochromu P450 kódovaný MAX1 (more axillary growth 1) proteinem¹³. Jiný člen této podskupiny je pak schopen oxidace 11*R*-karlaktónu na (–)-(3*aR*,4*R*,8*bR*,2′*R*)-orobanchol.

Na přenosu signálů strigolaktonů se podílejí například enzymy D14, resp. DAD2, α/β-fold hydrolasa a na leucin bohatý F-box protein MAX2/D3/RMS4¹⁴. D14 hydrolyzuje strigolaktony na neaktivní produkty¹⁴ (Schéma 1).

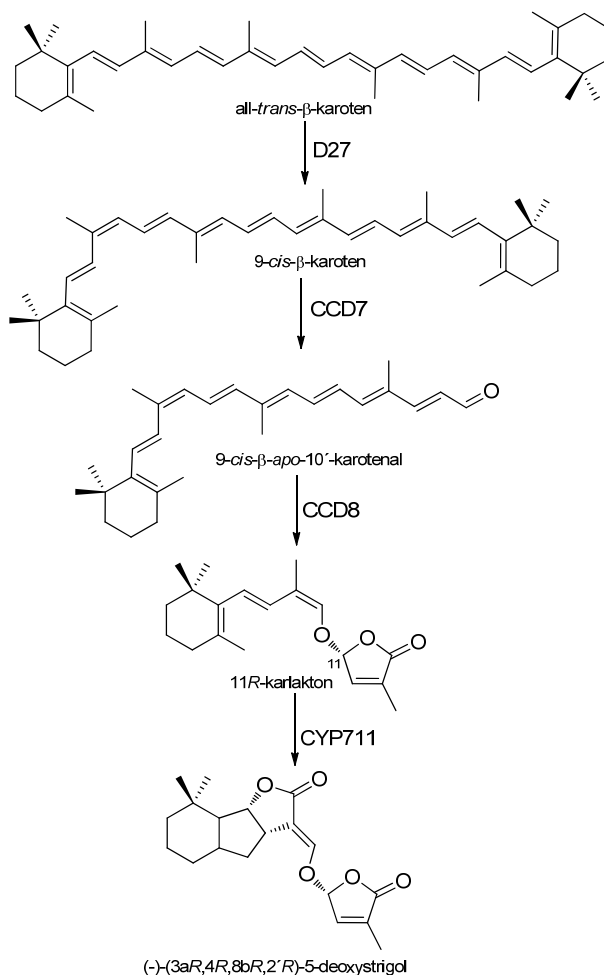


Schéma 1. Biosyntéza strigolaktonů

3.2. Přírodní strigolaktony – chemická struktura

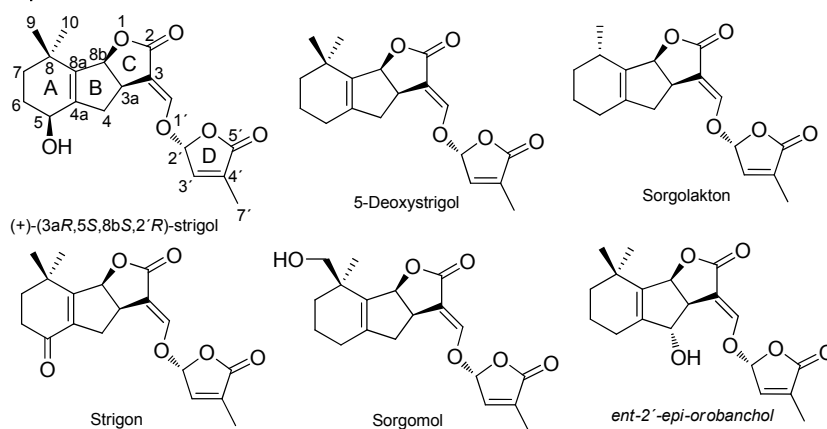
Jednotlivé rostlinné druhy jsou schopné produkce celé řady různých strigolaktonů v různém poměru. Je pravděpodobné, že rostliny dokáží syntetizovat až stovky stereoisomerů strigolaktonů, ale my jsme schopni izolovat jen ty, které jsou produkovány v největším množství¹⁵.

Identifikaci a charakterizaci strigolaktonů ztěžuje zejména jejich velmi nízká koncentrace v rostlinách – tyto látky jsou aktivní za koncentrací tak nízkých, jako je 10^{-13} M (AM houby), 10^{-12} M (parazitické rostliny), 10^{-8} M (hormonální funkce) – a jejich přítomnost v kořenových exudátech, která je na úrovni pikogramů¹⁶. Kořenové

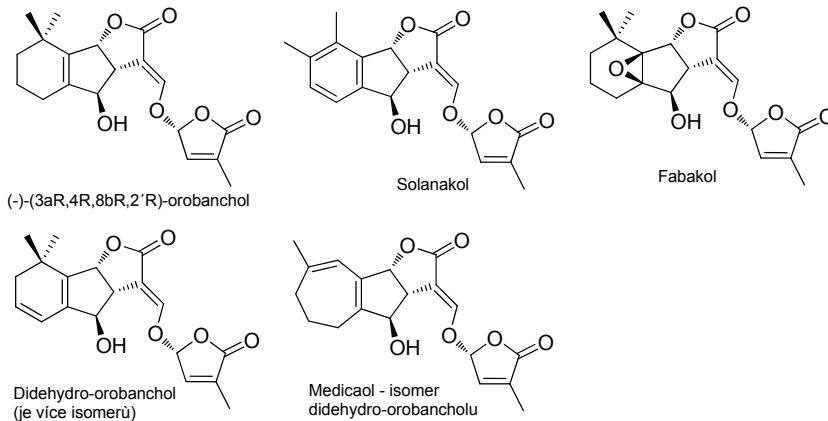
exudáty hostitelských rostlin obsahují zpravidla směs strigolaktonů, a to často v různém poměru⁵.

Izolace strigolaktonů z kořenových exudátů je prováděna s pomocí hydroponických kultur rostlin, jako je např. rýže, kdy jsou kořenové exudáty uvolněné do média adsorbovány na aktivním uhlí, z něhož se pak extrahují. Následným rozdělením extraktu na silikagelu pomocí řádově několika gradientových elucí lze separovat jednotlivé strigolaktomy. K získání strigolaktonů v množství potřebném k jejich identifikaci jsou třeba stovky rostlin v závislosti na koncentraci strigolaktonů v příslušných kořenových exudátech¹⁷.

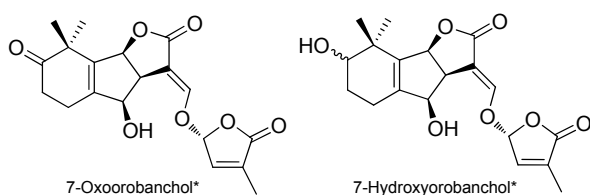
S β-orientací C kruhu:



S α-orientací C kruhu:



Izolované deriváty s nejasnou stereochemií:



Obr. 1. Identifikované přírodní strigolaktomy

Analýza a identifikace látek izolovaných z přírodních materiálů je vždy velmi náročná a přesné určení struktury včetně stereochemie je možné až na základě porovnání retenčních časů a spektroskopických dat autentických a syntetických látek změřených na GC-MS nebo LC-MS/MS. Při analýze směsí je často nezbytná zdlouhavá optimalizace podmínek kapalinové chromatografie, tak aby byla možná identifikace všech látek. Nezbytné je také použití chirální LC-MS/MS pro správné určení stereoisomerů. Pro správné určení stereochemie je kromě chirální LC-MS/MS důležité také měření CD spekter. U izolovaných jednotlivých zástupců strigolaktonů je pak pro plnou charakterizaci nezbytné také měření NMR spekter. Totální syntéza navržených struktur přírodních látek je v takovém případě pro identifikaci jednotlivých látek velmi důležitá a značně ji usnadňuje.

Strukturním základem strigolaktonů je různě substituovaný tricyklický lakton (kruhy A,B,C), který je enol etherovou vazbou spojen s α,β -nenasyceným furanem (kruh D; obr. 1). Prvním izolovaným strigolaktonem byl (+)-(3aR,5S,8bS,2'R)-strigol izolovaný v roce 1966 z kořenových exudátů bavlny (obr. 1)⁴.

Dalšími izolovanými strigolaktony byly v roce 1992 sorgolakton a alektrol, následované v roce 1998 orobancholem⁸. Navržené struktury a stereochemie těchto izolovaných látek byly odhadnuty na základě spektroskopické analýzy v porovnání s (+)-strigolem⁸. Pozdějším porovnáním spektroskopických dat autentických a syntetických látek se podařilo určit přesné struktury i stereoisomerii orobancholu a alektrolu¹⁸. Bylo zjištěno, že izolovaný orobanchol je ve skutečnosti (–)-(3aR,4R,8bR,2'R)-orobanchol a ne původně navržený (3aS,4S,8bS,2'R)-orobanchol (obr. 1). Struktura alektrolu byla určena jako (3aR,4R,8bR,2'R)-orobanchyl acetát¹⁸.

Vzhledem k tomu, že v molekulách strigolaktonů se nachází několik center chiralit, je kromě klasického IUPAC názvosloví používáno i názvosloví, které pomocí předpon *ent* a *epi* vyjadřuje vztah dané struktury určitého strigolaktonu vůči struktuře referenčního strigolaktonu. V případě, že je předponou *ent*, je daná struktura enantiomerem referenční molekuly, je-li předponou *epi*, má opačnou konfiguraci na uvedeném atomu. Zmatení ale může způsobit výběr referenční molekuly, kdy jedni^{8,18} používají jako referenční molekulu (+)-(3aR,5S,8bS,2'R)-strigol, ale jiní¹¹ zase (–)-(3aR,4R,8bR,2'R)-orobanchol¹⁵.

Zwanenburg a Pospíšil⁸ navrhli nazývat správnou strukturu orobancholu „přírodní stereoisomer orobancholu“, aby nedocházelo k záměně se strukturou původně navrhovanou pro orobanchol. Zavádějící ale v tomto případě může být to, že nedávno Xie a spol.¹⁷ identifikovali tento původně navržený stereoisomer orobancholu (*ent*-2'-*epi*-orobanchol, neboli (3aS,5S,8bS,2'R)-orobanchol, obr. 1) v kořenových exudátech tabáku a pokud je jeho strukturní identita správná, pak je tento stereoisomer také přírodním stereoisomerem.

Dle absolutní konfigurace BCD strukturní části molekuly se přírodní strigolaktony dělí na dvě skupiny, ty které mají orientaci C kruhu stejnou s (+)-strigolem (C kruh má

β -orientaci): strigyl acetát, sorgomol, sorgolakton, strigon, 5-deoxystrigol, *ent*-2'-*epi*-orobanchol, a ty s konfigurací stejnou jako má (–)-orobanchol (C kruh má α -orientaci): orobanchyl acetát, fabacyl acetát, solanakol, solanacyl acetát¹⁵.

Do dnešní doby bylo identifikováno a charakterizováno přibližně 18 strigolaktonů z kořenových exudátů. Jejich základní struktury jsou uvedeny na obr. 1 (cit.^{17–20}). Od všech hydroxylovaných strigolaktonů byly charakterizovány i příslušné acetáty. Dostupná spektroskopická data jednotlivých derivátů byla shrnuta v práci Cavara a spol.¹⁵.

V případě 7-oxoorobancholu a 7-hydroxyorobancholu jsou na obr. 1 uvedeny jejich stereoisomery tak, jak jsou dostupné v literatuře¹⁹, tedy s β -orientací C kruhu, a označeny hvězdičkou, neboť je pravděpodobné, že ve skutečnosti budou mít tyto deriváty α -orientaci C kruhu odpovídající (–)-orobancholu¹⁷. Revize jejich CD spekter je nutná pro potvrzení této teorie.

3.3. Syntetické deriváty strigolaktonů

Přírodní strigolaktony jsou velmi složité molekuly a jejich syntéza je tudíž obtížná a drahá. Vývoj nových derivátů strigolaktonů s potenciálně vyšší aktivitou a stabilitou je proto velmi žádoucí. V případě syntetických derivátů je důležité připravit strigolaktony stabilnější vůči hydrolýze, které by byly schopny setrvat v půdě déle a bylo tak možné je využít např. k regulaci klíčení parazitických rostlin při tzv. „sebevražedném klíčení“ (viz kapitola 2.1.)⁵.

Syntetické deriváty strigolaktonů lze rozdělit na syntetická analoga, u nichž je zachována enol etherová vazba a syntetická mimika, která tuto enol etherovou vazbu postrádá.

Do dnešní doby byla připravena řada syntetických derivátů strigolaktonů, z nichž derivát GR24 (obr. 2A) se používá jako referenční molekula při testech aktivity nových derivátů²¹. Od testování GR (germination releaser) derivátů k regulaci výskytu parazitických rostlin bylo upuštěno, pravděpodobně kvůli nízké stabilitě derivátů v bazické půdě a komerční dostupnosti⁶. Také bylo zjištěno, že GR24 neindukuje klíčení u *S. gesneriodes*, nejrozšířenější parazitické rostliny ohrožující produkci luštěnin rodu *Vigna* v subsaharských oblastech Afriky⁶.

Dalšími připravenými deriváty (obr. 2) jsou deriváty s modifikovaným nebo chybějícím A kruhem (obr. 2B), B kruhem (obr. 2C) i C kruhem (obr. 2D)^{22–24} nebo se změněnou enol etherovou vazbou (obr. 2E)^{25,26}. Připraveny byly také karbaderiváty GR analogů strigolaktonů (obr. 2A), jako potenciální inhibitory produkce strigolaktonů, ale tato inhibice u nich nebyla prokázána⁵. Naopak, jednoduché deriváty strigolaktonů se zachovaným D kruhem, ale se scházející enol etherovou vazbou byly aktivní při stimulaci klíčení semen u rodu *Orbanche*^{22,25,26}. Jiné takové deriváty zase výrazně inhibovaly růst výhonků²⁷. Nedávno byly připraveny také fluorescenční deriváty strigolaktonů, které mohou být užitečné k detekci receptorů *in vivo*^{28–30}.

3.4. Vliv struktury na aktivitu strigolaktonů

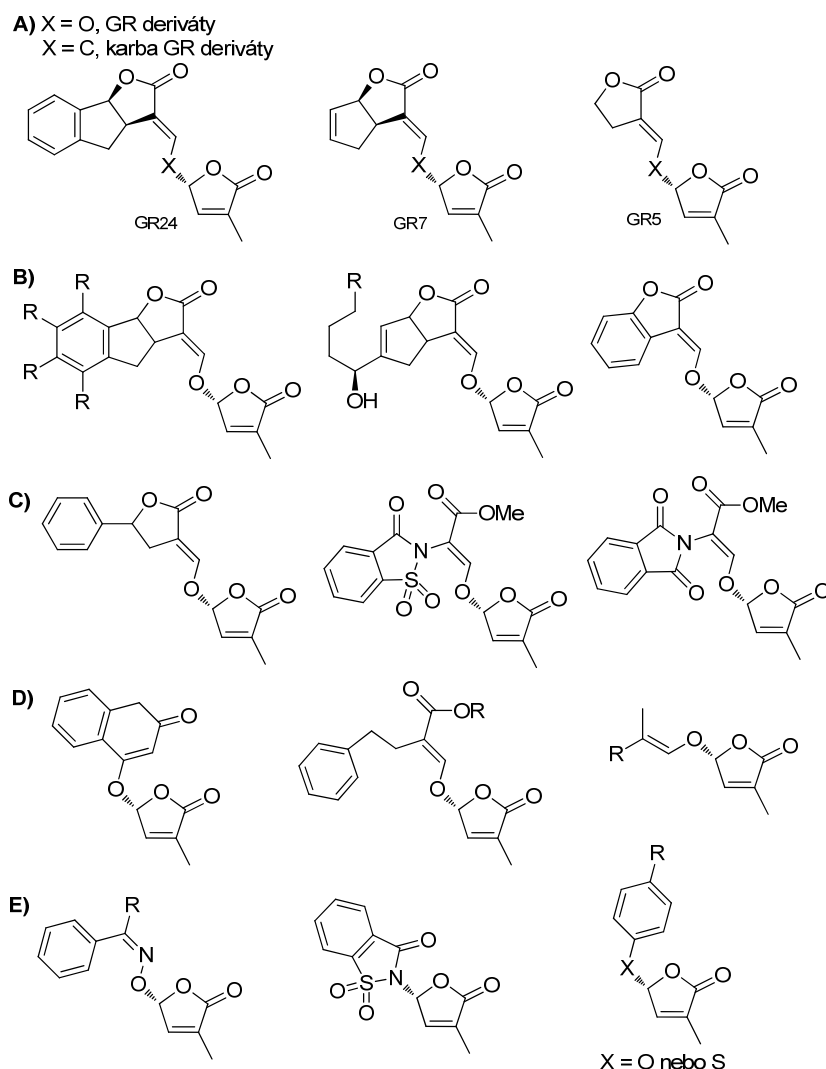
Všechny dosud známé přírodní strigolaktomy mají stejnou strukturu CD kruhů s methylem v pozici C4', což naznačuje důležitost tohoto motivu pro bioaktivitu strigolaktonů^{5,16}. Aktivita strigolaktonů v půdě závisí na celé řadě faktorů, jako je bazicita či vlhkost půdy, což je dáno zejména přítomností enol etherové vazby v molekule strigolaktonů, jež je velmi nestabilní vůči hydrolýze ve vodném prostředí^{6,31}. Z tohoto důvodu je přítomnost strigolaktonů v půdě jen krátkodobá.

3.4.1. Klíčení parazitických rostlin

Struktura kruhů C a D a jejich spojení enol etherovou vazbou výrazně ovlivňuje aktivitu strigolaktonů vůči jejich schopnosti stimulovat klíčení semen parazitických rostlin.

Předpokládá se, že k interakci molekuly v aktivním místě receptoru dochází pomocí adičně-eliminačního mechanismu iniciovaného Michaelovou adicí nukleofilu na enol etherovou vazbu a následného odštěpení D kruhu (viz kapitola 3.5.)²⁰. Přítomnost kruhů A a B není v tomto případě nezbytná, ale pravděpodobně zajišťuje lepší vazbu strigolaktonu na receptor. Substituce na A kruhu, otevření B kruhu či modifikace nebo otevření C kruhu nemá výraznější efekt na aktivitu strigolaktonů^{22,23}. Naopak, stereochemie substituentů na strigolaktonovém skeletu má vliv na jejich biologickou aktivitu. Bylo zjištěno, že nejaktivnější jsou látky se stereochemií analogickou přírodnímu strigolu, 3*aR*,5*S*,8*bS*,2'*R* (cit.⁵).

Tyto strukturální charakteristiky jsou důležité pro bioaktivitu všech strigolaktonů, ale jednotlivé deriváty strigolaktonů jsou často aktivní pouze vůči určitému druhu nebo



Obr. 2. **Syntetické deriváty strigolaktonů:** A) GR deriváty a karba-GR-deriváty, B) deriváty s modifikovaným nebo chybějícím A kruhem, C) deriváty s modifikovaným nebo chybějícím B kruhem, D) deriváty s modifikovaným nebo chybějícím C kruhem, E) deriváty se změněnou enol etherovou vazbou

rodu parazitické rostliny, což poukazuje na rozdílnost aktivních míst receptorů strigolaktonů. Například deriváty strigolu stimulující klíčení semen parazitických rostlin rodu *Striga* jsou výrazně méně aktivní při stimulaci klíčení semen u rodu *Orobanchae*³².

K testování vlivu strigolaktonů na klíčení semen parazitických rostlin v laboratorních podmínkách se standardně používá metoda popsaná Mangnusem a spol.²¹. Nedávno publikovali Pouvreau a spol.³³ novou jednoduchou metodu založenou na spektroskopickém měření redukce MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu.

Některé deriváty strigolaktonů byly testovány i v polních podmínkách k vyvolání tzv. sebevražedného klíčení semen parazitických rostlin (viz kap. 2.1.). Takový způsob regulace výskytu parazitických rostlin byl vyzkoušen poprvé již v roce 1976, kdy byl testován na *S. asiatica* a *O. ramosa* derivát GR7 za koncentrace 10 mg l⁻¹ se slibnými výsledky⁷. Takto testován byl také derivát GR24 (cit.⁸). Od 80. let ale již žádné další pokusy ani s jinými deriváty strigolaktonů nebyly publikovány⁸. Pouze Kgosi a spol.⁶ zkoumali *in vitro* vliv některých nových derivátů na klíčení semen rodu *Striga*.

Jiný způsob regulace výskytu parazitických rostlin byl použit například u derivátu Nijmegen-1, jež byl aplikován na tabáková pole napadená *O. ramosa* L. ve formě emulze (viz kap. 2.1.). Po čtyřech cyklech aplikace se podařilo snížit napadení tabáku až o 95 % (cit.⁹).

3.4.2. Symbióza s AM houbami

V případě symbiózy rostlin s AM houbami je pro aktivitu strigolaktonů důležitá nejen přítomnost CD skeletu, ale také přítomnost kruhů A i B a jejich substituentů. Akiyama a spol.¹⁰ testovali 44 strigolaktonů lišících se jak strukturně, tak pouze absolutní konfigurací. Tím bylo zjištěno, že redukcí enol etherové vazby nebo její záměnou za iminovou vazbu se aktivita strigolaktonů na vývoj hyf AM hub výrazně nesnižuje, a naopak, že odstraněním A kruhu nebo AB části molekuly se aktivita výrazně snižuje. Přestože určité modifikace AB skeletu strigolaktonů jsou možné, substituce těchto dvou kruhů má výrazný efekt na aktivitu, zejména v případě polární substituce A kruhu nebo jeho nahrazení aromatickým kruhem, které vedou k výraznému snížení aktivity¹⁰.

3.4.3. Vývoj rostliny

Vliv struktury strigolaktonů na jejich fytohormonální aktivitu není tak dobře prozkoumán jako vliv na klíčení semen parazitických rostlin.

Fytohormonální aktivitu strigolaktonů zkoumal Boyer a spol.¹⁶, který sledoval vliv 42 derivátů strigolaktonů na růst pupenů u hrachu, pro určení vztahu struktury strigolaktonů a jejich fytohormonální aktivity. Z výsledků vyplývá, že stereochemie na C2' jakož i přítomnost kruhů A a B není pro tuto aktivitu nezbytná. Naopak, struktura kruhů C a D zásadně ovlivňuje aktivitu, přičemž extra methylová skupina na uhlíku C3' velmi výrazně aktivitu zvyšuje¹⁶.

Fukui a spol.²⁷ připravili řadu fenoxifyranonových derivátů postrádajících enol etherovou vazbu a tyto derivá-

ty testovali na jejich schopnost inhibovat větvení výhonků. Většina připravených derivátů větvení inhibovala, a to i lépe než GR24. Z toho vyplývá, že přítomnost enol etherové vazby není nezbytná pro fytohormonální aktivitu strigolaktonů.

3.5. Mechanismus účinku strigolaktonů

Mechanismus účinku strigolaktonů není zcela jasný – v současné době existují tři teorie mechanismu účinku (Schéma 2). První, odvozená na základě reaktivity syntetického derivátu GR24 vůči nukleofilům, předpokládá Michaelovu adici nukleofilu na enol etherovou vazbu (Schéma 2A)³¹. Tuto teorii podporuje neaktivita karba a dihydroderivátů GR24.

Druhá teorie předpokládá adici nukleofilu na furanon v pozici C3' a následnou eliminaci skupiny na C2' po protonovém přesmyku (Schéma 2B)²². Pomocí tohoto druhého mechanismu lze vysvětlit, proč i syntetické strigolaktony postrádající enol etherovou vazbu jsou aktivní při působení na klíčení semen. Skupina eliminující se z C2' musí být v tomto případě dobrou odstupující skupinou. Například alkoxy skupina není dobrou odstupující skupinou, a proto byly takové deriváty neaktivní vůči klíčení semen rodu *Striga*²². Aktivita ale byla zjištěna pro některé

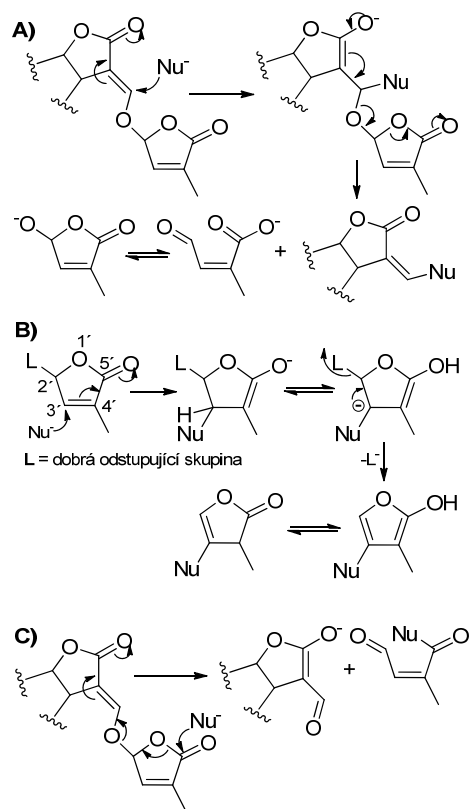


Schéma 2. Mechanismus účinku strigolaktonů: A) založený na adici na enol etherovou vazbu, B) založený na adici na furanon v pozici C3', C) založený na adici na furanon v pozici C5'

aryloxy deriváty²⁷. Pro potvrzení tohoto mechanismu byly syntetizovány benzyloxy deriváty s methylovou skupinou v pozici C3', u nichž není možný přenos vodíku a tudíž by takové deriváty měly být neaktivní, což se také potvrdilo⁸. V ostrém kontrastu s těmito výsledky je ale aktivita derivátů s methylovou skupinou v pozici C3' jako fytohormonů. Boyer a spol.¹⁶ zjistili, že extra methylová skupina na uhlíku C3' velmi výrazně zvyšuje aktivitu derivátů strigolaktonů, tudíž mechanismus působení zde musí být jiný.

Třetí teorie předpokládá adici nukleofilu na furanon v pozici C5' (Schéma 2C)³⁴. Pomocí tohoto mechanismu lze vysvětlit aktivitu jak enol etherových derivátů, tak i derivátů tuto vazbu postrádajících, u těch ale musí být stále splněna podmínka přítomnosti dobré odstupující na C2'. Zároveň tak lze vysvětlit i fytohormonální aktivitu derivátů s methylovou skupinou v pozici C3'. Zwanenburg a Pospíšil⁸ ale tvrdí, že tento mechanismus neodpovídá obecně akceptovanému adičně-eliminačnímu mechanismu hydrolýzy esterů přes sp³ meziprodukt.

V případě prvního mechanismu by Michaelova adice nukleofilu na enol etherovou vazbu strigolaktonů například v buňkách semen parazitických rostlin vedla ke kovalentní vazbě ABC-části molekuly na receptor, čímž by vyvolala klíčení těchto semen⁵. Do současné doby ale není známa ani podoba takového receptoru ani jeho případná lokalizace v rámci semene⁸.

Snahy o nalezení takového receptoru vedly k syntéze fluorescenčních derivátů strigolaktonů²⁸. Bohužel velmi nízká optimální koncentrace látky znemožnila detekci receptoru pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Byly proto připraveny jiné deriváty, u nichž byl na molekulu strigolaktonu GR24 navázán biotin. V tomto případě lze případný protein izolovat afinitní chromatografií s imobilizovaným avidinem nebo streptavidinem. Tímto způsobem se podařilo separovat jeden potenciální receptor, 60 kDa protein⁵. Další podrobnosti o tomto proteinu ale publikovány nebyly. Pouze o čtyři roky později Zwanenburg a Pospíšil zmínili ve svém přehledu, že hlavním problémem při izolaci tohoto proteinu je jeho extrakce⁸. Přestože byly od té doby připraveny i další fluorescenční deriváty^{29,30}, žádné další potenciální receptory dosud identifikovány nebyly.

4. Závěr

Výzkum strigolaktonů, příprava nových derivátů a studium jejich biologické aktivity jsou důležité pro získání detailnějších informací o jejich působení na vývoj rostliny a jejich symbiotických partnerů, které může vést k praktickému využití v regulaci příjmu živin, růstu či vývoje výhonků a kořenů rostliny jakož i vývoje AM hub nebo parazitických rostlin. V současné době se syntéza nových derivátů soustřeďuje zejména do oblasti regulace klíčení semen parazitických rostlin, kdy je možností jak příprava derivátů stimulujících klíčení semen parazitických rostlin, tak i derivátů inhibujících procesy v rostlině vedoucí k produkci strigolaktonů. Dalším směrem, kterým

se syntéza nových derivátů ubírá, je příprava fluorescenčních derivátů, jež by umožnily izolaci příslušných receptorů.

Autoři děkují za podporu projektu COST LD14127 od MŠMT, Česká republika.

Seznam symbolů

AM houby	arbuskulární mykorhizní houby
CCD7, CCD8	karotenoidy štěpící deoxygenasy (carotenoid cleavage deoxygenase)
CD spektra	spektra cirkulárního dichroismu
CYP711	podskupina enzymů cytochromu P450
D14	α/β -fold hydrolasa
D27	karotenoid-isomerasa DWARF27
GR	germination releaser = stimulátor klíčení
MAX1	more axillary growth 1 proteinem
MAX2/D3/RMS4	na leucin bohatý F-box protein
MTT	
NMR	nukleární magnetická rezonance
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním detektorem

LITERATURA

- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pages V., Dun E. A., Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. C., Bouwmeester H., Be'card G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange S. F.: *Nature* 455, 189 (2008).
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojima J., Yamaguchi S.: *Nature* 455, 195 (2008).
- Foo E., Reid J. B.: *J. Plant Growth Regul.* 32, 429 (2013).
- Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., Egley G. H.: *Science* 154, 1189 (1966).
- Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D.: *Pest Manag. Sci.* 65, 478 (2009).
- Kgosi R. L., Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Murdoch A. J.: *Weed Res.* 52, 197 (2012).
- Johnson A. W., Roseberry G., Parker C.: *Weed Res.* 16, 223 (1976).
- Zwanenburg B., Pospíšil T.: *Mol. Plant.* 6, 38 (2013).
- Wigchert S. C. M., Kuiper E., Boelhouwer G. J., Neffkens G. H. L., Verkleij J. A. C., Zwanenburg B.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 1705 (1999).
- Akiyama K., Ogasawara S., Ito S., Hayashi H.: *Plant Cell Physiol.* 51, 1104 (2010).
- Yoneyama K., Xie X., Kim H. I., Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama K.: *Planta* 235, 1197 (2012).

12. Seto Y., Sado A., Asami K., Hanada A., Umehara M., Akiyama K., Yamaguchi S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 1640 (2014).
13. Zhang Y., van Dijk A. D. J., Scaffidi A., Flematti G. R., Hofmann M., Charnikhova T., Verstappen F., Hepworth J., van der Krol S., Leyser O., Smith S. M., Zwanenburg B., Al-Babili S., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. J.: *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1028 (2014).
14. Hamiaux C., Drummond R. S. M., Janssen B. J., Ledger S. E., Cooney J. M.: *Curr. Biol.* **22**, 2032 (2012).
15. Cavar S., Zwanenburg B., Trkowski P.: *Phytochem. Rev.* **2015**, in press, doi: 10.1007/s11101-014-9370-4.
16. Boyer F. D., de Saint Germain A., Pillot J. P., Pouvreau J. B., Chen V. X., Ramos S., Ste'venin A., Simier P., Delavault P., Beau J. M., Rameau C.: *Plant Physiol.* **159**, 1524 (2012).
17. Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Uchida K., Ito S., Akiyama K., Hayashin H., Yokota T., Nomura T., Yoneyama K.: *Mol. Plant.* **6**, 153 (2013).
18. Ueno K., Nomura S., Muranaka S., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y.: *J. Agric. Food Chem.* **59**, 10485 (2011).
19. Xie X., Yoenyama K., Kurita J.-Y., Harada Y., Yamada Y., Takeuchi Y., Yoneyama Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1367 (2009).
20. Chen V. X., Boyer F. D., Rameau C., Pillot J.-P., Vors J.-P., Beau J.-M.: *Chem.-Eur. J.* **19**, 4849 (2013).
21. Mangnus E. M., Stommen P. L. A., Zwanenburg B.: *Plant Growth Regul.* **11**, 91 (1992).
22. Zwanenburg B., Mwakaboko A. S.: *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 7394 (2011).
23. Mangnus E. M., van Vliet L. A., Vandenput D. A. L., Zwanenburg B.: *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1222 (1992).
24. Malik H., Rutjes F. P. J. T., Zwanenburg B.: *Tetrahedron* **66**, 7198 (2010).
25. Kondo Y., Tadokoro E., Matsuura M., Iwasaki K., Sugimoto Y., Miyake H., Takikawa H., Sasaki M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2781 (2007).
26. Zwanenburg B., Nayak S. K., Charnikhova T. V., Bouwmeester H. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 5182 (2013).
27. Fukui K., Ito S., Ueno K., Yamaguchi S., Kyojuka J., Asami T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4905 (2011).
28. Reizelman A., Wigchert S. C. M., del-Bianco C., Zwanenburg B.: *Org. Biol. Chem.* **1**, 950 (2003).
29. Prandi C., Rooso H., Lace B., Occhiato E. G., Oppedisano A., Tabasso S., Alberto G., Blangetti M.: *Mol. Plant.* **6**, 113 (2013).
30. Rasmussen A., Heugebaert T., Matthys C., Van Deun R., Boyer F.-D., Goormachtig S., Stevens C., Geelen, D.: *Mol. Plant.* **6**, 99 (2013).
31. Mangnus E. M., Zwanenburg B.: *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1066 (1992).
32. Sugimoto Y., Wigchert S. C. M., Thuring J. W. J. F., Zwanenburg B.: *J. Org. Chem.* **63**, 1259 (1998).
33. Pouvreau J.-B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M.-M., Gauthier M., Delavault P., Simier P.: *Plant Methods* **9**, 1 (2013).
34. Scaffidi A., Waters M. T., Bond C. S., Dixon K. W., Smith S. M., Ghisalberti E. L., Flematti G. R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3743 (2012).

M. Dvořáková and T. Vaněk (*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Strigolactones – Their Structure and Function in Plants**

Strigolactones are the most recent class of phytohormones, which were originally recognized as stimulators of seed germinators of parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* spp. They also stimulate symbiosis of plants with arbuscular mycorrhizal fungi. Their functions in plants and biosynthesis are described. The isolated natural strigolactones and their main synthetic derivatives are listed. Attention is focused on their mechanism of action and structure-activity relationships.

BOLDINOVÉ ALKALOIDY A PERSPEKTIVY JEJICH VYUŽITÍ

ANNA HOŠTÁLKOVÁ^a, TOMÁŠ SIATKA^a,
JAKUB CHLEBEK^a, LUBOMÍR OPLETAL^a,
PAVEL DRAŠAR^b a LUCIE CAHLÍKOVÁ^a

^a Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, skupina ADINACO, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^b Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6
opletal@faf.cuni.cz

Klíčová slova: aporfinové alkaloidy, boldinový typ, biologická aktivita, perspektivy

Obsah

1. Úvod
2. Struktura boldinových alkaloidů a jejich izolace
3. Rozšíření v rostlinách
4. Biologická aktivita
 - 4.1. Antioxidační aktivita
 - 4.2. Antiinvazní aktivita
 - 4.3. Ovlivnění zánětlivých procesů a imunity
 - 4.4. Vliv na centrální nervový systém
 - 4.5. Interakce s adrenergními receptory
 - 4.6. Ovlivnění kardiovaskulárního systému
 - 4.7. Vliv na trávicí ústrojí a diabetes mellitus
 - 4.8. Zásah do metabolismu xenobiotik, chemoprotektivita, genotoxicita
5. Perspektivy praktického využití
6. Závěr

1. Úvod

Isochinolinové alkaloidy představují hned po alkaloidech indolových druhou největší skupinu těchto látek ve vyšších rostlinách. O jejich významu není pochyb: v ČR existuje tradice studia těchto sloučenin a je jim věnována pozornost i v poslední době např. separaci kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů z *Macleaya cordata* (sanguinarin a chelerythrin jsou součástí aditivních přísad do krmiva hospodářských zvířat)¹. Jsou také diskutovány z hlediska využití při terapii onkologických onemocnění (zejména alkaloidy jednoděložných rostlin)^{2,3}. Neméně důležitý je zájem o stanovení jejich obsahu v tak důležité surovině, jako je makovina⁴.

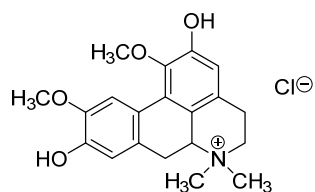
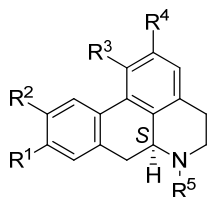
Tyto alkaloidy zahrnují několik strukturních typů;

jedním z nich jsou aporfinoidy, které jsou děleny do několika podtypů. Aporfinové baze jsou současně jednou z početných skupin látek v rámci isochinolinových alkaloidů, bylo jich izolováno více než 500. Tyto sloučeniny, vycházející ze základní struktury 6-methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4*H*-dibenzo[*de,g*]chinolinového skeletu, by se mohly zdát (až na výjimky) méně atraktivními než např. skupiny alkaloidů morfinanového, protoberberinového anebo bisbenzylisochinolinového typu. Je pravdou, že jim byla věnována pozornost spíše z čistě chemického hlediska, než z hlediska detailní biologické aktivity na rozdíl od alkaloidů např. morfinanových. V posledních 15 letech však začíná být i této skupině věnována pozornost v oblasti biologických účinků. Výpis účinků by překračoval rámec tohoto sdělení a bude mu proto věnována pozornost jinde, zajímavé je však uvést alespoň rámcově jejich aktivitu z hlediska vlivu na CNS. Disponují určitými dopaminergními⁵, noradrenergními^{6–9} a serotoninovými účinky¹⁰, resp. antagonizují adrenergní receptory a působí anti-serotoninově. Zdá se, že by se mohly uplatnit také u některých neurodegenerativních onemocnění, protože působí navíc antioxidačně a protizánětlivě. Při sledování jejich dopaminergního účinku se vyskytla úvaha o možném ovlivnění Parkinsonovy choroby. Z hlediska ovlivňování neurodegenerativních procesů při Alzheimerově chorobě lze pokládat za zajímavé ty studie, které hovoří o oxoisoaporfinových derivátech ovlivňujících acetylcholinesterasu a agregaci β -amyloidu. Tento typ látek byl také sledován z hlediska enzymového duálního účinku – inhibice acetylcholinesterasy/butyrylcholinesterasy¹¹. Je zřejmé, že se jedná o perspektivní skupinu látek, která může přinést mnohá poznání v oblasti biologických účinků využitelných při léčbě chorob.

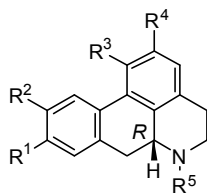
2. Struktura boldinových alkaloidů a jejich izolace

(+)-Boldin je významným aporfinovým alkaloidem, jehož reálná využitelnost je nesporná. Z jeho struktury vychází několik dalších blízkých sloučenin, kterým je v tomto přehledu věnována pozornost; výraz „boldin“ tvoří součást jejich názvu, případně je jejich strukturní podobnost zřejmá (tab. I).

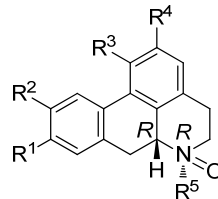
Ačkoliv za poslední půl století existuje řada metod pro izolaci látek tohoto typu, je nutné říci, že hlavní metodou je příprava primárního extraktu z vegetabilního materiálu ethanolem nebo methanolem, po odpaření rozpouštědla extrakce bází z odparku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (pH 2–3), odstranění balastních látek nejčastěji chloroformem (nebo dichlormethanem), alkalizace na pH ~ 10 roztokem Na₂CO₃ nebo koncentrovaným roztokem NH₄OH a vytřepání uvolněných bází uvedenými

*S*-(+)-boldin-methochlorid (2)

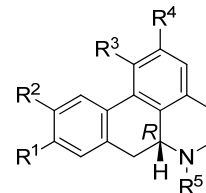
(1,4-8,11,12,15)



(3)



(9)



(10,14)

Tabulka I
Boldinové alkaloidy

	Název ^a	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	(<i>S</i>)-(+)-boldin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	CH ₃
3	(<i>S</i>)- <i>N</i> -acetyl-(+)-laurohitsin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	COOCH ₃
4	(<i>S</i>)-(+)- <i>N</i> -methyllaurotetanin [(<i>S</i>)-(+)-2- <i>O</i> -methylboldin]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
5	(+)-predicentrin [(<i>S</i>)-(+)-9- <i>O</i> -methylboldin]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	CH ₃
6	(<i>S</i>)-(+)-isoboldin	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
7	(±)-isoboldin	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
8	<i>O,O</i> -dimethyl-(<i>S</i>)-(+)-isoboldin	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
9	(<i>R,R</i>)-(+)-isoboldin-β- <i>N</i> -oxid	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
10	(<i>R</i>)-(-)-norboldin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
11	(+)-laurohitsin [(<i>S</i>)-(+)-norboldin]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
12	(<i>S</i>)-(+)-norboldin-acetát	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCOCH ₃	H
13	(<i>S</i>)-(+)- <i>N</i> -kyanomethylnorboldin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	CH ₂ CN
14	(<i>S</i>)-(+)-laurotetanin	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
15	(<i>S</i>)-(+)- <i>N</i> -norisoboldin	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

^a Dehydroisoboldin není v tomto přehledu uveden, protože jeho struktura je nekompletní a nedisponuje žádnými popisovými biologickými účinky

chlorovanými uhlovodíky. Na rozdíl od jiných typů isochinolinových alkaloidů se neosvědčilo pro vytřepání použití diethyletheru (ačkoliv jsou tak obecně získávány výtřepky s menším množstvím balastních látek a separace je následně snazší). Je to z důvodu nižší rozpustnosti těchto

aporfinů oproti chloroformu.

Dělení alkaloidních koncentrátů je prováděno nejčastěji na silikagelu; neutrální oxid hlinitý byl použit jen v omezeném počtu případů, ačkoliv je jinak běžným adsorbentem pro dělení alkaloidů. Existují také jiné metody

(např. chromatografie na Amberlite XAD-2, Sephadexu LH-20, nebo iontově-párová chromatografie), z celkového pohledu preparativní metodiky je však lze pokládat za spíše okrajové.

3. Rozšíření v rostlinách

Z hlediska výskytu jsou aporfinové alkaloidy rozšířeny v poměrně úzké skupině taxonomických jednotek, náležejících pouze do dvou podtříd. První jednotkou jsou zástupci podtřídy Magnoliidae, resp. řádu Annonales, čeledi Annonaceae (*Alphonsea*, *Annona*, *Anomianthus*, *Cardiopetalum*, *Desmos*, *Duguetia*, *Fissistigma*, *Guatteria*, *Mitrephora*, *Monodora*, *Orophea*, *Polyalthia*, *Trivalvaria*, *Xylopia*) a řádu Laurales, čeledi Atherospermataceae (*Dryadodaphne*, *Laurelia*, *Nemuaron*), Hernandiaceae (*Hernandia*, *Sparattanthelium*), Lauraceae (*Actinodaphne*, *Alseodaphne*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cryptocarya*, *Dehaasia*, *Lindera*, *Litsea*, *Machilus*, *Nectandra*, *Neolitsea*, *Ocotea*, *Persea*, *Phoebe*, *Sassafras*), Monimiaceae (*Hedycarya*, *Monimia*, *Palmeria*, *Peumus*) a Siparunaceae s rodem *Siparuna*; a řádu Magnoliales, čeledi Magnoliaceae (*Liriodendron*). V druhé jednotce, třídě Ranunculidae, jsou to řády: Berberidales s čeleděmi Berberidaceae (*Berberis*, *Nandina*) a Menispermaceae (*Cocculus*, *Stephania*), Papaverales, s čeleděmi Fumariaceae (*Corydalis*, *Fumaria*), Papaveraceae (*Eschscholzia*, *Glaucium*, *Papaver*, *Sarcocapnos*, *Stylophorum*) a Ranunculales zahrnující zde čeledi Helleboraceae (*Aconitum*, *Consolida*, *Delphinium*) a Ranunculaceae (*Thalictrum*). Zcela osamoceně byly tyto látky nalezeny v podtřídě Rosidae, resp. řádu Rhamnales, čeledi Rhamnaceae (*Phyllica*, *Retanilla*) a řádu Capparales, v čeledi Brassicaceae (*Diceratella*).

Je pochopitelné, že metabolická cesta (+)-boldinu – zde nejdůležitějšího alkaloidu – zahrnuje celou skupinu intermediátů, a proto se v rostlinách vyskytují boldinové alkaloidy prakticky vždy ve směsi obsahující další typy aporfinů.

Tyto alkaloidy byly nalezeny v následujících rodech^{12,13}:

(+)-boldin (1): *Actinodaphne*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cryptocarya*, *Dehaasia*, *Desmos*, *Hedycaria*, *Laurelia*, *Lindera*, *Litsea*, *Machilus*, *Nectandra*, *Neolitsea*, *Ocotea*, *Peumus*, *Phoebe*, *Retanilla*, *Siparuna*,

(+)-boldin-methochlorid (2): *Cocculus*,

N-acetylaurolitsin (3): *Litsea*,

(+)-2-O-methylboldin (4) (syn. (+)-N-methylaurolitanin): *Annona*, *Cassytha*, *Corydalis*, *Cryptocarya*, *Desmos*, *Diceratella*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Hernandia*, *Lindera*, *Liriodendron*, *Litsea*, *Monimia*, *Nemuaron*, *Neolitsea*, *Palmeria*, *Phyllica*, *Sarcocapnos*, *Siparuna*, *Thalictrum*, *Stephania*,

(+)-9-O-methylboldin (5) (syn. (+)-predicentrin): *Annona*, *Desmos*, *Glaucium*,

(+)-isoboldin (6): *Aconitum*, *Annona*, *Anomianthus*, *Berberis*, *Cardiopetalum*, *Cocculus*, *Consolida*, *Corydalis*, *Cryptocarya*, *Delphinium*, *Desmos*, *Guatteria*, *Laurelia*, *Litsea*, *Macrantha*, *Machilus*, *Monodora*, *Nectandra*, *Neolitsea*, *Orophea*, *Papaver*, *Persea*, *Polyalthia*, *Sarcocapnos*, *Sassafras*, *Stephania*, *Thalictrum*, *Xylopia*,

(±)-isoboldin (7): *Cocculus*, *Glaucium*,

O,O-dimethyl-(+)-isoboldin (8) (syn. (+)-glaucin): *Berberis*, *Corydalis*, *Sarcocapnos*, *Thalictrum*, *Xylopia*,

(+)-isoboldin-β-N-oxid (9): *Cryptocarya*, *Litsea*,

(-)-norboldin (10): *Dehaasia*, *Lindera*, *Phoebe*,

(+)-laurolicsin (11) (syn. (+)-norboldin): *Actinodaphne*, *Alseodaphne*, *Beilschmiedia*, *Cryptocarya*, *Dehaasia*, *Lindera*, *Litsea*, *Machilus*, *Nectandra*, *Neolitsea*, *Phoebe*, *Sassafras*, *Siparuna*, *Trivalvaria*,

(+)-norboldin-acetát (12): *Lindera*,

(+)-N-kyanomethylnorboldin (13): *Alseodaphne*,

(+)-laurotetanin (14): *Actinodaphne*, *Alphonsea*, *Annona*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Corydalis*, *Cryptocarya*, *Dehaasia*, *Dryadodaphne*, *Eschscholzia*, *Guatteria*, *Hedycarya*, *Hernandia*, *Laurelia*, *Lindera*, *Litsea*, *Machilus*, *Monimia*, *Nectandra*, *Nemuaron*, *Neolitsea*, *Palmeria*, *Peumus*, *Phoebe*, *Siparuna*, *Sparattanthelium*, *Xylopia*,

(+)-N-norisoboldin (15): *Annona*, *Cocculus*, *Litsea*.

4. Biologická aktivita

Ačkoliv čítá okruh základních boldinových alkaloidů 15 sloučenin, je z literatury patrné, že největší pozornost z hlediska biologického studia i praktické použitelnosti je věnována (+)-boldinu. Obecně vzato, je u perspektivních látek nutné vzít v úvahu možnost jejich reálného získání z rostlinného materiálu a v tomto ohledu se nabízí využití ideální suroviny – „Boldo“, tj. listů boldovníku vonného (*Folium boldo*; *Peumus boldus* Mol., Monimiaceae). Listy tohoto neopadavého stromu z Chile a Peru jsou dostupné v libovolném množství a mohou tak tvořit základ využitelné suroviny. Obsahují ~ 0,4–0,5 % alkaloidů (z toho tvoří (+)-boldin ~ 0,1 %); alkaloidní frakce je tvořena kromě (+)-boldinu (+)-laurolicsinem, (+)-laurotetaninem, (+)-2-O-methylboldinem, (+)-norisokorydinem a (+)-isokorydinem; velmi diskutabilní je přítomnost chinolizidinového (–)-sparteinu¹². Kromě alkaloidů hraje významnou roli v účinku sumárního extraktu obsah silice (min. 2 %) představovaná směsí *p*-cymolu (~ 30 %), cineolu (~ 30 %) a askaridolu (~ 40 %) a malým množstvím eugenolu, α-pinenu a terpineolu. V listech jsou přítomny také glykosidy isorhamnetinu a kempferolu¹². Biologický účinek listů boldo je cholagogní, což je způsobeno přítomností silice a (+)-boldinu, a antioxidační (působí také jako scavenger volných radikálů). (+)-Boldin je alkaloidem známým více než 80 let; popis jeho struktury byl proveden v roce 1925 (cit.¹⁴) a 1933 (cit.¹⁵). O biosyntéze bylo referováno zhruba před 40 roky¹⁶ a krystalografické analýze byl podroben kolem roku 1996 (cit.¹⁷). Spolu s ostatními výše jmenovanými alkaloidy blízké struktury vytváří zajímavou skupinu látek s perspektivou praktického využití,

zahrneme-li do ní i určité polosyntetické deriváty.

V rámci rozboru biologických účinků boldinových alkaloidů má smysl opírat se pouze o údaje získané ze studií, v nichž byly použity čisté látky. Studie s definovanými sumárními alkaloidními frakcemi pro tento účel význam nemají, a proto zde nebyly až na výjimky uvedeny, ačkoliv po porovnání s účinky čistých látek, podporují často jejich biologickou aktivitu.

Za zajímavé lze pokládat výsledky, dosažené s analogy některých boldinových alkaloidů. Zdá se, že tyto „lead structures“ jsou vhodným startovním materiálem pro získání sloučenin s potenciální biologickou aktivitou určující je k dalšímu studiu.

4.1. Antioxidační aktivita

Pozornost z hlediska tohoto efektu byla věnována především (+)-boldinu. (+)-Boldin je bifenolický aporfin, přičemž obě fenolické skupiny jsou chráněny methoxyskupinou v *ortho* poloze, což je výhodná strukturální vlastnost, často spojovaná s antioxidační aktivitou¹⁸. Antiradikálová aktivita látky byla prokázána v DPPH testu. Významné je zjištění jeho schopnosti bránit peroxidaci lipidů a poškození proteinů či vykonávat scavengerovou aktivitu. Na hipokampálních řezech za pomoci TRAP metody se ukázalo, že je ~ 3× účinnější než 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, ve vodě rozpustný derivát vitamínu E (Trolox®), který funguje jako scavenger peroxylového radikálu. Kromě toho působí alkaloid proti zvýšení hladin peroxidovaných lipidů v průběhu ischemie, ale jeho vysoké hladiny mohou naopak potencovat ischemický proces¹⁹. Při analýze jeho účinku jako funkce inkubační doby se ukázalo, že metabolity, vycházející z interakce látky s volnými radikály vykazují rovněž antioxidační aktivitu, a to s vyšší účinností než v případě účinku (+)-boldinu v homogenátu mozkové tkáně ponechané autooxidaci. (+)-Boldin působí preventivně v kultuře lidských jaterních buněk proti mikrosomální peroxidaci lipidů, není však schopen zabránit inaktivaci a destrukci CYP2E1 vyvolanou CCl₄, nicméně lze jej pokládat za účinný antioxidant a hepatoprotektivní agens²⁰. Inhibuje mikrosomální peroxidaci lipidů v játrech potkana; výsledky pokusů naznačují, že by mohl být použit jako klinicky využitelný antioxidant²¹. Při srovnávání antioxidační aktivity některých isochinolových alkaloidů (také (+)-boldinu a (+)-glaucinu) se ukázalo, že (+)-boldin účinkuje v průběhu procesu peroxidace lipidů jako antioxidant rozvolňující řetězce²². Inhibici neenzymové peroxidace lipidů vykazují kromě (+)-boldinu a (+)-glaucinu také (+)-isoboldin, přičemž aktivita (+)-glaucinu je spojována se schopností se snadno oxidovat na dehydroaporfin nebo oxoaporfin¹⁸.

Inaktivace lysozymu indukovaná volnými radikály (navozená AAPH), která je spojena s tvorbou karbonylových residuí, reaguje rozdílně na dva dále uvedené antioxidanty. (+)-Boldin a Trolox® plně chrání proteiny před časnou inaktivací, ale zvýšení obsahu karbonylových reaktivních residuí není Troloxem® ovlivněno²³. (+)-Glaucin

a (+)-boldin mají scavengerovou aktivitu vůči hydroxylovému radikálu a jsou také aktivní v Fe³⁺ redukčním testu (Fe³⁺ + EDTA + H₂O₂). Oba alkaloidy brání autooxidaci na modelu mozkového homogenátu. (+)-Glaucin jako nefenolový alkaloid inhibuje inaktivaci lysozymu navozenou AAPH; kvarternizaci dusíku (*N*-methyloací) se ochranný antioxidační efekt snižuje 2–3× (cit.¹⁸).

Je známo, že oxidační stres hraje významnou roli v patogenezi a progresi postižení pankreatické tkáně a urychluje vývoj diabetu. (+)-Boldin může také zpomalit vývoj STZ diabetu u potkana a zpomalit tak patogenezi tohoto onemocnění²⁴. (+)-Boldin vykazuje také ochranný účinek na erytrocyty vůči hemolytickému poškození indukovanému AAPH (cit.²⁵).

O (+)-boldinu se rovněž uvažuje jako o látce využitelné v potravinářství: studie s jeho využitím pro ochranu sójového oleje a zábraně vzniku cholesterolových oxidačních produktů však nepřinesly prakticky využitelný výsledek. Při srovnání aktivity některých antioxidantů na stabilitu rybího oleje se však ukázalo, že vliv alkaloidu je v tomto případě srovnatelný s antioxidačním účinkem kvercetin a jeho efekt je vyšší než v případě DL- α -tokoferolu a některých syntetických antioxidantů²⁶. Antioxidační aktivita extraktů z listů boldovníku je z hlediska její praktické využitelnosti (využití v potravinářském sektoru) velmi zajímavá. Je však jisté, že je způsobena nejen (+)-boldinem, ale také katechinem; obě dvě sloučeniny jsou doporučeny jako markery pro posuzování kvality rostlinné suroviny z hlediska přípravy extraktů s antioxidační aktivitou²⁷. (+)-Boldin, který je v současnosti pokládán za účinný a reálně využitelný alkaloid, inhibuje nejen oxidaci LDL *in vitro*, ale u experimentálních zvířat brzdí také nástup aterosklerózy *in vivo*; existuje názor, že může představovat atraktivní alternativu k vitamínu E (cit.²⁸).

4.2. Antiinvazní aktivita

Tímto pojmem je označován účinek všech látek, které brání diseminaci živých organizovaných (buněčných nebo orgánových) struktur do lidského nebo zvířecího organismu. Jedná se především o viry, bakterie, prvoky, červy a metastázy zhoubných nádorů.

Výskyt studií o antivirovém účinku aporfinových alkaloidů není v literatuře nijak četný. Některé alkaloidy ze skupiny (+)-boldinu byly sledovány spolu s dalšími aporfiny *in vitro* na lidský *Poliovirus*. Jako aktivní se ukázaly (+)-glaucin, (+)-*N*-methylaurotetanin, (+)-isoboldin. Substituenty v poloze C-1 a C-2 na isochinolinovém skeletu hrají významnou roli z hlediska aktivity vůči viru; SAR studie ukázala důležitost jak methoxyskupiny na C-2 z hlediska zvýšení aktivity, tak i vliv methylenedioxysestupu (snížení aktivity)²⁹.

Při studiu vlivu na HSV-1 virus se studované alkaloidy [(+)-boldin, (+)-isoboldin, (+)-*N*-methylaurotetanin] neukázaly jako výrazně účinné; v diskusi této práce byly předloženy názory, týkající se vztahu struktury a účinku aporfinů³⁰. Tyto výsledky však lze pokládat

za fragmentární, protože byla sledována série nepříliš široké skupiny aporfinových alkaloidů.

(+)-Glaucin byl použit pro přípravu skupiny cinnamoyl- a hydroxycinnamoylderivátů, u nichž byla zjišťována antivirová aktivita. Látky mají vyšší scavengerovou aktivitu než výchozí sloučenina, ale nižší antioxidační efekt než samotné hydroxyskořicové kyseliny. Některé z nově syntetizovaných sloučenin vykázaly antivirovou aktivitu, zejména proti replikaci HRV-14 (cit.³¹).

Antimikrobiální aktivitu (vůči *Staphylococcus aureus*) vykazují některé deriváty (+)-laurolicinu, resp. *N*-acetyl-(+)-laurolicin; při srovnání s rifampicinem však není významná. (+)-Isoboldin-*N*- β -oxid byl vůči uvedenému bakterií zcela neaktivní³².

Isochinolinové alkaloidy izolované z rodů *Fumaria* a *Corydalis* (33 látek, z boldinového typu zastoupen pouze (+)-isoboldin), nevykázala významný antimikrobiální efekt (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), ale byly účinné antifungálně (*Candida albicans*)³³.

(+)-Boldin byl podroben zajímavé spektroskopické studii z hlediska interakcí s promastigoty *Leishmania mexicana* za účelem zjištění mechanismu možného biologického účinku. Poprvé tak byly popsány fluorescenční vlastnosti alkaloidu na promastigoty uvedeného parazita³⁴, které mohou být využity v dalším studiu.

(+)-Glaucin, (+)-predicentrin a (+)-boldin byly sledovány na účinek vůči růstu epimastigotům Tulahuen, LQ kmenům a DM 28c klonu *Trypanosoma cruzii*. IC₅₀ v případě kmenu Tulahuen byly: 29 μ M [(+)-glaucin], 90 μ M [(+)-predicentrin] a 85 μ M [(+)-boldin]. Zdá se, že trypanocidní aktivita těchto alkaloidů koreluje s jejich aktivitou antioxidační³⁵.

Byl také sledován účinek (+)-norisoboldinu a (+)-isoboldinu na promastigoty některých kmenů rodu *Leishmania* (*L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* PH-8, *L. donovani* HS-70); IC₁₀₀ byla $\geq 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (referenční pentamidin 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)³⁶.

(+)-Laurolicin má vysokou inhibiční aktivitu na růst *Plasmodium falciparum* 3D7 klonu³⁷.

Cytotoxická aktivita je jednou z významných oblastí, které je věnována při studiu isochinolinových alkaloidů pozornost. (+)-Boldin a (+)-glaucin inhibují TPA indukovanou downregulaci gap junction funkce (v závislosti na jejich struktuře); látky se mohou uplatnit jako antitumorová agens pro další biologické studium v rámci mezibuněčné komunikace³⁸. Z těchto důvodů byly podrobeny dalšímu studiu. Velmi zajímavá přehledová studie byla publikována v r. 2005: zahrnuje řadu pohledů na aporfinové alkaloidy, především biosyntézu, strukturu a antikancerogenní vlastnosti. Představuje zajímavý přínos oxo-, pro- a dehydroaporfinů z hlediska jejich potenciální antitumorové aktivity. Z boldinových alkaloidů je zde pozornost věnována především (+)-glaucinu (inhibice Epstein-Baarové viru, růstu HeLa buněk). Tento účinek je vázán především na enzymy, ovlivňující DNA (polymerasy, topoisomerasy). Ve skupině zhruba 50 *N*-oxidů isochinoli-

nových alkaloidů připravených polosynteticky byla sledována cytotoxicita na liniích neoplastických buněk A549, HCT-8, KB, P-388 a L-1210. Mezi těmito látkami byly také *N*-oxid (+)-boldinu a (+)-glaucinu. Biologická aktivita obou derivátů uvedených alkaloidů však nebyla významná³⁹.

Zdá se, že i v této oblasti je neaktivnější látkou opět (+)-boldin. Je silně a specificky cytotoxicky aktivní na karcinom lidského hrtanu (HEp-2)⁴⁰. Ukázal se jako nová, potenciálně antiproliferativní látka vůči buněčným liniím gliomu (U138-MG buňky); vůči normálním buňkám je netoxický a je nesporně kandidátem pro další studium⁴¹. Kromě (+)-boldinu vykázaly antitumorovou aktivitu vůči buněčným liniím sarkomu 180 a Ehrlichově karcinomu (+)-laurolicin, (+)-laurotetanin a (+)-isoboldin⁴², první zmíněný i vůči Hep-2 liniím⁴³. (+)-Laurotetanin také vykazoval určitou antitumorovou resp. antimetastázovou aktivitu⁴⁴. (+)-Laurotetanin, (+)-*N*-methylaurotetanin a (+)-glaucin jsou cytotoxicky aktivní vůči buněčným liniím A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 a HCT15, přičemž byla v této studii sledována větší cytotoxická aktivita aporfinového typu isochinolinových alkaloidů než u typu tetrahydroprotoberberinového⁴⁵. Tato skutečnost je zajímavá i s ohledem na vysokou aktivitu berberinu, isochinolinového alkaloidu protoberberinového typu, který má protinádorový účinek *in vitro* – inhibuje aktivační protein 1, klíčový transkripční faktor karcinogeneze v nádorových buňkách, a DNA topoizomerasu II (cit.⁴⁶).

(+)-Boldin se stal také základní strukturou pro přípravu některých polosyntetických derivátů; některé fosforyl-deriváty vykázaly vysokou toxicitu na buněčné linie MCF-7 a MDA-MD-231 (linie karcinomu prsu)⁴⁷.

4.3. Ovlivnění zánětlivých procesů a imunity

Imunita, zánět a alergie jsou tři vzájemně se prolínající fenomény, které lze od sebe jen velmi obtížně oddělit. I v těchto případech hraje významnou roli (+)-boldin. Makrofágy jsou buňky odpovědné za vývoj imunitní odpovědi; uvolňují více než 100 sloučenin do extracelulárního prostředí, resp. organismu (cytokiny, produkty vznikající v důsledku působení NO a H₂O₂). Tyto látky koordinují postup biochemických reakcí označovaných jako oxidační vzplanutí (oxidative burst). (+)-Boldin patří mezi přírodní látky, které mají v tomto směru schopnost silné imunologické modulace v ochraně organismu⁴⁸. Jeho protizánětlivý a antipyretický účinek, jehož intenzita je závislá na dávce, byl prokázán v karrageenanovém testu na morčeti⁴⁹. Snižuje v závislosti na dávce blastogenezi u normálních lidských subjektů a u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, u pacientů s nádory prsu dochází ke snížení blastogeneze jen ve vysoké koncentraci. Aktivita NK není ovlivňována u zdravé kontroly, ale je-li tato aktivita snižována, dochází k jejímu zvýšení (např. u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií)⁵⁰. (+)-Boldin je rovněž účinný u experimentální kolitidy pro svůj cytoprotektivní a protizánětlivý účinek⁵¹. Zasahuje do metabolismu angiotenzinu II, který disponuje prozánětlivou aktivi-

tou, dále tento enzym může vyvolávat různá onemocnění ve spojitosti s kardiovaskulárním systémem. Zdá se, že má určitou terapeutickou hodnotu v ovlivnění neutrofilů, které hrají významnou roli v zánětu spojeném se zvýšenou hladinou angiotenzinu II (cit.⁵²). Při studiu scavengerové aktivity alkaloidů z kořenů *Lindera angustifolia* se ukázalo, že (+)-boldin a (+)-lauroilsin vykazují zároveň antinociceptivní aktivitu využitelnou u zánětlivých procesů k mírnění bolesti⁵³. Polosyntetické deriváty (+)-boldinu mají schopnost inhibovat tvorbu ROS a jsou vhodné pro další výzkum především zánětlivých onemocnění, u nichž tvorba ROS hraje významnou roli.

(+)-Glaucin a (+)-isoboldin patří mezi látky, které mohou inhibovat proliferaci T- a B-lymfocytů a mohou být použity pro další studium v rámci tkáňových poškození nebo infekcí, vycházejících z autoimunitních onemocnění⁵⁴. V případě (+)-isoboldinu však existuje údaj o tom, že brzdí fagocytózu myšího peritoneálního makrofágu⁵⁵.

Zajímavé účinky má také (+)-norisoboldin: protizánětlivé, analgetické a antimikrobiální. Zdá se, že by mohl být potenciálním léčivem pro revmatoidní artritidu a regulovat abnormální imunitní odpověď⁵⁶. Inhibuje aktivaci makrofágu a následně tvorbu prozánětlivých cytokinů cestou snížení aktivace MAPKs signální cesty snáze než NF- κ B (cit.⁵⁷). (+)-Norisoboldin je součástí patentového spisu, který navrhuje jeho využití pro léčbu autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, roztroušená mozkomíšní skleróza, systémový lupus erythematosus, ulcerózní kolitida ad.)⁵⁸.

4.4. Vliv na centrální nervový systém

(+)-Boldin ovlivňuje aktivitu 5-HT_{2A} receptorů prostřednictvím kompetitivní vazby podle podmínek buď jako agonista, nebo antagonisty¹⁰. Nevykazuje účinnou centrální dopaminergní antagonistickou aktivitu *in vivo* navzdory své vazebné aktivitě na D₁ a D₂ receptory, zatímco (+)-glaucin, ačkoliv je méně efektivní *in vitro*, vykazuje dopaminergní aktivitu *in vivo*⁵. Při studiu jeho vlivu na cholinergní synapse CNS hmyzu se ukázalo, že látka interaguje s nikotinovými cholinergními receptory jako antagonisty, aniž by vykazovala efekt na muskarinové a GABAergní receptory. Může tedy fungovat jako specifický nikotinový antagonisty v mozku hmyzu¹¹. (+)-Boldin, sekoboldin, (+)-isoboldin a (+)-laurotetanin inhibují lidskou acetylcholinesterasu, čímž rovněž stimulují cholinergní systém⁵⁹. Podle údajů z nedávné doby však ovlivnění lidských cholinesteras (erytrocytární a sérové) (+)-boldinem a (+)-laurotetaninem nebylo tak vysoce významné⁶⁰; studie však nejsou jednoznačně uzavřeny.

(+)-Boldin byl také studován z hlediska protektivního účinku na dopaminem indukovanou permeabilitu membrán v mitochondriích mozkových buněk. Může zmírnit dysfunkci mitochondrií mozkových buněk podmíněnou katecholaminy a snížit případy dopaminem indukované smrti experimentálních buněk svojí scavengerovou aktivitou, inhibicí tvorby melaninu a zábranou oxidace thiolů⁶¹. V případě studia kvarterních dusíkatých bazí byly kromě

methojodidu (+)-boldinu sledovány účinky těchto derivátů na neuronální nikotinové acetylcholinové receptory (rekombinantní lidské α_7 a $\alpha_4\beta_2$) u (+)-glaucinu a (+)-predicentrinu. Účinek klesal v pořadí: (+)-predicentrin, (+)-boldin, (+)-glaucin⁶².

Zajímavé mohou být některé polosyntetické deriváty (+)-boldinu: některé halogenované deriváty (chlor, brom, jod) vykazují zvýšenou selektivitu vůči monoaminovým receptorům; studie vazby radioligandů těchto látek ukázaly, že deriváty halogenované v poloze C-3 mají zvýšenou afinitu vůči D₁ receptorům oproti receptorům D₂. Hodnoty IC₅₀ se pohybují v některých případech v nanomolárních koncentracích (např. u 3-iodoboldinu)⁶³. Halogenované deriváty byly také připraveny od (+)-predicentrinu a (+)-glaucinu a sledován u nich vztah struktury a afinity vůči D₁ a D₂ receptorům. Podobně jako v předcházející studii s (+)-boldinem ukazují získané výsledky, že hydroxyskupina na C-2 aporfinového skeletu může ovlivnit způsob vazby na receptory – upřednostnit vazbu na D₁ před vazbou na D₂ receptory se zvýšenou afinitou, je-li poloha C-3 halogenována⁶⁴.

4.5. Interakce s adrenergními receptory

U (+)-boldinu byla nalezena schopnost blokovat vápníkové kanály na α_1 -adrenoreceptorech⁶. Vykazuje zajímavé vlastnosti z hlediska blokády α_1 -adrenoreceptorů v hladké svalovině cév a působí v tomto ohledu jako kompetitivní antagonisty⁷.

(+)-Boldin a (+)-glaucin vystupují jako parciální agonisté, případně antagonisté s určitými neuroleptickými, antikonvulzivními a antinociceptivními účinky v důsledku interakce s adrenergními receptory⁸. Každá z látek má mechanismus účinku na těchto receptorech odlišný než některé jiné aporfiny: nevykazují přímý vliv na α -adrenoreceptory (vas deferens); (+)-glaucin a (+)-isoboldin mají inhibiční efekt na aktivitu adenylátcyklasy v CNS (cit.⁹).

U halogenovaných derivátů (+)-boldinu (substituce v poloze C-3) byla zjištěna významná specifická aktivita vůči α_{1A} -adrenoreceptorům a snížená afinita pro benzodiazepinové vazebné místo ve vápníkovém kanálu⁶⁵.

Účinek (+)-isoboldinu na potkaní dělohu (zvířata nebyla březí) je výrazně antagonizován propranololem, ale inhibice neproběhla po podání mouspinamidu, což naznačuje, že látka působí relaxací svalstva mechanismy závislými i nezávislými na β -adrenergních receptorech⁶⁶.

4.6. Ovlivnění kardiovaskulárního systému

V případě (+)-boldinu, který byl sledován z hlediska účinku na α_1 - a α_2 -adrenoreceptory bylo zjištěno, že má zhruba 50× slabší aktivitu než diltiazem (blokátor vápníkového kanálu používaný u hypertenze, angina pectoris a některých typů arytmií)⁶⁷. V této souvislosti je nutné zmínit se o vasorelaxační a antitrombocytární aktivitě této látky. (+)-Boldin a (+)-lauroilsin inhibují tvorbu TXA₂

a navozují tak určitý antitrombocytární účinek⁶⁸. Kromě (+)-boldinu vykazovaly silnou inhibiční aktivitu agregace destiček vyvolanou kyselinou arachidonovou i *N*-acetyl-(+)-laurolitsin a (+)-*N*-methyllaurotetanin; (+)-*N*-methyllaurotetanin rovněž agregaci vyvolanou kolagenem. (+)-Laurotetanin a (+)-boldin mají vasorelaxační účinky na krysí aortu⁶⁹, přičemž u (+)-laurotetaninu jsou také zprostředkovány blokádou vápníkového kanálu (jak napětově řízenou, tak prostřednictvím receptorů)⁷⁰. (+)-Laurotetanin také snižuje krevní tlak u normálních krys a vykazuje velmi nízkou toxicitu⁷¹.

(+)-Boldin je schopen modulovat expresi adinopektinu a jeho regulátorů v 3T3-L1 buňkách a má potenciální, velmi příznivý účinek v případě kardiovaskulárních onemocnění spojených s obezitou⁶⁸.

Z polosyntetických derivátů má význam *N*-allylsekoboldin, který disponuje antiarytmickými účinky⁷². Tato sloučenina má také účinky vasorelaxační⁷³ a derivát (+)-laurotetaninu připravený *N*-alkylací (*R* = Bu) vykazoval antiarytmické vlastnosti⁷⁴.

4.7. Vliv na trávicí ústrojí a diabetes mellitus

Alkaloidům z *Peumus boldus* byla věnována pozornost z hlediska jejich účinku na procesy v GIT více než 50 let; je u nich popisována řada farmakologických účinků, které zde už byly jmenovány. Významnou složkou různých typů extraktů je především (+)-boldin. Kromě jiných účinků zvyšuje sekreci žluči⁷⁵, má hepatoprotektivní účinek⁷⁶, chrání žaludeční mukózu před jejím poškozením (podobně jako (+)-laurolitsin); obě látky mají určitý prokinetický účinek⁷⁷. (+)-Boldin, (+)-glaucin, (+)-*N*-methyllaurotetanin, (+)-predicentrin a některé jejich polosyntetické deriváty mají schopnost snižovat glykémii u diabetických potkanů (STZ)⁷⁸. Velmi příznivě hypoglykemicky působí také některé deriváty (+)-boldinu a sekoboldinu⁷⁹.

4.8. Zásah do metabolismu xenobiotik, chemoprotektivita, genotoxicita

Znalost všech těchto tří uvedených faktorů, uplatňujících se při podávání určité látky v širším rozsahu, resp. ve formě doplňků stravy, je velmi důležitá. Ačkoliv se při využívání těchto látek nahlíží k historické zkušenosti (a listy „boldo-de-Chile“ jsou bez problému podávány v Evropě prakticky celé století), je nutné těmto faktorům věnovat velkou pozornost.

(+)-Boldin přítomný ve vodném extraktu z listů boldovníku výrazně snižuje peroxidaci lipidů indukovanou cisplatinou v hepatocytech myši. Zdá se, že může být v tomto ohledu použit jako chemoprotektivní látka při chemoterapii zhoubných nádorů⁸⁰. Má také chemoprotektivní efekt vůči působení chloridu cínatého; může s ním reagovat a působit preventivně proti vzniku ROS a následné toxicitě⁸¹. Nabízí se úvaha, že alkaloid může podobně reagovat s jinými bivalentními kationty a ovlivňovat tak jejich toxicitu. Byla u něho prokázána nejen antioxidační,

ale také cytoprotektivní aktivita v kultuře izolovaných hepatocytů⁸².

Při studiích (+)-boldinu *in vitro* z hlediska interakcí mikrosomálního cytochromu P 450 nebyl zjištěn žádný vliv látky na dealkylační reakce⁸³. Vykázal inhibiční aktivitu na jaterní mikrosomální CYP1A-dependentní 7-ethoxyresorufin *O*-deethylasu a CYP3A-dependentní testosteron 6 β -hydroxylasu a stimuloval aktivitu glutathion *S*-transferasy v buňkách Hepa-1. Je zřejmé, že snižuje metabolickou aktivaci také některých chemických mutagenů⁸⁴.

Při sledování genotoxického, mutagenního a rekombinogenního účinku (+)-boldinu na některé prokaryotní a eukaryotní organismy (*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA102, *Saccharomyces cerevisiae*) byly zjištěny jen velmi nepatrné cytoplazmatické mutace v haploidních buňkách kvasinky⁸⁵. V SOS-Chromotestu nebyla genotoxicita (+)-boldinu prokázána⁸⁶. Při sledování genotoxického potenciálu (+)-boldinu na savčí buňky *in vitro* i *in vivo* nebyl prokázán žádný klastogenní efekt (lidské periferní krevní lymfocyty, sledování SCEs) a zdá se, že tato látka je zcela bezpečná⁸⁷.

5. Perspektivy praktického využití

Je nepochybné, že (+)-boldin, resp. boldinové alkaloidy přítomné ve směsi v sumárních extraktech z listů boldovníku jsou vhodné pro použití jako netoxické látky při onemocnění GIT. Ukáže-li se však perspektivnost čistého (+)-boldinu, a to nejen jako látky samé, ale především některých jeho derivátů, pak se může stát sloučeninou komerčně zajímavou. Jeho základ účinku tvoří nesporně široká scavengerová a antioxidační aktivita, na níž se rozvíjí další účinky.

Z farmaceutického hlediska byly u řady aporfinových alkaloidů boldinové skupiny připraveny polosyntetické deriváty, které se mohou uplatnit jako inhibitory metalloproteinasy [(+)-boldin, (+)-glaucin]⁸⁸, jako látky při léčbě mozkových ischemických onemocnění (apoplexie, trombóza, embolií, hypoxické encefalopatie), ischemií srdečních, ischemické enteropatie a chorob souvisejících s metabolickým syndromem, především cévních onemocnění v důsledku diabetes mellitus [(+)-boldin, (+)-isoboldin, (+)-laurolitsin, (+)-*N*-methyllaurotetanin]⁸⁹. Některé deriváty (+)-boldinu a (+)-glaucinu působí proti vývoji chorob, jejichž iniciátorem je oxidační stres a mají antihiperglykemický účinek⁹⁰. Spektrum použití v důsledku antioxidační aktivity těchto látek je však podstatně širší: nezahrnuje jen onemocnění kardiovaskulárního systému, diabetes mellitus, ale může se uplatnit také při poruchách apoptózy (zrychlené stárnutí) a Alzheimerově chorobě⁹¹.

Z hlediska využití v nefarmaceutické oblasti však existují dva překvapující fakty: (+)-boldin a jeho deriváty (o dalších boldinových alkaloidech nejsou zmínky) nejsou součástí žádného dosud vyráběného doplňku stravy, který by v nich disponoval nejen antioxidačními účinky, ale řadou dalších protektivních efektů, ačkoliv vykazují vyu-

žitelnou aktivitu a jsou prakticky netoxické. Druhým faktem je skutečnost, že (+)-boldin bude mít patrně velkou naději pro externí dermatologické využití s různým profilem účinku. Má protektivní účinek na kultury enterobakterií exponované UV zářením⁹² a při studiích na lidské pokožce bylo zjištěno, že optimálním polosyntetickým derivátem je (+)-diacetylboldin. Tento LUMISKIN ovlivňuje aktivitu tyrosinasy dvěma klíčovými faktory: influxem vápníkových iontů a stabilizací aktivní formy tyrosinasy⁹³. (+)-Diacetylboldin je spolu s dalšími látkami (extrakty) z *Aspalathus linearis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Equisetum arvense* a produktů ze žraloka součástí přípravku vhodného při odstraňování dermatologických symptomů spojených se stářím (alopecie, keratózy, fotopoškození, psoriáza a různé typy ekzémů)⁹⁴.

V případě nativních alkaloidů, resp. sumárního extraktu z listů boldovníku, bylo prokázáno, že (+)-boldin působí preventivně proti destrukci buněk, která byla navozena UV zářením a NO mediovaným poškozením DNA a snižuje expresi Hsp70 proteinu v buněčné linii melanomu⁹⁵. Je také údajně schopen působit při odstraňování celulitidy, pro odstranění nežádoucího tuku pod pokožkou (slimming) a k tonizaci pokožky⁹⁶.

6. Závěr

(+)-Boldin je jednoznačně nejvýznamnějším alkaloidem boldinové skupiny alkaloidů. Studie provedené od 90. let minulého století prokázaly, že je jedním z nejsilnějších přírodních antioxidantů; jeho účinky se významně projevují v oblasti ochrany buněk, má rovněž určité antitumorové, protizánětlivé, antidiabetické a antiaterogenní účinky. Může se také uplatnit jako vasorelaxační a trypanocidní agens, imuno- a neuromodulátor a v neposlední řadě jako látka s cholagogní aktivitou. Pole výzkumu zůstává v tomto případě otevřené v oblasti některých jeho polosyntetických derivátů.

Seznam zkratk

AAPH	2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamid-dihydrochlorid
CNS	centrální nervový systém
DPPH	1,1'-difeny-2-pikrylhydrazyl radikál
EDTA	ethyldiaminotetraoctová kyselina
Gap junction	představuje mezibuněčné spoje, umožňující přímou komunikaci cytosolem sousedních buněk
GIT	trávicí ústrojí
HRV-14	kmen rodu <i>Rhinovirus</i>
HSV-1	Herpes simplex virus typ 1
5-HT _{2A}	5-hydroxytryptaminové 2A receptory
MAPKs	mitogen-activates protein kinases
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NO	oxid dusnatý
ROS	reactive oxygen species

SAR	structure activity relationship
scavenger	zametač
SCEs	sister-chromatid exchanges
STZ	streptozotocin
TXA ₂	tromboxan A ₂
TPA	12- <i>O</i> -tetradekanoylforbol-12-acetát
TRAP	total antioxidant potential

Práce vznikla za podpory grantu Univerzity Karlovy č. 17/2012/UNCE, SVV 260 184 a Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. TEAB, registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

LITERATURA

- Vičar J., Soural M., Hlaváč J.: Chem. Listy 104, 51 (2010).
- Cibíková P., Šturdíková M., Maruna M.: Chem. Listy 104, 12 (2010).
- Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Chem. Listy 107, 701 (2013).
- Laryšová N., Endlová L., Vrbovský V., Navrátilová Z.: Chem. Listy 109, 229 (2015).
- Asencio M., Delaquerriere B., Cassels B. K., Speisky H., Comoy E., Protais P.: Pharmacol. Biochem. Behav. 62, 7 (1998).
- Ivorra M. D., Chulia S., Lugnier C., D'Ocon M. P.: Eur. J. Pharmacol. 231, 165 (1993).
- Chulia S., Moreau J., Naline E., Noguera M. A., Ivorra M. D., D'Ocon J. P., Advenier C.: Brit. J. Pharmacol. 119, 1305 (1996).
- Zetler G.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 296, 255, (1988).
- De las Heras B., Rios J. L., Martinez-Mir I., Rubio E.: Pharmazie 45, 443 (1990).
- Chung L. Y., Lo M. W., Mustafa M. R., Goh S. H., Imiyabir Z.: Phytother. Res. 23, 330 (2009).
- Hue B., Le Corrionc H., Kuballa B., Anton R.: Pharmac. Pharmacol. Lett. 3, 169 (1994).
- Hager Archiv 4.0664, v databázi: *HAGER ROM 2010: Hager's Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen* (Blaschek W., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U., Reichling J., Ruth P., Schluz V., eds), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2010.
- Dictionary of Natural Products on CD-ROM, version 6:2, Chapman and Hall 1998.
- Warnat K.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. [Abteilung] B: Abhandlungen 58B, 2768 (1925).
- Spath E., Tharrer K.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. [Abteilung] B: Abhandlungen 66B, 904 (1933).
- Tewari S., Bhakuni D. S., Kapil R. S.: J. Chem. Soc. D 22, 940 (1974).
- Asencio M., Cassels B. K., Manriquez V., Boys D.: Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. 52C(6), 1581 (1996).
- Cassels B. K., Asencio M., Conget P., Speisky H., Videla L. A., Lissi E. A: Pharmacol. Res. 31, 103 (1995).

19. Konrath E. L., Santin K., Nassif M., Latini A., Henriques A., Salbego Ch.: *NeuroToxicol.* 29, 1136 (2008).
20. Kringstein P., Cederbaum A. I.: *Free Rad. Biol. Med.* 18, 559 (1995).
21. Cederbaum A. I., Kukielka E., Speisky H.: *Biochem. Pharmacol.* 44, 1765 (1992).
22. Ubeda A., Montesinos C., Paya M., Terencio C., Alcaraz M. J.: *Free Rad. Res. Commun.* 18, 167 (1993).
23. Jimenez I., Lissi E. A., Speisky H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 247 (2000).
24. Jang Y. Y., Song J. H., Shin Y. K., Han E. S., Lee Ch. S.: *Pharmacol. Res.* 42, 361 (2000).
25. Jimenez I., Garrido A., Bannach R., Gotteland M., Speisky H.: *Phytother. Res.* 14, 339 (2000).
26. Valenzuela A., Nieto S., Cassels B. K., Speisky H.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 935 (1991).
27. Quezada N., Asencio M., Del Valle J. M., Aguilera J. M., Gomez B.: *J. Food Sci.* 69, C371 (2004).
28. Santanam N., Penumetcha M., Speisky H., Parthasarathy S.: *Atherosclerosis* 173, 203 (2004).
29. Boustie J., Stigliani J.-L., Montanha J., Amoros M., Payard M., Girre L.: *J. Nat. Prod.* 61, 480 (1998).
30. Montanha J. A., Amoros M., Boustie J., Girre L.: *Planta Med.* 61, 419 (1995).
31. Spasova M., Philipov S., Nikolaeva-Glomb L., Galabov A. S., Milkova T., Bioorg. Med. Chem. 16, 7457 (2008).
32. Feng T., Xu Y., Cai X. H., Du Z. Z., Luo X. D.: *Planta Med.* 75, 76 (2009).
33. Orhan I., Ozelik B., Karaoglu T., Sener B.: *Z. Naturforsch.* 62C, 19 (2007).
34. Hung J., Castillo J., Jimenez G., Hasegawa M., Rodriguez M.: *Spectrochim. Acta* 59A(13), 3177 (2003).
35. Morello A., Lipchenca I., Cassels B. K., Speisky H., Aldunate J., Repetto Y.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 107C, 367 (1994).
36. Fournet A., Ferreira M. E., Rojas de Arias A., Guy I., Guinaudeau H., Heinzen H.: *Fitoterapia* 78, 382 (2007).
37. Omar H., Elya B., Nafiah M. A., Awang K., Mukhtar M. R., Hadi A. H. A.: *Kamphaengsaen Int. Nat. Prod. Symp: The relationship between living organisms and Environment*, Proc. Book, 1st, Bangkok, Oct. 23-24, 2010, 191; *Chem. Abstr.* 154, 454041 (2010).
38. Hu J., Speisky H., Cotgreave I. A.: *Biochem. Pharmacol.* 50, 1635 (1995).
39. Wu Y. C., Liou Y. F., Lu S. T., Chen C. H., Chang J. J., Kee K. H.: *Planta Med.* 55, 163 (1989).
40. Rahman P., Muhammad I., Choudhury M., Jabbar A.: *Bangl. J. Bot.* 17, 25 (1988).
41. Gerhardt D., Horn A. P., Gaelzer M. M., Frozza R. L., Delgado-Canedo A., Pelegrini A. L., Henriques A. T., Lenz G., Salbego Ch.: *Investigat. New Drugs* 27, 517 (2009).
42. Moreno P. R. H., Von Poser G. L., Rates S. M. K., Yoshida M., Gottlieb O. R., Souza I. A., Henriques A. T.: *Int. J. Pharmacogn.* 31, 189 (1993).
43. Nguyen V. H., Nguyen V. T.: *Tap Chi Hoa Hoc* 42, 205 (2004); *Chem. Abstr.* 143, 189911 (2005).
44. Wang R., Tang S., Zhai H., Duan H.: *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 36, 1032 (2011); *Chem. Abstr.* 157, 420189 (2011).
45. Kim, K. H., Piao C. J., Choi S. U., Son M. W., Lee K. R.: *Planta Med.* 76, 1732 (2010).
46. Cibiková P., Šturdíková M., Maruna M.: *Chem. Listy* 104, 12 (2010).
47. Thomet F. A., Pinol P., Villena J., Reveco P. G.: *Molecules* 16, 2253 (2011).
48. Moreira R. G. D., Carlos I. Z., Vilegas W.: *Biol. Pharm. Bull.* 24, 201 (2001).
49. Backhouse N., Delporte C., Givernau M., Cassels B. K., Valenzuela A., Speisky H.: *Agents Action* 42, 114 (1994).
50. Gonzales-Cabello R., Speisky H., Bannach R., Valenzuela A., Feher J., Gergely P.: *J. Investigat. Alergol. Clin. Immunol.* 4, 139 (1994).
51. Gotteland M., Jimenez I., Brunser O., Guzman L., Romero S., Cassels B. K., Speisky H.: *Planta Med.* 63, 311 (1997).
52. Estelles R., Milian L., Abu N., Yafa N., Mateo T., Cerda-Nicolas M., Losada M., Ivorra M. D., Issekutz A. C., Cortijo J., Morcillo E. J. et al.: *J. Leucocyt. Biol.* 78, 696 (2005).
53. Zhao Q., Zhao Y., Wang K.: *J. Ethnopharmacol.* 106, 408 (2006).
54. Hu L., Zuo J., Zheng Z., Zhou Y., Zhong X.: *Faming Zhuanli Shenqing CN* 1923813 (2007); *Chem. Abstr.* 146, 365149 (2007).
55. Ivanovska N., Philipov S.: *Phytother. Res.* 10, 62 (1996).
56. Luo Y., Liu M., Xia Y., Dai Y., Chou G., Wang Z.: *Phytomedicine* 17, 726 (2010).
57. Luo Y., Liu M., Dai Y., Yao X., Xia Y., Chou G., Wang Z.: *Inflammation* 33, 389 (2010).
58. Dai Y., Xia Y., Liu M., Chou G., Wang Z.: *Faming Zhuanli Shenqing CN* 101375850 A 20090304 (2009); *Chem. Abstr.* 150, 298895 (2009).
59. Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A. H. A., Mukhtar M. R., Awang K., Litaudon M., Ata A.: *Fitoterapia* 83, 298 (2012).
60. Hostalkova A., Opletal L., Kunes J., Novak Z., Hrabí-nova M., Chlebek J., Cegan L., Cahlikova L.: *Nat. Prod. Commun.* 10, 577 (2015).
61. Youn Y. Ch., Kwon O. S., Han E. S., Song J. H., Shin Y. K., Lee Ch. S.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 495 (2002).
62. Iturriaga-Vasquez P., Perez E. G., Slater E. Y., Bermudez I., Cassels B. K.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3368 (2007).
63. Sobarzo-Sanchez E. M., Arbaoui J., Protais P., Cassels B. K.: *J. Nat. Prod.* 63, 480 (2000).
64. Asencio M., Hurtado-Guzman C., Lopez J. J., Cassels B. K., Protais P., Chagroui A.: *Bioorg. Med. Chem.*

- 13, 3699 (2005).
65. Martinez S., Madrero Y., Elorriaga M., Noguera M. A., Cassels B., Sobarzo E., D'Ocon P., Ivorra M. D.: *Life Sci.* **64**, 1205 (1999).
 66. Lemos V. S., Thomas G., Barbosa F. J. M.: *J. Ethnopharmacol.* **40**, 141 (1993).
 67. Eltze M., Grebe T., Michel M. C., Czyborra P., Ullrich B.: *Eur. J. Pharmacol.* **443**, 151 (2002).
 68. Yu B., Cook C., Santanam N.: *J. Med. Food* **12**, 1074 (2009).
 69. Chen K.-S., Ko F.-N., Teng C.-M., Wu Y.-C.: *Planta Med.* **62**, 133 (1996).
 70. Chen W.-Y., Ko F.-N., Wu Y.-C., Lu S.-T., Teng C. M.: *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 380 (1994).
 71. Schmida-Hirschmann G., Loyola J. I., Rodriguez J., Dutra-Behrens M.: *Phytother. Res.* **8**, 49 (1994).
 72. So M., Don T., Ri S.: *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 07053480* (1995); *Chem. Abstr.* **122**, 291255 (1995).
 73. Yu S. M., Lee S. S., Hou Y. S., Teng Ch. M.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **349**, 637 (1994).
 74. Leboeuf M., Cave A., Provost J., Tiberghien R., Forgacs P.: *Ann. Pharm. Franc.* **38**, 537 (1980).
 75. Borkowski B., Desperak-Naciazek A., Obojska K., Szmal Z.: *Diss. Pharm. Pharmacol.* **18**, 455 (1966).
 76. Lanhers M. C., Joyeux M., Soulimani R., Fleurentin J., Sayag M., Mortier F., Younos C., Pelta J. M.: *Planta Med.* **57**, 110 (1991).
 77. Ishihara R., Takamatsu A., Norito M., Irino M., Takiguchi Y.: *Kenkyu Hokoku – Wakayama-ken Kogyo Gijutsu Senta* **2010**, 23; *Chem. Abstr.* **154**, 149943 (2010).
 78. Chi T. Ch., Lee S. S., Su M. J.: *Planta Med.* **72**(13), 1175 (2006).
 79. Lee S. S., Su M. J.: *PCT Int. Appl.*, WO 206136063 (2006).
 80. Fernandez J., Lagos P., Rivera P., Zamorano-Ponce E.: *Phytother. Res.* **23**, 1024 (2009).
 81. Wanke R. I., Ribeiro da Silva C., Felzenswalb I., Carlos Pelielo de Mattos J., Fonseca de Oliveira D., Jose da Silva Jantas F., Bezerra R. J. A. C., Caldeira de Araujo A., Bernardo-Filho, M.: *J. Ethnopharmacol.* **68**, 345 (1999).
 82. Bannach R., Valenzuela A., Cassels B. K., Nunez-Vergara L. J., Speisky H.: *Cell Biol. Toxicol.* **12**, 89 (1996).
 83. Peeples A., Dalvi R. R.: *J. Appl. Toxicol.* **2**, 300 (1982).
 84. Kubinova R., Machala M., Minksova K., Neca J., Suchy V.: *Pharmazie* **56**, 242 (2001).
 85. Moreno P. R. H., Vargas V. M. F., Andrade H. H. R., Henriques A. T., Henriques J. A. P.: *Mut. Res. Gen. Toxicol. Test.* **260**, 145 (1991).
 86. Henriques J. A., Moreno P. R., Von Poser G. L., Querol C. C., Henriques A. T.: *Memor. Instit. Oswaldo Cruz* **86**, Suppl. 2, 71 (1991).
 87. Tavares D. C., Takahashi C. S.: *Mut. Res. Gen. Toxicol.* **321**, 139 (1994).
 88. Krell H. L., Grams F., Brunner A.: *PCT Int. Appl.* WO 9916441 (1999).
 89. Lee S. S., Su M. J.: *PCT Int. Appl.*, WO 2007134485 (2007).
 90. Fan Ch. T., Lai Ch. S., Lin M. J.: *U.S. Pat. Appl. Publ.*, US 20090318488 (2009).
 91. Fan Ch. T., Lai Ch. S., Lin M. J.: *U.S. Pat. Appl. Publ.* US 20090318489 (2009).
 92. Hidalgo M. E., Gonzales I., Toro F., Fernandez E., Speisky H., Jimenez I.: *Cosmet. Toilet.* **113**, 59 (1998).
 93. Lintner K.: *Res. Disclosure RD* 480011, 2040410 (2004).
 94. Christensen F. K.: *PCT Int. Appl.*, WO 2005041854 (2005).
 95. Russo A., Cardile V., Caggia S., Gunther G., Troncoso N., Garbarino, J.: *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 1219 (2011).
 96. Lintner K.: *PCT Int. Appl.*, WO 2002066000 (2002).

A. Hošťáková^a, T. Siatka^a, J. Chlebek^a, L. Opletal^a, P. Drašar^b, and L. Cahliková^a (^a*Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, ADINACO Research Group, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové*, ^b*Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Boldine Alkaloids and Prospects of Their Utilization**

The review deals with boldine-type of alkaloids, their distribution in plants and their biological activities including antioxidant and anti-invasive effects as well as with their influence on the inflammatory intervention in metabolism of xenobiotics, genotoxicity, chemoprotective effects and application the alkaloids and their derivatives.

SLEDOVANIE PRODUKCIE RESVERATROL 3- β -D-GLUKOZIDU V BUNKOVÝCH KULTÚRACH VINIČA PO VYSTRESOVANÍ FUNGALNÝM ELICITOROM

MARTIN SÁK^{a,b}, IVANA DOKUPILOVÁ^b a JÁN
ŠAJBIDOR^a

^a Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Výskumný Ústav Vinohradnícky a Vinársky, Národné poľnohospodárske a Potravinárske centrum, Hlavná ulica 326, 900 41 Rovinka
11martinsak@gmail.com

Došlo 4.11.14, prepracované 17.2.15, prijaté 12.3.15.

Kľúčové slová: *Vitis vinifera*, resveratrol 3- β -D-glukozid, bunkové kultúry, fungálny elicitor

Úvod

Polyfenoly sú prírodné látky s rôznorodými štruktúrami obsiahnuté predovšetkým v ovoci, zelenine, čaji a víne¹. V rastlinách bolo identifikovaných viac ako 8000 štruktúr polyfenolov. Veľa týchto látok sa nachádza v jedovatých rastlinách². Všetky polyfenoly majú viac ako jednu fenolovú jednotku, na ktorú sa zvyčajne viaže niekoľko hydroxylových skupín. Väčšina obsahuje aspoň jeden glykozid spájajúci hydroxylové skupiny. Flavonoidy sú jednou z najdôležitejších skupín polyfenolov. Zahŕňajú flavonoly (napr. kvercetin, myricetin, kaempferol), flavanoly (napr. katechín, katechín galát, epicatechín, epigallokatechín-3-galát), flavóny (napr. apigenín, rutin a luteolín) a antokyanidíny (napr. kyanidín, malvidín, naringinín). Záujem o polyfenoly v posledných rokoch vzrástá vďaka ich antioxidačnej aktivite. Pôsobia inhibične na agregáciu krvných doštičiek, popri pozitívnym účinkom na kardiovaskulárny systém zohrávajú aj dôležitú úlohu v prevencii rôznych druhov rakovinových ochorení^{3–6}.

Významnou skupinou fenolových zlúčenín sú fytoalexíny – stilbény. Ide o sekundárne metabolity syntetizované rastlinami využívané pri defenzných mechanizmoch. Najznámejším zástupcom je resveratrol produkovaný napríklad viničovými bunkami po napadnutí zmesou húb spôsobujúcich ochorenie ESCA (Petriho choroba)^{7,8}.

Rastlinné bunkové kultúry našli využitie najmä v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle^{9–11}. Ich výhodou je produkcia čistých látok bez prítomnosti nežiaducich izomérov, ktoré sú problémom pri ich chemickej syntéze. Mikroorganizmy sa uplatňujú najmä v moderných biotechnológiách, ale nie vždy dokážeme

regulovať biosyntetickú dráhu producenta s cieľom zvýšenia výťažku žiadaného metabolitu. Výhodou rastlinných bunkových kultúr je aj celoročná dostupnosť biologického materiálu s nízkymi nárokmi na výživu. Zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov sa dá dosiahnuť prostredníctvom prekursorov, elicitáciou napríklad metyl jasmonátom a kyselinou salicylovou alebo genetickou manipuláciou.

Kyselina jasmónová v kombinácii s ožarovaním značne ovplyvňuje biosyntézu antokyánov v rastlinných bunkových kultúrach¹². Eicitáciou rastlinných bunkových kultúr s indanoyl-izoleucínom, *N*-linolenoyl-l-glutamínom a slinami hmyzu sa zvýšila produkcia resveratrolu¹³. Iniciovať zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov v rastlinných bunkových kultúrach je možné aj abiotickými fyzikálnymi faktormi, ako sú napr. pulzné elektrické pole alebo aj ich kombináciou s biotickým faktorom, ako napr. etefónom¹⁴.

V našej štúdii sme sa zamerali na sledovanie vplyvu polysacharidového fungálneho elicitora z *Fusarium oxysporum* na produkciu stilbénu resveratrol 3- β -D-glukozidu (polydatín – POL) vo viničových bunkových kultúrach. Laboratórne pripravený polysacharidový elicitor sa aplikoval do média k rastlinným bunkovým kultúram. Sledovali sa nasledovné parametre: rast biomasy, vodivosť kultivačného média a vplyv elicitora na produkciu POL.

Experimentálna časť

Príprava bunkových kultúr a sledovanie rastu

Bunkové kultúry sa pripravili zo sterilizovaných segmentov listov viniča z odrody Váh. Kultivovali sa na ½ Murashige a Skoog médiu¹⁵ (Duchefa BIOCHEMIE B.V., Holandsko) s pridaním ďalších zložiek: 3 % (w/v) sacharózy a 0,7 % (w/v) agaru, 0,1 mg l⁻¹ 1-naftalénocetová kyselina (NAA) (Sigma-Aldrich, Nemecko), 0,2 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurín (BAP) (Sigma-Aldrich, Nemecko) a pH sa upravilo na 5,8. Kultúry sa kultivovali v režime 16 h žiarivkové svetlo (cca. 2900 lux)/8 h tma pri 25 ± 1 °C. Následne boli prenášané na nové médium každých 30 dní.

Bunkové suspenzné kultúry boli pripravené sterilným prenesením 5 g tuhých bunkových kultúr do 50 ml kvapalného média, ktorého zloženie bolo rovnaké ako v prípade tuhého média, ale bez agaru. 250ml fláše boli miešané na trepačke na 120 ot./min. a udržiavané pri teplote 25 ± 1 °C v režime 16 h žiarivkové svetlo (cca. 2900 lux)/8 h tma. Rast biomasy sa sledoval vo všetkých bunkových kultúrach v 1-dňových intervaloch počas celej doby kultivácie a bol vyhodnotený ako nárast suchej hmotnosti.

Príprava a aplikácia fungálneho elicitora

Fusarium oxysporum, izolovaná z drevných odrezkov viniča, bola udržiavaná v tme pri izbovej teplote na zemiaso-kovo-dextrózovom agare (Sigma-Aldrich, Nemecko). Mycélium rástlo na kvapalnom médiu Czapek Dox Broth (Duchefa BIOCHEMIE B.V., Holandsko).

Elicitor obsahujúci polysacharidy (POE) sa pripravil zo 50 g čerstvo naváženého mycélia, ktoré sa dvakrát premylo deionizovanou vodou, zmrazilo a zlyofilizovalo. Následne sa pomlelo na prášok, pridalo do 80% etanolu v pomere 1:4 (w/v) a ponechalo 24 h pri izbovej teplote. Zmes sa vákuovo prefiltrovala, nerozpustné komponenty sa pridali do chloroformu v pomere 1:4 (w/v) a refluxovali pod spätným chladičom pri 60 °C 4 h. Po ochladení sa zmes prefiltrovala a filtrát obsahujúci lipidy a proteíny bol odstránený. Zvyšok bol premytý acetónom a zlyofilizovaný. Suchý materiál bol pridaný do 1 M HCl v pomere 1:6 (w/v). Vzniknutá suspenzia sa následne prefiltrovala. pH filtrátu sa upravilo na 3,0 s 0,5 M NaOH. Koncentrácia fungálnych polysacharidov v získanom elicitoru bola stanovená spektrálnou metódou na princípe H_2SO_4 -UV techniky¹⁶. Nameraná koncentrácia bola vyhodnotená ako mg KE (ekvivalent karbohydrátu)/l.

K bunkovým suspenziám kultúram sa pridal laboratorne pripravený fungálny elicitor na šiesty deň kultivácie. Výsledné koncentrácie elicitorov v tekutých médiách boli 30 (POE1), 60 (POE2) a 120 (POE3) mg KE/l. Ku kontrole sa napipetoval rovnaký objem destilovanej vody s pH 3,0.

Stanovenie elektrickej vodivosti kultivačného média

Po pridaní elicitora sa stanovila vodivosť média pomocou prístroja (EUTECH Instruments – Cybercan PC 10) v jednoduchých intervaloch po dobu 6 dní.

Extrakcia resveratrol 3-β-D-glukozidu

Bunková kultúra sa separovala z kultivačného média vákuovou filtráciou. Následne bola premytá jedenkrát demineralizovanou vodou. Získaná bunková kultúra sa vysušila lyofilizáciou a odvážila. Následne sa zhomogenizovala a bola extrahovaná s 80% metanolom s pH 2,5 v pomere 1:15 (w/v). Získaná suspenzia sa ponorila do ultrazvukového kúpeľa na 1 h a priebežne sa premiešavala. Nerozpustený bunkový materiál sa zo suspenzie odstránil centrifugáciou pri 10 000 ot./min za 15 min. Supernatant sa uskladnil v chladničke a extrakčný proces sa so sedimentom zopakoval. Získané metanolové extrakty sa spojili a boli zahustené na vákuovej rotačnej odparke pri 35 °C. Koncentrovaný extrakt bol nariadený s demineralizovanou vodou v pomere 1:8 (v/v) a nastrekutý do laboratorne pripravenej sklenej SPE kolónky C18 (0,1 g/3 ml). SPE kolónka bola pred pridaním vzorky kondicionovaná zmesou 3 ml metanol:HCl (98:2 v/v) a 3 ml demineralizovaná voda : HCl (98:2 v/v). Po pridaní vzorky sa SPE kolónka prepláchla 1,5 ml demineralizovaná voda:HCl (98:2 v/v). Samotná vzorka bola z kolónky eluovaná s 1,5 ml 70% metanol : HCl (98:2 v/v). Takto získaná vzorka bola použitá na HPLC analýzu.

HPLC stanovenie resveratrol 3-β-D-glukozidu

Na stanovenie resveratrol 3-β-D-glukozidu v získanom extrakte bola použitá HPLC (Hewlett Packard 1200) v kombinácii s detektorom diódového poľa. Vzorky pred nastrekutím boli prefiltrované cez diskový membránový filter, 20 μl pomocou autosampléra na kolónu Supelco C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) vyhriatu na 35 °C termostatom. Vysokotlaková binárna pumpa vytvorila podmienky gradientu mobilných fáz kyselina octová : demineralizovaná voda (1:99 v/v) ako rozpúšťadlo A a metanol ako rozpúšťadlo B. Meralo sa podľa uvedeného programu: od 0 min do 8 min zo 30 % na 70 % B, od 7 min do 10 min zo 70 % na 85 % B, od 10 min do 18 min prebiehalo rekonduciovanie kolóny s 70 % A a 30 % B. Pre POL bolo zaznamenávané UV-VIS spektrum v rozsahu 200 až 600 nm. POL bol identifikovaný na základe porovnania relatívneho retenčného času a UV-VIS spektra s autentickým externým štandardom. Kvantifikácia bola vyhodnotená na základe externej kalibračnej krivky. Ako interný štandard bol použitý syringaldehyd.

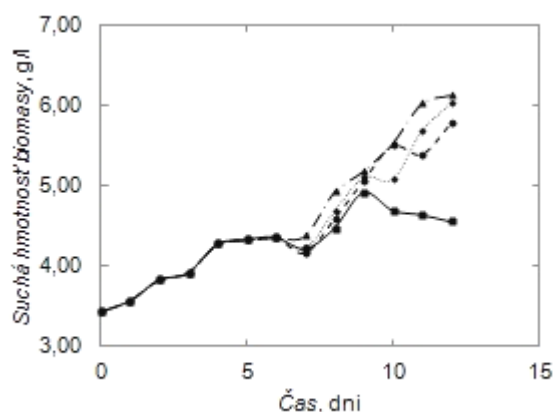
Výsledky a diskusia

In vitro bunkové kultúry (*Vitis vinifera* L.) pripravené z odrody Váh boli kultivované s laboratorne pripraveným polysacharidovým fungálnym elicitorom (POE) s cieľom sledovať vplyv na produkciu POL. Bolo dokázané, že polysacharidové elicitory získané z huby *Phytophthora gasperma* zvýšili produkciu fytoalexínov v bunkových kultúrach sóje. Prítomnosť viacerých oligo- a polysacharidov spôsobilo spustenie obranných mechanizmov a následné zvýšenie produkcie fytoalexínov¹⁷.

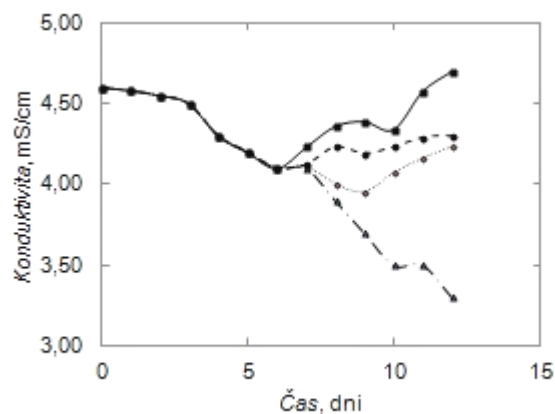
Vodivosť kultivačného média a rast bunkových kultúr

Suchá hmotnosť bunkových kultúr bola stanovovaná v jednoduchých intervaloch počas celej doby kultivácie (obr. 1). Odumretie buniek počas kultivácie elicitovalých buniek aj kontroly sa prejavilo farebnou zmenou média zo zelenej na bledo-hnedú. Všetky koncentrácie elicitora mali za následok spomalenie nárastu biomasy bunkových kultúr v porovnaní s kontrolou. Tento pokles mohol spôsobiť obranný mechanizmus buniek odpovedajúci na prítomnosť elicitora, inhibíciu rastu a stimuláciu sekundárneho metabolizmu buniek¹⁸ (obr. 2). Biomasa bunkových kultúr elicitovalých s POE1 a POE2 rástla, aj keď menej ako kontrolná bunková kultúra. Najvyššia koncentrácia elicitora spôsobila úhyn veľkého množstva bunkovej kultúry a pravdepodobne došlo k väčšiemu zapojeniu obranných mechanizmov a bunky využili viac energie na obranu pred fungálnym patogénom ako na rast, čo je vidieť najmä v treťom dni po elicítácii.

Ďalším sledovaným parametrom v experimente bola vodivosť, ktorá poskytuje informáciu o poklese živín v médiu (obr. 2). Všetky kultivačné média s prídavkom



Obr. 1. Suchá hmotnosť bunkových kultúr počas kultivácie; kontrola (- - - - -), elicitor 30 mg KE/l (.....), elicitor 60 mg KE/l (- · - · - ·), elicitor 120 mg/l KE (———)



Obr. 2. Konduktivita kultivačného média počas kultivácie; kontrola (- - - - -), elicitor 30 mg KE/l (.....), elicitor 60 mg KE/l (- · - · - ·), elicitor 120 mg/l KE (———)

elicitora vykazovali počas experimentu vyššiu vodivosť ako kontrola, čo mohlo byť spôsobené hypersenzitívnou reakciou, uvoľnením intracelulárnych iónov a v prípade mŕtvych buniek intracelulárneho obsahu^{18–20}, čo je vidieť najmä od štvrtého dňa elicitácie až po koniec experimentu v prípade POE3. POE1 spôsobil najskôr pokles a následne slabý nárast vodivosti. Počas kultivácie bol však zaznamenaný klesajúci trend vodivosti v prípade kontroly, nakoľko došlo k priebežnému čerpaniu živín z média¹³.

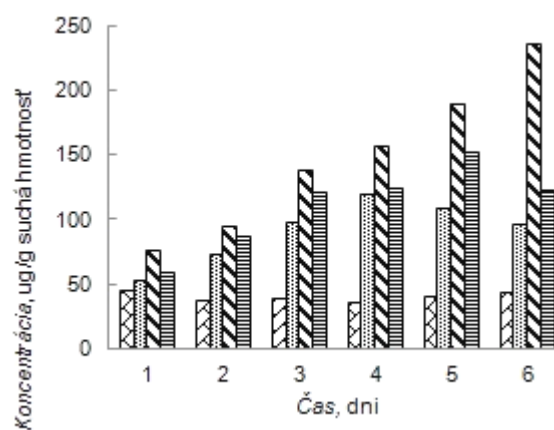
Vplyv fungálneho elicitora na produkciu resveratrol 3-β-D-glukozidu (POL)

Elicitor pripravený z *Fusarium oxysporum* spôsobil zvýšenú produkciu POL v elicitovaných bunkových kultúrach (obr. 3). Najlepšia koncentrácia stimulujúca produkciu POL s minimálnym letálnym účinkom na bunkové kultúry bola POE2.

Vysoká akumulácia POL bola zaznamenaná vo všetkých bunkových kultúrach už na druhý deň po elicitácii, čo mohlo byť spôsobené spustením obranných mechanizmov. Nameraná koncentrácia POL bola v kontrole približne rovnaká, od 36,5 do 45,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ suchej váhy (sv), počas celej doby odberu vzoriek. Koncentrácia POL na druhý deň elicitácie dosiahla hodnoty 72,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv v prípade POE1, 95,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv pri POE2 a 87,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv pri POE3. Tento nárast bol v porovnaní s kontrolou 1,9 ~ 2,5× vyšší a postupne stúpal aj do tretieho dňa po elicitácii. Koncentrácia POL na piaty deň klesla v prípade bunkových kultúr elicitovaných POE1 zo 120,0 na 108,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv. V bunkových kultúrach elicitovaných POE1 klesala koncentrácia POL aj na ďalší deň, a to z 108,4 na 96,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv. Tento pokles mohol byť spôsobený nízkou koncentráciou fungálneho elicitora, a preto aj bunková kultúra postupne znižovala produkciu POL.

V prípade bunkových kultúr elicitovaných fungálnym elicitorom POE3 bol tiež zaznamenaný pokles akumulácie POL v posledných dňoch kultivácie, a to zo 153,2 na 123,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv. Podobný pokles v produkcii sekundárnych metabolitov bol zaznamenaný aj u iných rastlinných systémov^{21,22}. Tento pokles je možné vysvetliť vplyvom dlhšej inkubačnej doby, pričom stresové metabolity, akými sú napríklad fytoalexíny, nemusia predstavovať finálny produkt biochemickej dráhy a sú ďalej metabolizované na menej toxické fytochemikálie²³.

Koncentrácia POL v bunkovej kultúre bola na šiesty deň po elicitácii POE2 najvyššia, a to 236,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ sv, čo bolo 5,4× viac ako v kontrole. Na rozdiel od bunkových



Obr. 3. Koncentrácie resveratrol 3-β-D-glukozidu v bunkových kultúrach počas kultivácie 6 dní po elicitácii; kontrola (■), elicitor 30 mg KE/l (■), elicitor 60 mg KE/l (■), elicitor 120 mg/l KE (■)

kultúr elicitovaných POE1 a POE3, koncentrácia oproti predchádzajúcim dňom vzrástla. Tento nárast môžeme vysvetliť vhodnou koncentráciou fungálneho elicitora, ktorý spustil sekundárny metabolizmus bunkovej kultúry, pričom POE2 nepôsobil letálne ako POE3. Podobnú produkciu vykazovali suspenzné kultúry *Calendula officinalis* po elicitácii biotickými elicitormi²⁴ a suspenzné kultúry *Plumbago rosea* L. elicitované sekundárnymi metabolitmi mikroorganizmov²⁵.

Záver

V tejto práci sme sa zamerali na sledovanie produkcie resveratrol 3- β -D-glukozidu z bunkových kultúr viniča odrody Váh (*Vitis vinifera*) v *in vitro* podmienkach. Použitím polysacharidového elicitora pripraveného z *Fusarium oxysporum* sa nám podarila zvýšiť produkcia niekoľkonásobne. Bunkové kultúry majú niekoľko výhod v porovnaní s rastlinou, ako napríklad celoročná dostupnosť, produkciu sekundárnych metabolitov je možné zvýšiť viacerými spôsobmi, bunkové kultúry nepodliehajú chorobám a sekundárny metabolit môžeme extrahovať aj mimo vegetačného obdobia. Resveratrol 3- β -D-glukozid vďaka svojím zdravím prospešným účinkom a širokospektrálnemu uplatneniu v kozmetickom, farmaceutickom a potravinárskom priemysle je zaujímavou chemickou zlúčeninou, v prípade ktorej má význam hľadať moderné spôsoby získavania. Výsledky tejto práce ukazujú, že moderným biotechnologickým spôsobom je možné efektívne získavať resveratrol 3- β -D-glukozid a následne ho aplikovať do priemyselnej praxe.

Táto práca bola podporená projektom Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0550-11.

LITERATÚRA

- Bravo L.: Nutr. Rev. 56, 317 (1998).
- Ross J. A., Kasum C. M.: Annu. Rev. Nutr. 22, 19 (2002).
- Teszla P., Gaál K., Nikfardjam M. S. P.: Anal. Chim. Acta 543, 275 (2005).
- Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. B., Vinh J., Toledano M. B.: Cell 111, 471 (2002).
- Vitrac X., Krisa S., Decendit A., Vercauteren J., Nüh- rich A., Monti J.-P., Deffieux G., Mérillon J.-M.: J. Biotechnol. 95, 49 (2002).
- Panickar K. S., Polansky M. M., Anderson R. A.: Exp. Neurol. 216, 420 (2009).
- Zheng C., Choquer M., Zhang B., Ge H., Hu S., Ma H., Chen S.: Fung. Bio. 115, 815 (2011).
- Holthoff J. H., Woodling K. A., Doerge D. R., Burns S.T., Hinson J. A., Mayeux P. R.: Biochem. Pharmacol. 80, 1260 (2010).
- Dicosmo F., Misawa, M.: Biotechnol. Adv. 13, 425 (1995).
- Kolbe A., Schneider B., Porzel A., Voigt B., Krauss G., Adam G.: Phytochem. 36, 671 (1994).
- Pasqua G., Pinarosa A., Monacelli B., Santamaria A. R., Pia Argentieri M.: Plant Sci. 165, 977 (2003).
- Wei Zhang, Chris Curtin, Mami Kikuchi, Franco C.: Plant Sci. 162, 459 (2002).
- Caia Z., Knorr D., Smetanska I.: Enzyme Microb. Technol. 50, 29 (2012).
- Saw N. M. M. T., Riedel H., Cai Z., Kütük O., Smetanska I.: Plant Cell, Tissue Organ Cult. 108, 47 (2012).
- Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
- Albalasmeh A. A., Berhe A. A., Ghezzehei T. A.: Carbohydr. Polym. 97, 253 (2013).
- Kortekamp A.: Plant Physiol. Biochem. 44, 58 (2006).
- Chen H., Chen F.: Process Biochem. 35, 837 (2000).
- Zhong J.-J., Chen F., Hu W.-W.: Process Biochem. 35, 491 (1999).
- Cheng X. Y., Wei T., Guo B., Ni W., Liu C. Z.: Process Biochem. 40, 3119 (2005).
- Liu W., Liu C., Yang C., Wang L., Li Sh.: Food Chem. 122, 475 (2010).
- Ferri M., Dipalo S. C. F., Bagni N., Tassoni A.: Food Chem. 124, 1473 (2011).
- Miguel M. G., Barroso J. G.: Phytochem. 35, 371 (1994).
- Wiktorowska E., Długosz M., Janiszowska W.: Enzyme Microb. Technol. 46, 14 (2010).
- Komaraiah P., Amrutha R. N., Kavi Kishor P. B., Ramakrishna S. V.: Enzyme Microb. Technol. 31, 634 (2002).

M. Sák^{a,b}, I. Dokupilová^b, and J. Šajbidor^a
^{(^aInstitute of Biotechnology and Food Industry, Slovak Technical University, Bratislava, ^bResearch Institute of Viticulture and Enology – National Agriculture and Food centre, Slovakia): **Monitoring Production of Resveratrol 3- β -D-Glucoside in *Vitis* Cell Cultures after Dressing with Fungal Elicitor**}

The main aim of this study is to monitor the impact of biotic elicitor on resveratrol 3- β -D-glucoside production in cell culture of *Vitis vinifera* cv.Váh. Suspension cultures were treated with different concentrations of fungal elicitor with the aspect on polysaccharide components. The highest concentration of resveratrol 3- β -D-glucoside 236 mg g⁻¹ (dry weight of plant cells) was determined in suspension culture on sixth day of cultivation after treatment with fungal elicitor with polysaccharide total content 60 mg (carbohydrate equivalent)/L. This concentration was 5,44 times more than in the control suspension culture.

ANABOLICKÉ ANDROGENNÍ STEROIDY – NEBEZPEČÍ V DOPLŇCÍCH STRAVY

LUCIE FOJTÍKOVÁ, SANDRA GÖSELOVÁ
a BARBORA HOLUBOVÁÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
barbora.holubova@vscht.cz

Došlo 28.4.15, přijato 23.6.15.

Klíčová slova: anabolické androgenní steroidy, testosteron, doplňky stravy, doping

Obsah

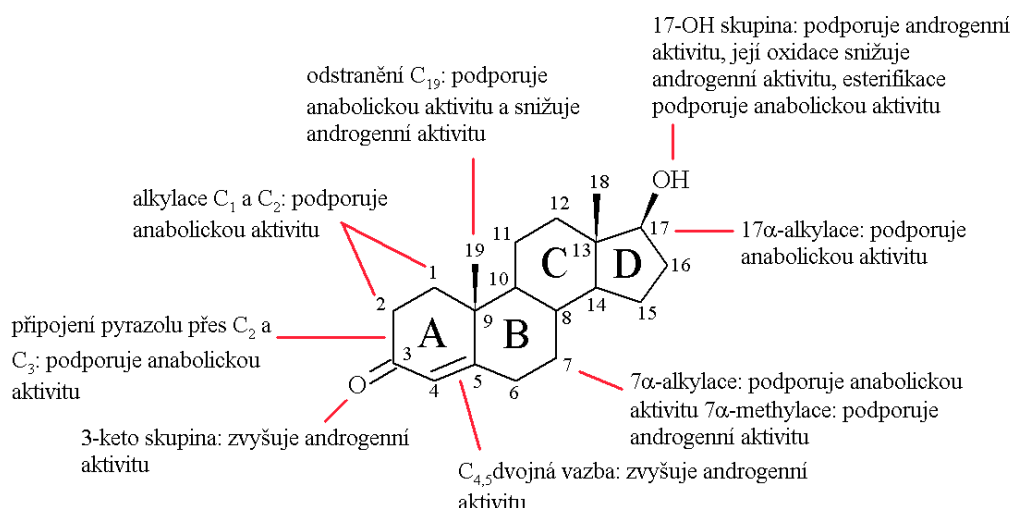
1. Úvod
2. Anabolické androgenní steroidy (AAS)
 - 2.1. Lékařské využití AAS
 - 2.2. AAS a sport
 - 2.3. Vedlejší účinky při užívání AAS
3. Doplnky stravy
 - 3.1. Legislativa doplňků stravy
 - 3.2. Otázka kontaminovaných doplňků stravy ve světě a u nás
4. Metody stanovení
5. Závěr

1. Úvod

Anabolické androgenní steroidy (AAS) jsou v dnešní době využívány nejen v lékařství na podporu léčebných postupů, ale i ve sportu jako nepovolený doping na podporu rychlého nárůstu svalové hmoty a celkového zesílení organismu. Volný prodej těchto látek je zakázán, přesto se mohou nelegálně dostat do prodeje například ve formě doplňků stravy, aniž je to uvedeno na etiketě obalu. Toto jednání ohrožuje především zákazníky, kteří kupují produkt bez deklarovaného obsahu anabolik, a tudíž tyto látky užívají nevědomky. Užívání AAS s sebou nese závažné vedlejší účinky jak po stránce fyziologické, tak psychologické. Kromě toho se spotřebitelé vystavují riziku pozitivního dopingového testu. Z těchto důvodů je vhodné, aby existoval dohled nad zdravotní nezávadností doplňků stravy a byly k dispozici metody, jež by umožnily AAS v doplňcích stravy spolehlivě odhalit.

2. Anabolické androgenní steroidy

Anabolické androgenní steroidy (AAS) jsou syntetické deriváty testosteronu. Ovlivňují vývoj a funkci mužských pohlavních orgánů, spermatogenezi v Sertoliho buňkách a vývoj sekundárních pohlavních znaků, což je souhrnně označováno jako „androgenní“ působení. Vyznačují se však i tzv. „anabolickým“ efektem, kdy působí periferně a stimulují retenci dusíku v těle a syntézu proteinů především ve svalech¹.

Obr. 1. Vliv změn struktury anabolických androgenních steroidů na biologickou funkci (převzato z cit.²)

Strukturní modifikací testosteronu je možné ovlivnit poměr anabolických a androgenních vlastností (zvýšit účinnost a biologickou aktivitu) a způsob, jakým bude daný steroid aplikován do organismu (obr. 1)². V současné době však není dostupný žádný steroid, který by měl pouze anabolické nebo pouze androgenní vlastnosti.

Obecně lze říci, že rozeznáváme tři typy analogů testosteronu. První typ je charakterizován esterifikací 17 β -hydroxylové skupiny karboxylovou kyselinou, která má za následek zvýšenou odolnost vůči biodegradaci a delší biologickou aktivitu steroidů. Esterifikované steroidy jsou lépe rozpustné v nepolárním prostředí, čehož je využito např. při intramuskulárním podání. Délka působení jednotlivých preparátů závisí na druhu kyseliny použité k esterifikaci. Může se pak jednat o acetát, propionát, fenylpropionát, cyklopentylpropionát, dekanoát aj. příslušného steroidu. Nejznámějším zástupcem této skupiny je testosteron propionát. Druhý typ látek se vyznačuje alkylací atomu uhlíku v pozici 17 α , která umožňuje příjem steroidů orální cestou. Bez této modifikace by byly orálně podávané steroidy prakticky neúčinné, neboť by část podané dávky byla ještě před vstupem do systémové cirkulace metabolizována v játrech a došlo by ke snížení účinku steroidů³. Pomalejší odbourávání je ovšem spojeno s jejich zvýšenou jaterní toxicitou. Jako příklad lze uvést methyltestosteron, stanozol, či oxandrolon. Poslední typ vzniká modifikací A, B, nebo C kruhu. Příkladem může být boldenon, který obsahuje dvojnou vazbu v poloze C₁. Druhý a třetí typ látek je polárního charakteru, což má za následek renální exkreci.

2.1. Lékařské využití AAS

AAS jsou součástí tradiční medicíny již řadu let a hrají důležitou roli v léčbě mnoha chorob. Od 40. let 20. století jsou předepisovány především při stavech celkového oslabení organismu v důsledku lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), při rozsáhlých popáleninách, po operacích a radiační léčbě, při anemiích, jaterních a ledvinových selháních, plicních obtížích i při onemocnění rakovinou^{4,5}. Asi nejčastěji jsou aplikovány u pacientů dlouhodobě trpících svalovou dystrofií, kdy je anabolická funkce steroidů nesporným kladem ve srovnání s jejich vedlejšími účinky. Jsou známy i případy podávání anabolických steroidů pro zlepšení psychického stavu pacientů trpících depresemi⁴.

Vzhledem k tomu, že s užíváním AAS se pojí široké spektrum negativních vedlejších účinků (jak bude popsáno v kapitole 2.3.), je při terapii AAS nutné dobře zvážit, zdali příznivý účinek na zdravotní stav pacienta dostatečně převyšuje negativní dopady a velmi důkladně hlídat dávkování a stav pacienta během léčby⁴.

2.2. AAS a sport

Původním účelem syntézy anabolických steroidů bylo jejich využití v medicíně při léčbě závažných onemocnění. Pro své již zmiňované účinky však našly uplatnění i v řadě sportovních odvětví. Očekávání sportovců od uží-

vání AAS se odlišuje podle sportu, který provozují. Vzpěrači chtějí zvýšit svou fyzickou sílu, kulturisté zvýšit nárůst objemu svalové hmoty a snížit obsah tuku v těle, rychlostní sportovci, jako plavci a běžci, hledají možnost zvýšit intenzitu tréninku na maximum bez fyzického kolapsu⁶. Otázka anabolik se ovšem netýká pouze vrcholových sportovců, čím dál více po nich sahají zejména mladší vyznavači bodybuildingu, jejichž cílem je snadné dosažení „vysněných tvarů“ svalových partií těla.

Užívání AAS

Nejběžněji se AAS užívají orálně a intramuskulárně. V dnešní době bývají dostupné také ve formě krémů či gelů. Použití těchto neobvyklých aplikačních forem souvisí se snahou přelstít antidopingové testy. Uživatelé často aplikují několik různých typů AAS najednou, čímž se snaží předejít vypěstování si tolerance vůči jednomu z nich. Ve snaze získat co největší objem svalové hmoty dochází velmi často k „předávkování“. Jsou podávány dávky 10× až 100× větší než pro léčebné účely⁷.

Legislativa AAS ve sportovní oblasti

Za zachování ducha fair play ve sportu začal mezi prvními bojovat Mezinárodní olympijský výbor a to již v roce 1967, kdy vydal první listinu zakázaných látek a metod dopingů ve sportu. Dnes na dodržování sportovních ustanovení daných dokumenty, jako jsou „Světový antidopingový kodex“ či „Směrnice pro kontrolu a postih dopingů ve sportu“, dohlíží na mezinárodním poli Světová antidopingová agentura (WADA, z angl. World Anti-Doping Agency), na poli tuzemském Antidopingový výbor České republiky (ADV ČR). Ty také provádí samotné antidopingové testy u sportovců. Pro ně je každoročně vydáván aktualizovaný „Seznam zakázaných látek a metod dopingů“. Anabolické steroidy na tomto seznamu figurují od roku 1975.

Plošné omezení anabolik pouze pro terapeutické užití bylo před sedmi lety začleněno i do českého trestního zákoníku. Přesto i dnes velké množství webových stránek obhazuje „bezpečné“ užívání steroidů, obsahuje mylné informace o AAS a bagatelizuje rizika jejich užívání. Mnohé z nich také nabízejí internetový prodej AAS bez lékařského předpisu.

2.3. Vedlejší účinky při užívání AAS

Nebezpečí AAS spočívá v řadě vedlejších účinků a rizik z nich plynoucích. Rizika užívání jsou závislá na věku, pohlaví, fyzických dispozicích, individuální toleranci, typu AAS, celkové dávce expozice a reverzibilitě či ireverzibilitě změn.

AAS jsou podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny IARC (z angl. International Agency for Research on Cancer) zařazeny do třídy 2A (cit.⁸). Do této kategorie patří látky pravděpodobně karcinogenní pro člověka, tzn., že epidemiologické důkazy nejsou jednoznačně průkazné, avšak karcinogenita těchto látek byla dostatečně prokázána na experimentálních zvířatech.

K nejzávažnějším vedlejším účinkům patří poruchy plodnosti, hypertenze⁹, poruchy koagulace¹⁰, poškození jater¹¹, poruchy lipidového metabolismu¹², ruptury svalů a šlach¹³.

Nadměrné dávky AAS mohou u mužů vlivem přeměny na estrogény podnítit růst prsní tkáně a vznik gynekomastie¹⁴. U žen přílišné dávky steroidů snižují endogenní tvorbu progesteronu a estrogenů, s čímž souvisí poruchy menstruačního cyklu, které mohou vyústit v neplodnost¹⁵.

Byly prováděny také studie zabývající se vlivem AAS na lidskou psychiku, přičemž byla zaznamenána souvislost mezi agresivitou, úzkostí a dlouhodobým užíváním AAS. Osoby na počátku užívání popisovaly stavy euforie a mánie, dlouhodobí uživatelé pociťovali úzkost, podrážděnost, pocity nepřátelství a tendence negativně hodnotit sami sebe i své okolí^{16,17}.

3. Doplnky stravy

Vzhledem k současnému trendu v oblasti životního stylu a masivní reklamě zaměřené na užívání široké škály preparátů „zajišťujících“ formování postavy nebo hubnutí dochází v posledních letech k značnému rozvoji obchodu s těmito produkty.

3.1. Legislativa doplňků stravy

Podle zákona o potravinách č. 456/2004 Sb. (úplné znění zákona č. 110/1997 Sb.) jsou doplňky stravy definovány jako potraviny určené k přímé spotřebě, které se odlišují od potravin pro běžnou spotřebu vysokým obsahem vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem a které byly vyrobeny za účelem doplnění běžné stravy spotřebitele na úroveň příznivě ovlivňující jeho zdravotní stav¹⁸.

Požadavky na doplňky stravy stanovuje Vyhláška č. 352/2009 Sb.¹⁹. V doplňcích stravy nesmí být přítomny anabolické látky.

Od začátku roku 2010 platí nový trestní zákoník, podle kterého spadá mezi trestné činy přechovávání, výroba, dovoz, nabízení a prodej látek s anabolickými nebo jinými hormonálními účinky za jiným než léčebným účinkem. V minulosti byly nálezy příměsí anabolických steroidů v doplňcích stravy řešeny jako správní delikt distribuce nebezpečné potraviny, avšak podle současné legislativy hrozí tomu, kdo neoprávněně distribuuje ve větším množství anabolické steroidy, odnětí svobody až na jeden rok. V České republice podléhají doplňky stravy, stejně jako potraviny, doзору Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI). Při řešení případů nálezů AAS v doplňcích stravy spolupracuje SZPI s Národní protidrogovou centrálou.

Tabulka I

Přehled zakázaných potravinových doplňků v ČR, v kterých byla Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí potvrzena přítomnost steroidních látek (sledované období 2004–2014)²⁶

Rok	Název výrobku	Zakázaná látka	Typ	Množství
2006	MULTIPOWER MUSCLE PROFESSIONAL	nandrolon, testosteron, DHEA ^a	AAS ^b	neuvedeno
	Creatine Pyruvate	19-norandrostenedion a androstandion	AAS	neuvedeno
2007	Young Star	dehydroepiandrosteron	AAS	13000 mg/kg
2008	San ATTITUDE	androstenedion a DHEA	AAS	5460 mg/kg a 630 mg/kg
2009	Animal cuts	progesteron	SH ^c	neuvedeno
2014	Tribulus Terrestris 90% saponins	1-dehydroandrostenedion	AAS	0,103 mg/kg
	Amix Per4max booster	progesteron	SH	13,8 mg/kg
	WEIDER TRIBULUS TERRESTRIS	1-dehydroandrostenedion	AAS	1,34 mg/kg
	TRIBULUS FORTE	1-dehydroandrostenedion	AAS	0,256 mg/kg
	VEMOHERB BULGARIAN TRIBULUS	1-dehydroandrostenedion	AAS	0,103 mg/kg
	COMPRESS FEVER	progesteron	SH	1,76 mg/kg
	AMIX Shake 4 Fit & Slim	progesteron	SH	4,70 mg/kg
	AMIX Anabolic Masster	progesteron	SH	3,16 mg/kg
	TRIBU	1-dehydroandrostenedion	AAS	neuvedeno
	SURVIVAL Tribulus Terrestris 90%	1-dehydroandrostenedion	AAS	0,476 mg/kg

^a Dehydroepiandrosteron, ^b anabolický androgenní steroid, ^c steroidní hormon

3.2. Otázka kontaminovaných doplňků stravy ve světě a u nás

Stále častěji je v literatuře diskutována otázka potravinových doplňků, zejména doplňků stravy, u kterých byl nalezen obsah nepovolených anabolických steroidů^{20–23}. V rámci první velké studie probíhající v letech 2001 a 2002 bylo testováno 634 doplňků stravy, které byly volně dostupné ke koupi ve 13 různých zemích. Třináct procent z těchto nehormonálních přípravků bylo kontaminováno anabolickými androgenními steroidy. Od roku 2002 byla celá řada dalších přípravků označena za nebezpečné, protože u nich byla prokázána kontaminace vysokými koncentracemi AAS např. methandienonem, stanozolem, boldenonem, testosteronem a oxandrolonem²⁴. Tyto látky samozřejmě nebyly deklarovány na etiketě výrobku a mohly způsobit nejen pozitivní dopingový test, ale především velké množství zdravotních problémů²⁵.

V ČR byl opakovaně zaznamenán výskyt doplňků stravy určených pro sportovce, které obsahovaly anabolické steroidy. SZPI se začala doplňky stravy zabývat jako samostatnou skupinou od roku 2004. Od té doby zakázala během svého šetření prodej hned několika doplňků stravy²⁶. V tab. I je přehledně zpracován seznam zakázaných výrobků doplňků stravy, ve kterých byla od roku 2004 potvrzena SZPI přítomnost AAS.

Výše uvedené výsledky zmíněných studií poukazují na nutnou obezřetnost při koupi potravinových doplňků, zejména doplňků stravy pro sportovce. Je třeba mít na paměti bezpečnost, resp. možnou nebezpečnost související s jejich užíváním.

4. Metody stanovení

Na analýzu anabolických androgenních steroidů lze obecně pohlížet dvěma způsoby. Buď z pohledu epidemiologických studií, které jsou spíše zaměřeny na analýzu konkrétní látky, nebo alespoň konkrétní skupiny látek, anebo z pohledu „screeningu“ (antidopingové kontroly, kontrola potravin), kdy je cílem identifikovat co možná nejvíce zakázaných látek ze vzorku.

Kontrola výskytu steroidů v různých biologických matricích se běžně provádí pomocí plynové chromatografie (GC) nebo kapalinové chromatografie (LC) v kombinaci s vhodným detektorem. Běžně používané UV detektory nejsou schopny splnit požadavky kladené na detekční limity metod, a proto jsou při analýzách nejčastěji používány detektory hmotnostní spektrometrie (MS), nebo tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

V posledních letech získala metoda LC-MS/MS oproti GC-MS či GC-MS/MS na popularitě. Důvodem jejího zvýšeného používání je poměrně snadná automatizace, která činí tuto metodu ideální pro rutinní diagnostiku. Další výhodou je možnost detegovat při analýze vzorků krve a moči konjugáty steroidů i nekonjugované steroidy bez předchozí derivatizace, s čímž souvisí nižší časová náročnost metody. Oproti tomu při plynové chromatografii je

derivatizace nutná²⁷. Běžně je možno dosáhnout limitu kvantifikace v řádech desítek pg ml^{-1} (cit.²⁸).

V České republice je při kontrole potravin na průkaz anabolických steroidů využívána laboratoří SZPI metoda plynové chromatografie, konkrétně dvojrozměrné plynové chromatografie²⁹.

K detekci nízkomolekulárních látek (mezi které patří AAS) lze rovněž aplikovat imunochemické metody, jako je enzymová imunoanalýza (ELISA) nebo imunochromatografie v laterálním toku na membráně (LFIA)^{30,31}. Metody pro stanovení AAS jsou založeny na specifické interakci steroid-protilátka. K jejich výhodám patří citlivost (mez detekce pro stanovení steroidů se pohybuje v rozmezí 10 až 500 pg ml^{-1}), jednoduchost, rychlost a možnost použití přímo v terénu. Tyto výhody z nich činí vhodnou screeningovou metodu. Publikována byla například imunoanalýza pro detekci anabolického steroidu nortestosteronu v doplňcích stravy³². Metoda ELISA byla využita také ve studiích pro stanovení anabolického steroidu boldenonu^{33,34}.

5. Závěr

V současné době je povoleno, aby anabolické androgenní steroidy mohly být pouze součástí léčiv, jejichž užívání je možné výhradně na lékařský předpis. Přesto jsou v ČR i v zahraničí opakovaně zaznamenávány nezákonné výskyty těchto látek v doplňcích stravy určených nejen pro sportovce. Jak bylo zmíněno v tomto přehledu, AAS jsou pro lidský organismus velmi škodlivé, a proto je potřeba tyto nebezpečné kontaminované výrobky rychle odhalit a zamezit jejich prodeji. Instituce dohlížející na zdravotní nezávadnost doplňků stravy mají k dispozici chromatografické metody, jež tyto látky spolehlivě prokáží. Požadavky na rychlou a spolehlivou detekci splňují i nově vyvíjené imunochemické metody. Tyto metody jsou mnohem méně náročné na přístrojové vybavení a kvalifikaci personálu než chromatografické. V budoucnu by je v podobě uživatelsky přívětivých testů mohly využít nejen zákonodárné instituce, ale i laická veřejnost.

Autoři děkují Grantové agentuře MV ČR za finanční podporu projektu MV0 VG20112015045.

LITERATURA

1. Yesalis C. E., Bahrke M. S.: *Sports Med.* 19, 326 (1995).
2. Fragkaki A. G., Angelis Y. S., Koupparis M., Tsantili-Kakoulidou A., Kokotos G., Georgakopoulos C.: *Steroids* 74, 172 (2009).
3. De Souza G. L., Hallak J.: *BJU Int.* 108, 1860 (2011).
4. Basaria S., Wahlstrom J. T., Dobs A. S.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5108 (2001).
5. Shahidi N. T.: *Clin. Ther.* 23, 1355 (2001).
6. Bahrke M. S., Yesalis C. E.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 614 (2004).

7. Brower, K. J.: *Current Psychiatry Reports* 4, 377 (2002).
8. Oda S. S., El-Ashmawy I. M.: *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 172 (2012).
9. Ferenchick G. S.: *N. Engl. J. Med.* 322, 476 (1990).
10. Achar S., Rostamian A., Narayan S. M.: *Am. J. Cardiol.* 106, 893 (2010).
11. Velazquez I., Alter B. P.: *Am. J. Hematol.* 77, 257 (2004).
12. Friedl K. E.: *NIDA Res. Monogr.* 102, 142 (1990).
13. Laseter J. T., Russell J. A.: *Med. Sci. Sports Exercise* 23, 1 (1991).
14. Babigian A., Silverman R. T.: *Plast. Reconstr. Surg.* 107, 240 (2001).
15. Kanayama G., Hudson J. I., Pope H. G.: *Horm. Behav.* 58, 111 (2010).
16. Oberlander J. G., Henderson L. P.: *Trends Neurosci.* 35, 382 (2012).
17. Jenssen I. H., Johannessen K. B.: *Body Image* 12, 6 (2015).
18. *Zákon o potravinách č. 456/2004 Sb.* (§ 2, odst. j). Sbírka zákonů 2004, částka 153, str. 9015.
19. *Vyhláška č. 352/2009 Sb.* Sbírka zákonů 2009, částka 110, str. 4910.
20. Martello S., Felli M., Chiarotti M.: *Food Addit. Contam.* 24, 258 (2007).
21. Petroczi A., Naughton D. P.: *J. Occup. Med. Toxicol.* (London, U. K.) 2, 1 (2007).
22. Petroczi A., Taylor G., Naughton D. P.: *Food Chem. Toxicol.* 49, 393 (2011).
23. Van Poucke C., Detavernier C., Van Cauwenberghe R., Van Peteghem C.: *Anal. Chim. Acta* 586, 35 (2007).
24. Geyer H., Parr M. K., Koehler K., Mareck U., Schanzer W., Thevis, M.: *J. Mass Spectrom.* 43, 892 (2008).
25. Geyer H., Parr M. K., Mareck U., Reinhart U., Schrader, Y., Schanzer W.: *Int. J. Sports Med.* 25, 124 (2004).
26. <http://www.szpi.gov.cz>, staženo 18.6.2015.
27. Krone N., Hughes B. A., Lavery G. G., Stewart P. M., Arlt W., Shackleton C. H.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 496 (2010).
28. Guo F., Shao J., Liu Q., Shi J. B., Jiang G. B.: *Talanta* 125, 432 (2014).
29. Stepan R., Cuhra P., Barsova S.: *Food Addit. Contam.* 25, 557 (2008).
30. Goselová S., Blažková M., Holubová B., Karamonová L., Rauch P.: *Chem. Listy* 108, 114 (2014).
31. Goselová S., Holubová B., Blažková M., Fukal L.: *Chem. Listy* 107, 875 (2013).
32. Holubová B., Goselová S., Ševčíková L., Vlach M., Blažková M., Lapčík O., Fukal L.: *Czech J. Food Sci.* 31, 514 (2013).
33. Hagedorn H. W., Schulz R., Jaeschke G.: *Biomed. Chromatogr.* 8, 63 (1994).
34. Lu H., Conneely G., Pravda M., Guilbault G. G.: *Steroids* 71, 760 (2006).

L. Fojtíková, S. Göselová, and B. Holubová
(Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague): Anabolic Androgenic Steroids – Hazard in Food Supplements

In the last decade, several immunoassays have been published as the alternative/complementary rapid methods for steroid analysis in food supplements. The present review shows a significant amount of food supplements containing banned anabolic androgenic steroids that are not declared as ingredients thus presenting risk for consumers and may lead to positive results in anti-doping controls. Traditional methods for analysis of steroids such as LC/MS and GC/MS were used for monitoring suspect food supplements.

PŘÍPRAVA POLYSACHARIDOVÝCH FILMŮ NA BÁZI CHITOSANU A CELULOSY

MARKÉTA PIŠLOVÁ, KATEŘINA KOLÁŘOVÁ,
VLADIMÍRA VOSMANSKÁ, ONDŘEJ KVÍTEK
a VÁCLAV ŠVORČÍK

*Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
kolarova@vscht.cz*

Došlo 19.5.15, přijato 19.8.15.

Klíčová slova: chitosan, mikrokrytalická celuloza, stříbro,
příprava a charakterizace filmů

Úvod

Polymerní materiály bývají často používány k biomedicinským účelům. Mezi jejich hlavní výhody patří cenová dostupnost, snadná příprava a také dobré mechanické vlastnosti. Biologické vlastnosti lze zlepšit fyzikální nebo chemickou modifikací jejich povrchu. Pro tkáňové inženýrství je u polymerů nezbytné zejména zvýšit adhezi, růst a homogenitu pokryvu buněk na povrchu polymeru¹.

Používání přírodních polymerů jako biomateriálů je známo už tisíce let. Přírodní polymery vznikají v rostlinných i v živočišných organismech složitými biochemickými procesy. Výhodou přírodních polymerů je jejich složení, které je velmi podobné a v některých případech se může dokonce i shodovat s tkáněmi lidského organismu. Právě proto je organismus připraven je rozpoznat a metabolicky zpracovat. Problémy s toxicitou a zánětlivými reakcemi bývají u těchto materiálů minimalizovány, anebo úplně potlačeny².

Mezi přírodní polysacharidy patří chitosan, který se získává alkalickou deacetylací chitinu³. Chitosan je druhým nejrozšířenějším polysacharidem na Zemi hned po celuloze⁴. Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Své uplatnění našel v různých oborech. Používá se v medicíně, kosmetice, agrochemii, při čištění vody a impregnaci látek. Ve farmacii jej lze použít jako systém pro řízené uvolňování léčiva^{3,5}. Dále je oblíben také pro své antibakteriální účinky vůči mnoha kmenům gram pozitivních i gram negativních bakterií⁶. Antibakteriální účinky chitosanu lze významně zvýšit přidáním stříbrných iontů. Právě chitosanem stabilizované stříbrné nanočástice vykazují velmi slibné antibakteriální vlastnosti^{7,8}. Je známo, že chitosan je špatně rozpustný ve vodě a v „běžných“ organických rozpouštědlech⁹. V kyselém prostředí dochází k protonaci aminoskupin a chitosan se stává rozpustným. Mezi nejčastěji používané roztoky, ve kterých se chitosan rozpouští,

patří např. vodné roztoky kyseliny octové, citronové, mra-
venčí, glutamové či chlorovodíkové¹⁰.

Celuloza patří mezi nejrozšířenější polysacharidy na Zemi. Díky hojnému výskytu představuje celuloza snadno dostupný přírodní polymer. Jedná se dokonce o nejrozšířenější organickou sloučeninu na Zemi. Ročně jí biosyntesou vzniká asi 10^{11} tun (cit.⁶). Je proto logické, že výzkumu struktury, výroby, vlastností i použití celulosy bylo a je věnováno mnoho rozsáhlých prací¹¹. Uplatnění celulosy nacházíme např. v zemědělství, potravinářském, textilním a také v papírenském průmyslu. Své využití našla celuloza rovněž při čištění vody. Polymery na bázi celulosy se často aplikují i ve tkáňovém inženýrství a ve farmacii, kde se používají jako nosič pro kontrolovaný transport léčiv v těle. V medicíně se uplatňují např. jako čističe krve, obvazové materiály a také při ztrátách kožního krytu (např. popáleniny), kdy se využívá toho, že se v přítomnosti derivátů celulosy nevytváří izolovaná vrstva a kůže se rychleji uzdravuje¹².

Tato práce se věnuje metodice přípravy kompozitních filmů na bázi chitosan/celuloza. Dále tyto chitosan/celulosevé filmy byly dotovány dusičnanem stříbrným. Byl studován vliv přídavku polyethylenglykolu (o různých relativních molekulových hmotnostech) na změnu materiálových vlastností chitosanu a tvorbu stříbrných nanočástic. Byla studována absorpce vody (gravimetricky) a povrchová smáčivost připravených filmů a hodnoty jejich kontaktních úhlů (goniometricky), jejich povrchová morfologie (konfokální mikroskopie) a množství Ag nanočástic (UV-Vis spektroskopie).

Experimentální část

Používané materiály

V práci byly použity následující chemikálie: chitosan ve formě prášku (Sigma-Aldrich, Německo), mikrokrytalická celuloza (Modernist Pantry, USA), polyethylenglykol (PEG) o molární hmotnosti 400 (Sigma-Aldrich, Švýcarsko) a 20 000 (Merck, Německo) g mol^{-1} , dusičnan stříbrný (Lachema, Česká republika), kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika) a destilovaná voda.

Příprava dotovaných filmů chitosanu

Pro přípravu filmů byl připraven 0,5% roztok chitosanu. Chitosanový prášek byl dispergován v destilované vodě s přídavkem kyseliny octové (do finální koncentrace 0,2 hm.%). Míchání bylo prováděno při teplotě 60 °C do úplného rozpuštění chitosanu. Při přípravě dotovaných filmů byl v dalším kroku do roztoku chitosanu přidán AgNO_3 do finální koncentrace 0,01 mol l^{-1} . Tento roztok byl míchán při teplotě 95 °C do změny barvy. Barva roztoku se mění za zvýšené teploty z bezbarvého na žlutý až okrový, což názorně indikuje redukci stříbrných iontů na nanočástice stříbra¹³. Do roztoku byla přisypána mikrokrytalická celuloza tak, aby výsledný hmotnostní poměr chitosan/celuloza byl 1:1. Roztok se míchal při stejných

podmínkách po dobu 1 hodiny. Takto připravený roztok se dávkoval do silikonových forem o průměru 5 cm (10 ml na jednu jamku). Vzorky byly sušeny při teplotě 60 °C po dobu 16 hodin. Dále byl při přípravě měkčených filmů použit polyethylenglykol (PEG, molární hmotnost 400 a 20 000 g mol⁻¹, PEG 400 a PEG 20 000) v hmot. poměru 1:2 (PEG/chitosan). PEG 400 popř. 20 000 byl přidán do roztoku chitosanu před začátkem míchání.

Analýza vzorků

Kontaktní úhel na povrchu připravených chitosanových filmů byl sledován na přístroji See System (Surface Energy Evaluation System, Advex Instruments, Brno). Testovací kapalinou byla voda při laboratorní teplotě a objemu kapky 8 µl. Kontaktní úhel byl sledován a vyhodnocen do ca 5 s po nanesení vody na povrch¹⁴. Kvůli statistice měření bylo sledováno 10 vzorků.

Absorpce vody chitosanovými filmy byla sledována „standardním“ postupem¹⁵, a vypočítána jako rozdíl hmotností nasáklého a suchého vzorku vztažený na hmotnost suchého vzorku. Vzorek byl po zvážení ponořen na 1 min do kádinky s vodou. Poté byl vzorek vyjmut a ponechán po dobu 1 min ve svislé poloze okapat a poté opět zvážen. Kvůli statistice měření bylo váženo 10 vzorků.

Na konfokálním mikroskopu Lext OLS3100 (Olympus, Německo) byly získány 3D snímky povrchu jednotlivých náhodně vybraných filmů v konfokálním intenzitním módu. Jako zdroj záření byla využita polovodičová laserová dioda s vlnovou délkou 408 nm. Celkové zvětšení optické soustavy v této konfiguraci dosahovalo hodnoty 1200.

UV-Vis spektra byla sledována na spektrometru LAMBDA 25 (PerkinElmer, USA). Spektra byla měřena v roztoku chitosanových filmů v acetátovém pufru (pH 4,65, Fluka, Švýcarsko) ve vlnovém rozsahu 300–700 nm při rychlosti 240 nm min⁻¹ s krokem 1 nm.

Výsledky a diskuse

Mezi důležité vlastnosti filmů určených ke kontaktu s živou tkání patří absorpce exudátu. V současné době se využívají na hojení ran prostředky, které dokážou upravovat a udržovat vlhkost v prostředí rány a zároveň absorbo-

vat sekret z ran¹⁶. Hodnoty kontaktního úhlu určují smáčivost povrchu a tím i schopnost materiálu velmi dobře přilnout k ráně.

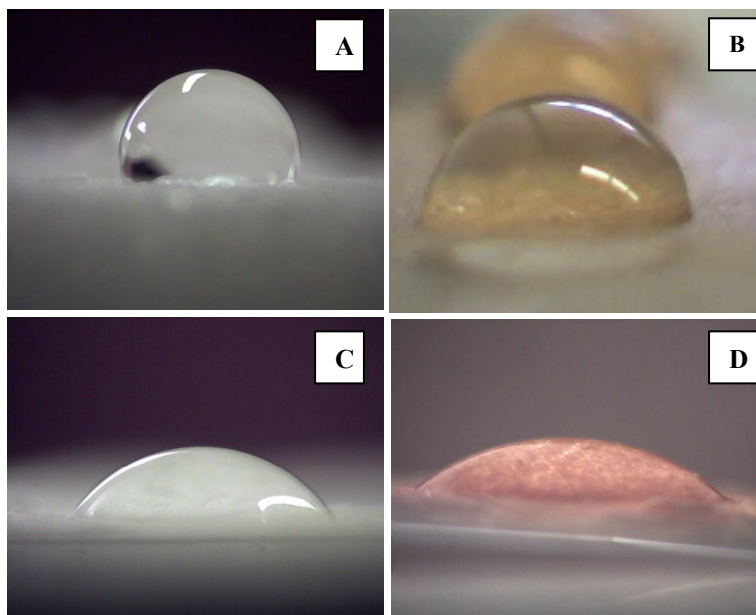
Výsledky měření absorpce vody a kontaktního úhlu jsou uvedeny v tab. I. Je zřejmé, že polyethylenglykol významně mění materiálové vlastnosti připravených filmů. Vzorky s přísadkou PEG 400 i PEG 20 000 vykazují nižší absorpci i nižší hodnoty kontaktního úhlu. To znamená, že po přidání PEG dochází ke snížení absorpce a zároveň ke zvýšení smáčivosti povrchu. Vliv na hodnoty absorpce vody i kontaktního úhlu má také složení studovaných filmů. Vzorky připravené na bázi chitosan/celulosa mají vyšší hodnoty absorpce vody i kontaktního úhlu ve srovnání se vzorky, které jsou navíc dotované stříbrem. Obr. 1 názorně dokumentuje tvar kapky na povrchu vybraných filmů zachycený kamerou při měření kontaktního úhlu a tím doplňuje výsledky uvedené v tab. I.

Povrchová morfologie byla studována konfokálním laserovým rastrovacím mikroskopem. Snímky jsou uvedeny na obr. 2. Relativně vysoká drsnost povrchu vzorku chitosan/celulosa významně klesá po přísadce PEG i stříbrných nanočástic. Přídavné látky tak zřejmě způsobují změnu viskozity a tokových vlastností roztoku chitosanu před jeho vysoušením a při něm. V případě vzorků se stříbrnými nanočásticemi jsou na povrchu patrné „roztroušené“ drobné nerovnosti, pravděpodobně způsobené shluky Ag nanočástic. Zejména u snímku vzorku chitosan/celulosa/PEG20 000 vystupují z povrchu sférické útvary, které lze přisoudit krystalitům PEG.

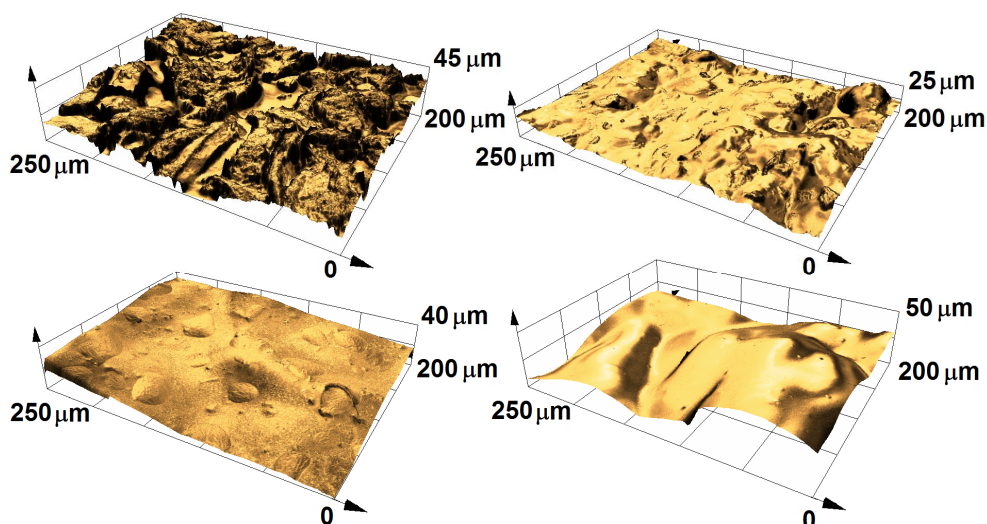
Metodou UV-Vis spektroskopie byla studována přítomnost stříbrných nanočástic v roztocích acetátového pufru, ve kterém byly rozpuštěny jednotlivé typy dotovaných filmů. Po rozpuštění měly roztoky světla žluté až oranžové zbarvení, což souvisí s koncentrací stříbrných nanočástic v roztoku. Právě toto zbarvení způsobené absorpcí při vlnové délce cca 400 nm je charakteristické pro přítomnost stříbrných nanočástic¹⁷. Stabilitu roztoků obsahujících nanočástice může ovlivnit řada vlivů, např. působení světla, stálost pH, teplota. Nejsilnější absorpci vykazuje při vlnové délce cca 400 nm vzorek chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag, který současně obsahuje nejvíce stříbrných nanočástic. Je známo, že vlnová délka maxima absorpce u kovy dotovaných filmů závisí také na jejich velikosti, tvaru a aglomeraci nanočástic¹⁷. Maximum ab-

Tabulka I
Absorpce vody a hodnoty kontaktního úhlu studovaných filmů

Vzorek	Absorpce vody [bezrozm. veličina]	Kontaktní úhel [°]
Chitosan-celulosa	9,2 ± 1,8	94 ± 5
Chitosan-celulosa-PEG 400	7,3 ± 1,7	64 ± 6
Chitosan-celulosa-PEG 20 000	6,5 ± 1,1	60 ± 7
Chitosan-celulosa-Ag	8,6 ± 0,9	82 ± 2
Chitosan-celulosa-PEG 400-Ag	5,1 ± 1,5	48 ± 9
Chitosan-celulosa-PEG 20 000-Ag	4,7 ± 1,4	35 ± 8



Obr. 1. Goniometrická měření kontaktního úhlu na povrchu studovaných filmů: (A) chitosan/celulosa, (B) chitosan/celulosa/Ag, (C) chitosan/celulosa/PEG a (D) chitosan/celulosa/PEG/Ag

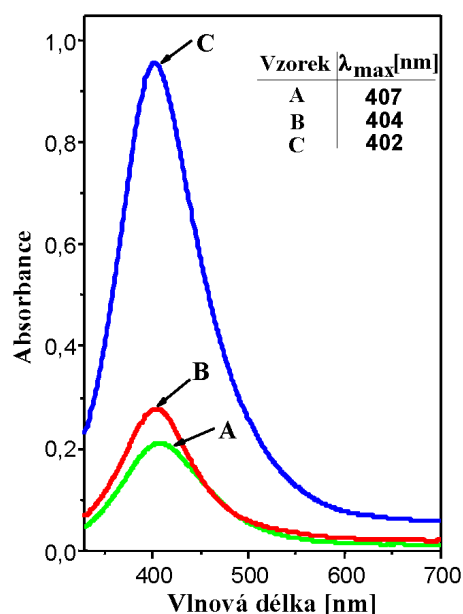


Obr. 2. 3D snímky povrchu filmů získané pomocí konfokálního mikroskopu: (A) chitosan/celulosa, (B) chitosan/celulosa/Ag, (C) chitosan/celulosa/PEG a (D) chitosan/celulosa/PEG/Ag

sorpce na nižší vlnové délce naznačuje, že v roztoku se nacházejí menší nanostruktury. Šířka pásu absorpčního maxima souvisí s distribucí velikosti kovových nanočástic. Pro absorpční pás při vlnové délce 405 nm udávají Huang a spol.¹⁸ velikost nanočástic pod 70 nm. Na základě výsledků uvedených na obr. 3 lze předpokládat, že připravené roztoky obsahovaly stříbrné nanočástice o velikosti v řádu desítek nanometrů. Dále je patrné, že nejmenší částice byly detegovány u vzorku chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag.

Závěr

Bylo připraveno 6 typů kompozitních filmů na bázi chitosan/celulosa. Porovnáním materiálových vlastností bylo zjištěno, že přidavkem polyethylenglykolu se mění absorpce vody i smáčivost připravených filmů. Filmy, které obsahovaly PEG, vykazovaly lepší smáčivost povrchu a nižší absorpci vody. Přídavek PEG také měnil povrchovou morfologii připravených vzorků, kdy dochází ke snížení povrchové drsnosti. Nižší absorpci vody a lepší



Obr. 3. UV-Vis spektra chitosanových filmů rozpuštěných v acetátovém pufru: (A) chitosan/celulosa/Ag, (B) chitosan/celulosa/PEG400/Ag a (C) chitosan/celulosa/PEG20 000/Ag. Tabulka vložená do obr. 3 udává vlnovou délku, při které byla stanovena maximální absorbance vzorků A-C

smáčivost vykazovaly i vzorky s přidavkem AgNO_3 . Přídavek PEG a jeho molekulová hmotnost ovlivňuje i velikost a koncentraci stříbrných nanočástic v roztoku po rozpuštění dotovaných filmů. Vzorky s PEG obsahovaly vyšší koncentraci a menší nanočástice stříbra. Tyto výsledky naznačují, že u tohoto typu filmů by bylo vhodné následně studovat jejich antibakteriální vlastnosti s cílem přípravy nového typu materiálu pro krytí poškozeného kožního krytu.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR v projektu P108/12/G108.

LITERATURA

1. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: *Chem. Listy* 106, 875 (2012).
2. Vavříková E., Vinšová J.: *Chem. Listy* 103, 56 (2009).
3. Rinaudo M.: *Prog. Polym. Sci.* 31, 603 (2006).
4. Zhao H., Xu J., Lan W., Wang T., Luo G.: *Chem. Eng. J.* 229, 1358 (2013).
5. Saini R. K., Srivastava A. K., Gupta P. K., Das K.: *Chem. Phys. Lett.* 511, 326 (2011).
6. Kodíček M.: *Biochemické pojmy - výkladový slovník*.

VŠCHT Praha, Praha 2004.

7. Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Ulbrich P., Švorčík V.: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v tisku.
8. Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Kolská Z., Švorčík V.: *RSC Adv.* 5, 17690 (2015).
9. Kim K. M., Son J., Kim S. K., Weller C. L., Hanna M. A.: *J. Food Sci.* 71, E119 (2006).
10. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M.: *J. Controlled Release* 100, 5 (2004).
11. Novotná K., Havelka P., Sopuch T., Kolářová K., Vosmanská V., Lisá V., Švorčík V., Bačáková L.: *Cellulose* 20, 2263 (2013).
12. Fu L., Zhang J., Yang G.: *Carbohydr. Polym.* 92, 1432 (2013).
13. Regiel A., Irusta S., Kyzioł A., Arruebo M., Santamaria J.: *Nanotechnol.* 24, 15101 (2013).
14. Švorčík V., Hubáček T., Slepíčka P., Siegel J., Kolská Z., Bláhová O., Macková A., Hnatowicz V.: *Carbon* 47, 1770 (2009).
15. Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Švorčík V.: *Cellulose* 21, 2445 (2014).
16. Sopuch T., Drahovzalová V., Rýdl J., Bureš I., Miličkovský M., Vyřasová J., Mořková P., Švorčík V., Podlaha J., Horáková M., Masteiková R., Vinklárková L., Suchý P.: *Hojení ran* 2, 14 (2013).
17. Siegel J., Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Leitner J., Švorčík V.: *Mater. Lett.* 113, 59 (2013).
18. Huang T., Xu X.-H. N.: *J. Mater. Chem.* 20, 9867 (2010).

M. Pišlová, K. Kolářová, V. Vosmanská, O. Kvítek, and V. Švorčík (*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Preparation of Polysaccharide Films Based on Chitosan and Cellulose**

Preparation of composite films based on chitosan – cellulose mixtures, with or without added AgNO_3 , was studied. The influence of addition of poly(ethylene glycol) (PEG) on the material properties and formation of Ag nanoparticles also investigated. Wettability, water absorption and surface morphology of the films were evaluated. UV-Vis absorption spectra were measured for AgNO_3 -containing composites after dissolution in acetate buffer. Absorbance maxima at 400 nm confirmed the presence of Ag nanoparticles. Addition of PEG to the polymer mixtures decreased water absorption, increased wettability and considerably changed the surface morphology of the films. PEG addition also leads to increased concentrations of Ag nanoparticles in the polymers after their dissolution. The nanoparticle size is influenced as well. It is apparent that PEG can noticeably alter material properties of chitosan – cellulose composites.

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Abdulmanea, Khaled Saleh Omar	34
Bezáková, Lýdia	27
Bielečková, Silvia	211
Blažeková, Lenka	211
Bolechová, Martina	181
Brůčková, Lenka	82
Cahlíková, Lucie	17, 82, 149, 237
Cejpek, Karel	129
Cvačka, Josef	90
Čáslavský, Josef	181
Čeřovský, Václav	111
Čopíková, Jana	11, 17, 22, 34, 96, 149, 201
Dalecká, Markéta	82
Dokupilová, Ivana	247
Doležilková, Ivana	1
Dolinská, Silvia	90
Dostálek, Pavel	44, 61, 196
Drašar, Pavel	11, 17, 22, 34, 96, 149, 201, 237
Drozd, Josef	53
Drozdíková, Eva	205
Drtinová, Lucie	57
Dvořáková, Marcela	74, 229
Endlová, Lenka	175
Fojtíková, Lucie	251
Göselová, Sandra	251
Havelek, Radim	82
Hlásniková, Jarmila	189
Hoffman, Peter	27
Holková, Ivana	27
Holubová, Barbora	251
Horváthová, Viera	211
Hošťálková, Anna	237
Hredzák, Slavomír	90
Hudcová, Tereza	44, 61, 196
Chlebek, Jakub	237
Chodounská, Hana	125
Jelínek, Lukáš	44, 61, 196
Jurášek, Michal	139
Karabín, Marcel	44, 61, 196
Kasal, Alexander	125
Kašparovský, Tomáš	160
Kinčl, Tomáš	61
Klaudiny, Jaroslav	222
Klejduš, Bořivoj	66
Kolářová, Kateřina	256
Kotlíková, Blanka	61
Kráčmar, Stanislav	66
Královec, Karel	82
Kubán, Vlastimil	66
Kučerová, Viera	154
Kvítek, Ondřej	256
Lapčík, Oldřich	11, 17, 22, 34, 96, 149, 201
Laryšová, Aneta	175
Liptaj, Tibor	53
Lochman, Jan	160
Loušová, Ivana	218
Lovás, Michal	90
Luhová, Lenka	160
Macek, Tomáš	1, 39
Macková, Martina	1, 39
Mácová, Daniela	181
Maletínská, Lenka	121
Marko, Andrea	167
Moravcová, Jitka	11, 17, 22, 34, 96, 149, 201
Moricová, Pavla	160

Mučaji, Pavel	53
Musilová, Lucie	39
Nagelová, Veronika	121
Nagy, Milan	53
Navrátilová, Zuzana	175
Obernauerová, Margita	205
Obložinský, Marek	27
Opletal, Lubomír	11, 17, 22, 34, 96, 149, 201, 237
Pekárová, Mária	27
Petřivalský, Marek	160
Pišlová, Markéta	256
Pohanka, Miroslav	57
Příbylová, Marie	74
Rácová, Zuzana	218
Rakická, Milada	167
Sák, Martin	247
Seilerová, Lenka	104
Sekretár, Stanislav	189
Schmidt, Štefan	189
Siatka, Tomáš	237
Skoupá, Hana	196
Smrčková, Petra	104
Šajbidor, Ján	247
Šárka, Evžen	104
Šedivá, Mária	222
Šeršeň, František	53
Šivel, Miroslav	66
Štujber, Michal	53
Šturdík, Ernest	167
Švajdlenka, Emil	53
Švorčík, Václav	256
Taggart, Mark	181
Tmáková, Lenka	189
Tomanová, Pavla	139
Turčániová, Ľudmila	90
Uhlík, Ondřej	39
Vaněk, Tomáš	74, 229
Vávrová, Milada	181
Vosmanská, Vladimíra	256
Vrbíková, Lenka	189
Vrbovský, Viktor	175
Vrkoslav, Vladimír	90
Výbohová, Eva	154
Wasserbauer, Richard	218
Wimmer, Zdeněk	17, 34, 96, 149, 201
Zubrik, Anton	90
Železná, Blanka	121



Foto: zedněk Putz

