

**Edice
Chemické
Lístky**



Michal JURÁŠEK a Pavel DRAŠAR,

autoři a editoři,

sborníku

ORAGANICKÉ

PŘÍRODNÍ LÁTKY

v zrcadle časopisu

CHEMICKÉ LISTY

2016-2000

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, 2016-2020

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

Seznam autorů jednotlivých příspěvků je uveden na str. 181.

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 181, ediční číslo 12568-2026-02.

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

ISBN elektronické verze (formát PDF) 978-80-88307-32-7

ISBN 80-88307-32-7



<i>CORDYCEPS SINENSIS</i> : LIEČIVÁ HUBA ČÍNSKEJ MEDICÍNY Lucia Ungvarská Maľučká, Zdenka Bedlovičová, Jarmila Harvanová	1
MODERNÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUROVIN ZE ZPRACOVÁNÍ VINNÝCH HROZNŮ Petr Cviner, Karolína Pádrová, Irena Kolouchová	7
NOVÉ PSYCHOAKTIVNÍ LÁTKY Lucie Fojtíková, Barbora Holubová, Martin Kuchař	13
INTERAKCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN A PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ Šárka Horáčková, Andrea Mühlhansová, Milada Plocková	18
EXTRAKTY AKO MODERNÁ LIEKOVÁ FORMA PRE PRÍRODNÉ LIEČIVÁ Slavomír Kurhajec, Dana Sabadková, Aleš Franc, David Vetchý	23
VYUŽITIE OTRÚB Z RÔZNYCH ODRÔD PŠENICE PRI VÝROBE PEKÁRSKÝCH VÝROBKOV Michaela Lauková, Jolana Karovičová, Zlatica Kohajdová, Mária Babulicová	30
ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – ŠTRUKTÚRA, POLOHOVÁ ŠPECIFITA IZOENZÝMOV LIPOXYGENÁZ A ICH VÝZNAM Lýdia Bezáková, Ivana Holková, Andrea Balažová, Marek Obložinský, Peter Mikuš	35
ANTINUTRIČNÉ LÁTKY V STRUKOVINÁCH Judit Süli, Anna Sobeková, Zuzana Bujdošová	43
VÝZKUM FUNKČNÍCH SLOŽEK KUKUŘIČNÉHO HEDVÁBÍ Peng Li, Lubomír Lapčík	52
KORTIKOTROPIN ÚVOLŇUJÍCÍ HORMON, OD CHEMIE K LIGANDŮM A JEJICH MOŽNÉMU TERAPEUTICKÉMU VYUŽITÍ Věra Klenerová, Ivana Kramáriková, Pavel Šída, Jana Šípková, Sixtus Hynie	57
NAJVÝZNAMNEJŠIE MYKOTOXÍNY RODU <i>FUSARIUM</i> Michaela Harčárová, Eva Čonková, Zuzana Sihelská, Ema Böhmová, Katarína Goldírová	64
POLYSACHARIDY JAKO STAVEBNÍ BLOKY HYBRIDNÍCH KOPOLYMERŮ Lenka Loukotová, Martin Hrubý	70
TERMOPLASTIFIKOVANÝ ŠKROB A JEHO APLIKACE Sabina Krejčíková, Aleksandra Ostafinska, Miroslav Šlouf	80
EXOPOLYSACHARIDY AKO VÝZNAMNÉ PRODUKTY PROBIOTÍK Monika Fedorová, Marián Prokeš, Juraj Pistl, Radomíra Nemcová	87
ŽLUČOVÉ KYSELINY – MALÉ MOLEKULY VELKÝCH MOŽNOSTÍ Marek Vecka, Aleš Žák, Barbora Staňková, Štěpánka Fojtíková, Petra Tomášová, Simona Kutová	94
KYSELINA MLÉČNÁ JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA A JEJÍ PREVENTIVNÍ A TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL Jaroslav Zelenka	102
SLINNÉ PEPTIDY A PROTEINY, JEJICH STRUKTURA A VÝZNAM V ÚSTNÍ DUTINĚ Lenka Fialová	109
ENDOFYTY IZOLOVANÉ Z RÉVY VINNÉ (<i>Vitis vinifera</i>) Adéla Marková, Lucia Gharwalová, Maria Vrublevskaia, Irena Kolouchová	117
OXYTOCIN A DALŠÍ PEPTIDOVÁ UTEROTONIKA: JEJICH PRAŽSKÉ OSUDY Vladimír Pliska, Antonín Pařízek, Martin Flegel	123
PROLYLOLIGOPEPTIDASA VE FYZIOLOGII A PATOLOGII Pavla Fajtová, Martin Horn	134
ANALÝZA OBSAHU ANTOKYÁNOV V BOBULIACH <i>Vaccinium corymbosum</i> , <i>Vitis vinifera</i> A <i>Aronia melanocarpa</i> Z VÝCHODNÉHO SLOVENSKA Ondrej Ragač, Janka Poráčová, Janka Vašková, Marta Mydlárová Blaščáková, Vincenzo De Feo	140
DLOUHODOBÁ STABILITA ALKALOIDŮ V PEVNÝCH LÉKOVÝCH FORMÁCH Karel Nesměrák, Karel Kudláček, Petr Kozlík, Martin Štícha, Pavla Vašíčková, Jan Babica	147
ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – POLYFENOLY, AKO POTENCIÁLNE INHIBÍTORY LIPOXYGENÁZ Lýdia Bezáková, Andrea Balažová, Ivana Holková, Marek Obložinský, Katarína Bauerová, Peter Mikuš	153
VYUŽITÍ KOFEINU JAKO AKTIVNÍ SLOŽKY NÁTĚROVÝCH BIOCIDNÍCH SYSTÉMŮ Klára Kobetičová	160
PROTINÁDOROVÉ A ANTI-HIV DERIVÁTY BETULINOVÉ KYSELINY David Kodr, Michaela Rumlová, Tomáš Zimmermann, Petr Džubák, Pavel Drašar, Michal Jurášek	164
VITELLOGENIN – BIOMARKER ENDOKRINNÍ DISRUPCE U RYB Zuzana Koutková, Jana Blahová, Zdeňka Svobodová	174
REJSTŘÍK AUTORŮ	181

CORDYCEPS SINENSIS: LIEČIVÁ HUBA ČÍNSKEJ MEDICÍNY**LUCIA UNGVARSKÁ MALUČKÁ, ZDENKA
BEDLOVIČOVÁ a JARMILA HARVANOVÁ**

Ústav farmaceutickej chémie, Katedra chémie, biochémie
a biofyziky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie
v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

Došlo 7.7.16, prijaté 10.11.16

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

Klíčové slová: *Cordyceps sinensis*; biologický účinok;
polysacharidy, nukleozidy, aminokyseliny, steroly

Obsah

1. Úvod
2. Chemická štruktúra biologicky zaujímavých látok a ich vplyv na ľudský organizmus
 - 2.1. Polysacharidy
 - 2.2. Nukleozidy
 - 2.3. Aminokyseliny a peptidy
 - 2.4. Alkoholy a polyoly
 - 2.5. Steroly
 - 2.6. Iné látky
3. Záver

1. Úvod

Druhy rodu *Cordyceps* (Fr.) Link sú huby, ktoré žijú na larvách, kuklách a imágach hmyzu, resp. na plodniciach hľuzoviek rodu *Elaphomyces*¹. Západná civilizácia spoznáva tieto huby len posledných 30 rokov, počas ktorých objavuje stále viac vedeckých dôkazov o možnostiach ich využitia v medicíne, ktoré sú v rámci tradičnej čínskej medicíny využívané už po stáročia². Názov *Cordyceps* pochádza z latinských slov *cord* (palica, kyjak) a *ceps* (hlava). Názov popisuje nezvyčajný spôsob rastu plodnice huby – z hlavy uhynutej larvy hmyzu, najmä himalájskeho nočného motýľa *Hepialis armoricanus* Oberthur (Lepidoptera). Jej tvar a význam dal aj základ slovenskému názvu tejto huby – žezlovka.

Najznámejším zástupcom tohto rodu je druh *Cordyceps sinensis* (CS, obr. 1) známy nielen z tradičnej čínskej medicíny, ale aj z najnovších výskumov v rámci objavova-

Obr. 1. *Cordyceps sinensis*: prirodzený výskyt v prírode

nia liečivých vlastností týchto húb. Prirodzene sa vyskytuje najmä na náhornej plošine Himalájí v nadmorskej výške od 3000 do 5500 metrov. Veľmi náročný spôsob zberu a významné liečivé schopnosti spôsobili, že huba mala vždy veľmi vysokú cenu a tak ju spočiatku mali právo využívať len na čínskom cisárskom dvore. Hoci liečivé vlastnosti žezlovky boli v Číne a iných krajinách Orientu známe už v staroveku, v Európe bola prvýkrát predstavená až v roku 1726. Žezlovky sa tradične využívajú na liečbu širokého spektra ľudských chorôb. Prví západní pozorovatelia písali, že CS má podobné vlastnosti ako ženšen, používali sa po vyčerpanosti a dlhodobej chorobe³. Tradične sa tiež využívali pri impotencii, neurasténii, bolesti chrbta⁴ a ako antidótum pri otrave opiom a odvykaní od ópia⁵.

V rámci tradičnej čínskej medicíny sa *Cordyceps* používal pri dýchacích ťažkostiach, chorobách obličiek, pečene a srdcovocievnych problémoch, hyposexualite, hyperlipidémii, pri oslabení imunitného systému. V súčasnosti aj ako doplnok pri moderných spôsoboch liečby rakoviny (chemoterapii, ožarovaní a po operáciách)⁶. Moderná veda potvrdila účinnosť liečby hubou *Cordyceps* vo väčšine používaných postupov z tradičnej medicíny⁷.

Moderné farmaceutické štúdie ukazujú, že *Cordyceps* má skutočne priaznivý účinok na niekoľko biologických systémov, napr. imunitný systém, kardiovaskulárny, respiračný, žľazový⁸. V mnohých vedeckých prácach je opísané klinické využitie tejto parazitujúcej huby^{9,10} s následným biologickým a farmakologickým účinkom⁵.

2. Chemická štruktúra biologicky zaujímavých látok a ich vplyv na ľudský organizmus

2.1 Polysacharidy

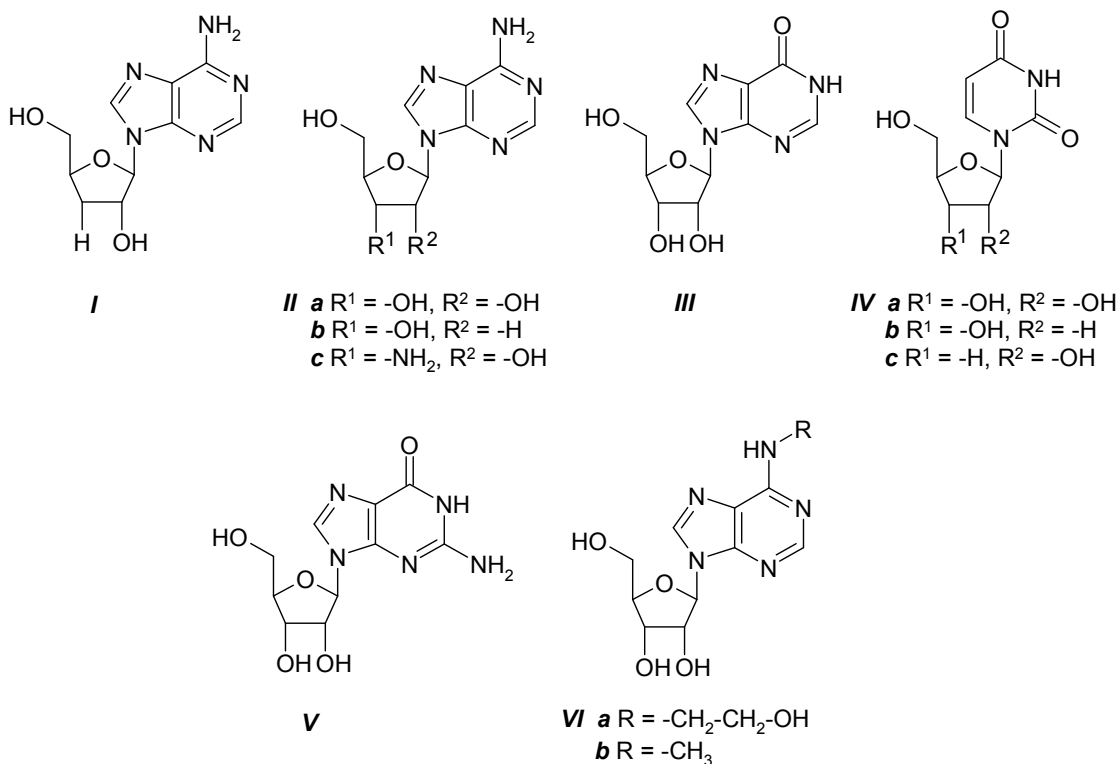
Cordyceps obsahuje veľké množstvo polysacharidov (približne 3–8 % z celkovej hmotnosti)¹¹. Polysacharidy predstavujú jednu z hlavných skupín chemických látok, u ktorých bol dokázaný výrazný imunostimulačný, hypoglykemický a antitumorový účinok. Mnohé štúdie preukázali, že farmakologická aktivita polysacharidov koreluje s ich molekulovou hmotnosťou. Napríklad polyglukány s molekulovou hmotnosťou 10–1000 kDa sú lepšie rozpustné vo vodnom prostredí a vyznačujú sa lepším antitumorovým účinkom¹². Z chemického hľadiska ide o štruktúrne odlišné polyméry D-glukopyranózy (D-Glcp). Na základe anomérnych štruktúr D-Glcp jednotiek sa delia do troch hlavných skupín: α -D-glukány, β -D-glukány a zmiešané α,β -D-glukány. Ďalšie delenie je podľa polohy glykozidickej väzby, resp. podľa molekulovej hmotnosti; napr. lineárne alebo rozvetvené glukány (1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 4)-, (1 $\rightarrow$ 6)-s vysokou, strednou alebo nízkou molekulovou hmotnosťou¹³. Zo surového materiálu CS sa podarilo izolovať niekoľko desiatok polysacharidov, v ktorých ako základné monosachridové jednotky boli najčastejšie identifikované glukóza, manóza, galaktóza a xylóza.

Štruktúra polysacharidu CPS-2 izolovaného extrakciou z vody bola určená na základe FTIR a NMR spektroskopie. Zistilo sa, že glukán CPS-2 je z väčšej časti tvorený α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukózou a α -(1 $\rightarrow$ 3)-D-manózou, ktoré sú rozvetvené cez α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukózu na každom dvadástom fragmente lineárneho reťazca. Ochranný efekt CPS-2 polysacharidu bol študovaný na modely buniek chronického obličkového ochorenia. Ako sa ukázalo, polysacharid významne pozitívne stimuloval renálne bunky obličiek a prispieval tak k ich zníženému poškodzovaniu¹⁴.

Heteropolysacharid označovaný ako PS-A, ktorý pozostáva z D-glukózy, D-galaktózy a D-manózy v pomere 2:1:1 s molekulovou hmotnosťou 460 kDa sa vyznačuje silnou inhibičnou aktivitou proti cholesterolesteráze a je potenciálnym glukánom kontrolujúcim hypercholesterolémiu. Polysacharid označovaný IPS s molekulovou hmotnosťou 8,1–460 kDa sa vyznačuje protizápalovým, imuno-modulačným a hypoglykemickým účinkom. U tohto glukánu bola zistená aj schopnosť znižovať hladinu cholesterolu¹⁵.

2.2. Nukleozidy

Nukleozidy sa považujú za jedny z kľúčových biologicky aktívnych zlúčenín, ktorých obsah zodpovedá za určovanie kvality druhov *Cordyceps*. Vo všeobecnosti je



Obr. 2. Chemická štruktúra nukleozidov I–VI

zastúpenie týchto chemických látok vyššie u kultivovaných v porovnaní s prírodne sa vyskytujúcimi druhmi. Ich hlavný biologický účinok spočíva v ich výraznej antitumorovej aktivite. Za hlavných ukazovateľov kontroly kvality týchto húb sú zodpovedné dva typy nukleozidov: kordycepín **I** a adenosín **IIa** (obr. 2). Viac ako 10 nukleozidov a im príbuzných derivátov bolo izolovaných z CS, napr. inozín **III**, uridín **IVa**, guanozín **V**, *N*⁶-(2-hydroxyetyl)-adenosín **VIa** (obr. 2)¹⁶.

Kordycepín, 3-deoxyadenosín **I** je derivátom adenosínu **IIa**, ktorý na rozdiel od tohto nukleozidu **IIa** neobsahuje v polohe 3 sacharidovej jednotky hydroxyskupinu. Na základe tejto analógie niektoré enzýmy nedokážu rozpoznať – odlišiť tieto dva nukleozidy a môžu kordycepín **I** zabudovať do štruktúry RNA, čo spôsobí ukončenie syntézy tejto kyseliny. Z tohto dôvodu je kordycepín **I** zaradený do triedy chemických zlúčenín, ktoré majú antitumorový účinok. Okrem iného inhibuje rast *Clostridium paraputrificum* a *Clostridium perfringens*, ale nevlýva na *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp.¹⁷. Objavujú sa aj štúdie, kde je opísaný nový účinok tejto látky **I** v prevencii vzniku trombov¹⁸. V roku 2004 Yoshikawa zistil, že kordycepín **I** inhibuje rast myšacieho melanómu B16 (cit.¹⁹). Nukleozidy sú zodpovedné aj za reguláciu a moduláciu rozličných

fyziológických procesov v centrálnom nervovom systéme (CNS).

Pre adenosín **IIa** je typická jeho schopnosť znižovať dráždivosť neurónov CNS a inhibovať uvoľňovanie rozličných neurotransmitérov v presynaptickej časti spojenia neurónov. Hlavným biochemickým metabolitom, ktorý vznikne oxidatívnou deamináciou nukleozidu **IIa**, je inozín **III**. Tento pozitívne vplýva na axón, stimuluje jeho rast *in vivo* v CNS (cit.²⁰).

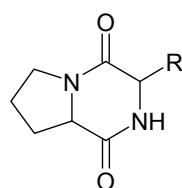
2.3. Aminokyseliny a peptidy

Cordyceps sinensis obsahuje okolo 29,1–33,0 % proteínov²¹. Zistilo sa, že chemická štruktúra proteínov je tvorená 18 aminokyselinami. Najčastejšie vyskytujúce sú: kyselina asparagová, treonín, serín, kyselina glutámová, prolín, glycín, valín, metionín, izoleucín, leucín, tyrozín, fenylalanín, lyzín, histidín, cysteín a tryptofán. Medzi aminokyseliny, ktoré sa vyznačujú zaujímavým farmakologickým účinkom, patria arginín, kyselina glutámová, tryptofán a tyrozín²². Okrem týchto základných aminokyselín boli v žezlovkách identifikované aj acyklické a cyklické dipeptidy, ako aj komplikovanejšie štruktúry, obsahujúce vo svojej molekule rádovo aj 10 aminokyselín.

Medzi najznámejšie cyklické dipeptidy patrí cyklo-[L-glycyl-L-prolyl] **VIIa**, cyklo-[L-leucyl-L-prolyl] **VIIb**, cyklo-[L-valyl-L-prolyl] **VIIc** (obr. 3). U niektorých z týchto látok sa objavila antitumorová, antivirálna a antibiotická aktivita²³.

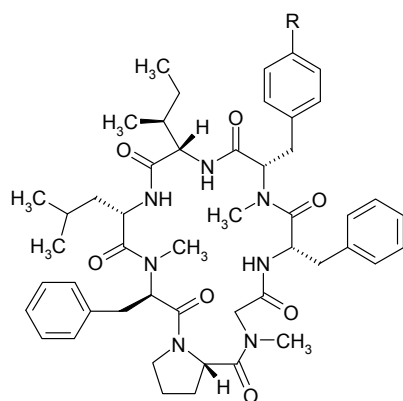
V *Cordyceps* boli identifikované aj zložitejšie peptidy, ako napr. kordyceptide A a B **VIII**. Kordyceptide A **VIIIa** sa vyznačuje antimalarickou aktivitou, kým peptid B **VIIIb** je inaktívny. V kombinácii však pôsobia mierne cytotoxicky.

Produkcii neribozomálneho peptidu s názvom cicaeptin **IXa** a **IXb** v roku 2005 prvýkrát opísal Krasnoff. U týchto látok bola zistená antibakteriálna a antifungálna aktivita (obr. 4)²⁴.

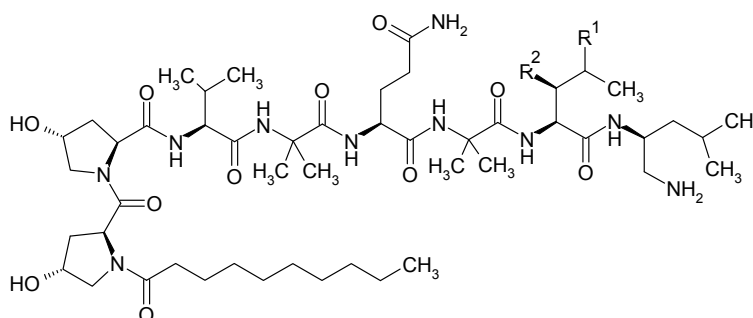


VIIa R = -H
VIIb R = -CH₂CH(CH₃)₂
VIIc R = -CH(CH₃)₂

Obr. 3. Chemická štruktúra cyklických dipeptidov **VIIa–c**



VIIIa R = -OH
b R = -H



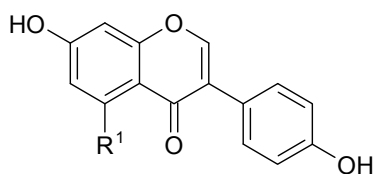
IXa R¹ = -CH₃, R² = -H
b R¹ = -H, R² = -CH₃

Obr. 4. Chemická štruktúra kordyceptide A **VIIIa**, B **VIIIb** a cicaeptinov **IXa** a **IXb**

2.4. Alkoholy a polyoly

Medzi zlúčeniny obsahujúce alkoholovú skupinu patria izoflavóny **Xa,b** (obr. 5) izolované z *Cordyceps sinensis*. Sú to prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny v rastlinách i hubách patriace do skupiny fytoestrogénov, ktoré nemajú steroidnú štruktúru, ale majú afinitu k estrogénovým receptorom α a β , ale i k PPAR receptorom²⁵.

Pokusy uskutočnené na potkanoch dokázali, že ich možno využiť v terapii strát kostnej hmoty, najmä pri estrogénovej deficiencii u menopauzálnych žien. Zlepšenie osteoporózy je pripisované zníženiu vylučovania Ca, koncentrácie Ca a fosfátu v plazme, zníženiu aktivity enzýmov ALP a TRAP, hladiny INF- γ , zvýšeniu osteokalcínu a estradiolu, normalizuje aj hladinu hormónov estrogénu, FSH a LH. Okrem toho sa podieľajú aj na znížení rizika vzniku rakoviny, kardiovaskulárnych chorôb a na zvýšení antioxidantnej ochrany²⁵.

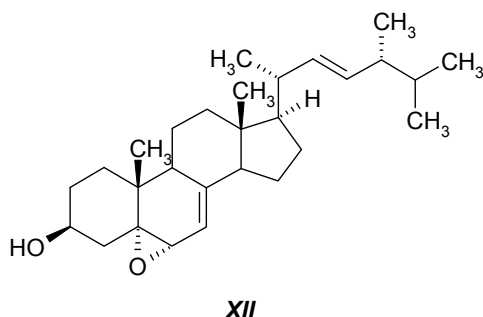


Xa R¹ = -H
b R¹ = -OH

Obr. 5. Chemická štruktúra izoflavónov daidzeínu **Xa** a genisteínu **Xb**

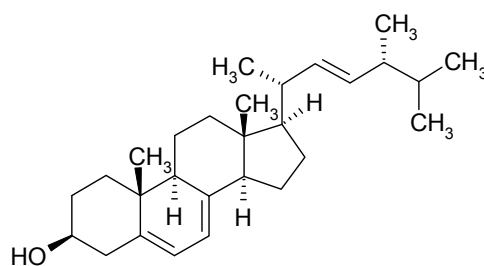
2.5. Steroly

Steroly prítomné v bunkovej stene húb majú dôležitú fyziologickú funkciu a taktiež vykazujú biologickú aktivitu. Medzi najvýznamnejšie steroly patrí ergosterol **XI** (obr. 6), ktorý je pre tieto huby charakteristický a je významným zdrojom vitamínu D₂ (cit.²⁶).



XI

Obr. 7. 5,6-epoxy-24(R)-metylcholesta-7,22-dién-3 β -ol (**XII**) a 5 α ,8 α -epidioxy-24(R)-metylcholesta-6,22-dién-3 β -D-glukopyranozid (**XIII**)



XI

Obr. 6. Štruktúra ergosterolu **XI**

Bola študovaná cytotoxicita a antimikrobiálna aktivita ergosterolu **XI**. Výsledky cytotoxických testov na bunkových líniiach sú pre HL-7702 (IC₅₀ = 37,10) a LX-2 (IC₅₀ = 55,51)²⁷. Taktiež bola sledovaná aj antimikrobiálna aktivita, ktorá však nepriniesla významné výsledky²⁸.

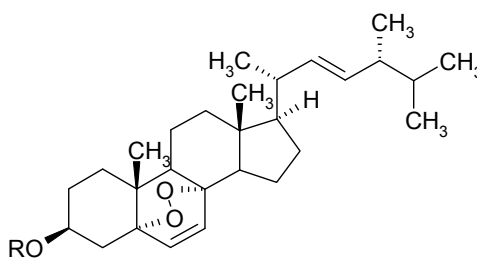
Deriváty ergosterolu **XII** a **XIII** izolované z metanolového extraktu CS, ktorých štruktúra bola potvrdená pomocou NMR spektroskopie, 5,6-epoxy-24(R)-metylcholesta-7,22-dién-3 β -ol (**XII**) a 5 α ,8 α -epidioxy-24(R)-metylcholesta-6,22-dién-3 β -D-glukopyranozid (**XIII**), (obr. 7) boli študované na tumorových bunkových líniiach K-562, Jurkat, WM-1341, HL-60 a RPMI-8226.

Glykozylovaný derivát **XIII** vykazoval o 10–40 % vyššiu cytotoxickú aktivitu na spomenutých bunkových líniiach, ako derivát neobsahujúci vo svojej štruktúre sacharidovú zložku **XII**²⁹.

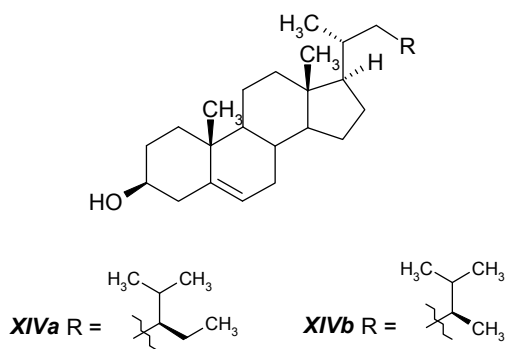
Fytosteroly najmä β -sitosterol **XIVa** a kampesterol **XIVb** (obr. 8) majú antitumorový efekt najmä v liečbe rakoviny hrubého čreva, prostaty a prsníka. β -Sitosterol **XIVa** má aj dôležitú úlohu v liečbe benígnej hypertrofie prostaty³⁰.

2.6. Iné látky

Z húb rodu *Cordyceps sinensis* bolo izolovaných 29 nasýtených a nenasýtených mastných kyselín a ich derivátov³¹.



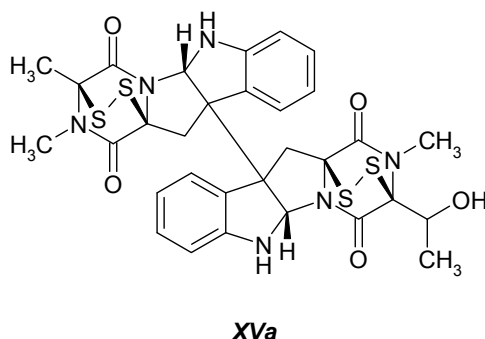
XIII R = -Glukóza

Obr. 8. Chemická štruktúra fytosterolov *XIVa* a *XIVb*

Lipidy, ako základné zložky živých organizmov, sú na jednej strane zložkou bunkovej membrány a na strane druhej energetickým zdrojom bunky.

K voľným masným kyselinám v študovaných hubách patria kyseliny: laurová (C12), myristová (C14), pentadekanová (C15), palmitolejová [(Z)-hexadek-9-énová (C16)], palmitová (C16), linolová (C18), olejová (C18), steárová (C18), dokosánová (C22) a lignocerová (C24), pričom uvádzajú, že majoritnými masnými kyselinami sú kyseliny palmitová a olejová³². Sú nevyhnutnou zložkou výživy, a okrem toho zabezpečujú viaceré bunkové funkcie cez svoje receptory spriahnuté s G proteínom, označujú sa ako GPR-40, 41, 43, 120, 84, nachádzajúce sa hlavne v pankrease, gastrointestinálnom trakte a imunitných bunkách. Podľa tkanivovej distribúcie cez ich aktiváciu sa sprostredkávajú tieto aktivity, uvoľňovanie glukóza – dependentného inzulínu, produkcia leptínu a protizápalová aktivita, inhibícia lipolýzy, sekrécia inzulínu a podobne (cit.^{33–35}).

Do tejto skupiny látok možno zaradiť aj gliokladicilíny – gliokladicilín A *XVa* a B *XVb* (obr. 9). Ich štruktúry boli identifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie a NMR ako epipolytiodioxo-piperazíny. Ich hlavný účinok je protirakovinový, čo potvrdili *in vitro* aj *in vivo* štúdie. *In vitro* inhibujú rast MCF-7 buniek rakoviny prsníka, HepG2 buniek hepatocelulárneho karcinómu, HeLa buniek rakoviny krčka maternice a zastavujú bunkový cyklus vo



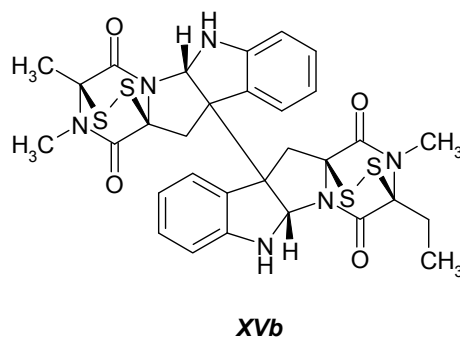
fáze G2/M a tiež indukujú apoptózu. *In vivo* štúdie ukazujú inhibičný efekt na rast bunkovej populácie B16 melanómu v imunodeficientných myšiach³⁶.

3. Záver

Uvedená práca sa zaoberá stručným prehľadom rozmanitej skupiny chemických látok zastúpených v parazitujúcej hube s názvom *Cordyceps sinensis*, opisuje ich chemickú štruktúru a hlavne pozitívny biologický účinok na ľudský organizmus. Ako najdôležitejšie možno spomenúť: pomáha v prevencii hyperglykémie, podporuje srdcový rytmus, znižuje hladinu cholesterolu, podporuje imunitný systém, selektívne inhibuje syntézu RNA – narúša tým syntézu proteínov v rakovinových bunkách, inhibuje metyláciu nukleových kyselín, je to silný antioxidant, chráni obličky pred poškodením, účinkuje ako antibiotikum – má baktériostatické účinky proti niekoľkým desiatkam patogénnych baktérií vrátane pneumokokov, streptokokov a zlatého stafylokoka, má protizápalové účinky, zvyšuje sexuálnu výkonnosť a pôsobí ako afrodiziakum, a mnoho ďalších iných.

LITERATÚRA

1. Hobbs Ch.: Botanica Press 1995, 251.
2. Holliday J., Cleaver M., Wasser S. P.: Cordyceps, v: *Encyclopedia of dietary supplements*, (Coates P. M., Blackman M. R., Cragg G., Levine M., Moss J., White J., ed.), str. 1. Marcel Dekker, New York 2005.
3. Pereira J.: N. Y. J. Med. 1, 128 (1843).
4. Huang K. C.: *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press, Boca Raton 1993.
5. Uphof J. C. Th.: *Dictionary of Economic Plants*, str. 152. Verlag von J. Cramer, New York 1968.
6. Zhou J. S., Halpern G., Jones K.: J. Alt. Comp. Med. 4, 57 (1998).
7. Holliday J., Cleaver P.: Int. J. Med. Mushrooms 10, 219 (2008).
8. Lu Y. L., Weng K. M.: Chin. Pharmacist 6, 371 (2003).

Obr. 9. Gliokladicilíny – gliokladicilín A *XVa* a B *XVb*

9. Zhu J. S., Halpern G. M., Johns K.: J. Alt. Comp. Med. 4, 289 (1998).
10. Zhu J. S., Halpern G. M., Johns K. J.: Alt. Comp. Med. 4, 429 (1998).
11. Yue K., Ye M., Zhou Z., Sun W., Lin X.: J. Pharm. Pharmacol. 65, 474 (2012).
12. Zhou X., Gong Z., Su Y., Lin J., Tang K.: J. Pharm. Pharmacol. 61, 281 (2009).
13. Synytsya A., Novák M.: Carbohydr. Polym. 92, 793 (2013).
14. Wang Y., Yin H., Lv X., Wang Y., Gao H., Wang M.: Fitoterapia 81, 397 (2010).
15. Lo Ch.-H., Hsieh Ch., Lin F.-Y., Hsu T.-H.: J. Trad. Complementary Med. 3, 24 (2013).
16. Li S. P., Yang F. Q., Tsim K. W. K.: J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 1571 (2006).
17. Russel R., Paterson M.: Phytochemistry 39, 1474 (2008).
18. Cho J., Kang J. S., Long P. H., Jing J., Back Y., Chung K. S.: Arch. Pharmacol. Res. 26, 821 (2003).
19. Yoshikawa N., Nakamura K., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 51 (2004).
20. Benowitz L. I., Goldberg D. E., Irwin N.: Prog. Brain Res. 137, 389 (2002).
21. Hsu T. H.: Food Chem. 78, 463 (2002).
22. Ji S.: J. Fujian. Coll. Trad. Chin. Med. 9, 46 (1999).
23. Shashidhar M. G., Giridhar P., Udaya Sankar K., Manohar B.: J. Funct. Foods 5, 1013 (2013).
24. Russell M., Paterson M.: Phytochemistry 69, 1469 (2008).
25. Zhang D., Wang Z., Qi W., Zhao G.: BMC Complement. Alter. Med. 14, 484 (2014).
26. Seitz L. M.: Phytopathology 69, 1202 (1979).
27. Peng Y., Tao Y., Wang Q., Shen L., Yang T., Liu Z., Liu Ch.: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 12 str. (2014).
28. Zheng J., Wang Y., Wang J. F., Liu P., Li J., Zhu W.: Extremophiles 17, 963 (2013).
29. Bok J. W., Lerner L., Chilton J., Klingeman H. G., Neil Towers G. H.: Phytochemistry 51, 891 (1999).
30. Awad A. B., Chan K. C., Downie A. C., Fink C. S.: Nutr. Cancer 36, 238 (2000).
31. Hobbs Ch.: Medicinal mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Cultures, str. 251. Botanica Press, Santa Cruz (1995).
32. Yang F. Q., Feng K., Zhao J., Li S. P.: J. Pharm. Biomed. Anal. 49, 1172 (2009).
33. Rayasam G. V., Tulasi V. K., Davis J. A., Bansal V. S.: Expert Opin. Ther. Targets 11, 661 (2007).
34. Hirasawa A., Hara T., Katsuma S., Adachi T., Tsujimoto G.: Biol. Pharm. Bull. 31, 51 (2008).
35. Swaminath G.: Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 341, 61 (2008).
36. Chen P. X., Wang S., Nie S., Marcone M.: J. Funct. Food 5, 550 (2013).

L. Ungvarská Maľučká, Z. Bedlovičová, and J. Harvanová (Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Institute of Pharmaceutical Chemistry, The University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice): ***Cordyceps Sinensis*: Medicinal Fungus of Chinese Medicine**

The paper gives a brief overview of a diverse group of chemical compounds present in the parasitic fungus called *Cordyceps sinensis*. It focuses on the description of their chemical structure and their positive biological effects on the human body. Some of the key biological activities of *Cordyceps sinensis* are discussed: It helps to prevent hyperglycemia, supports heart function, decreases the level of cholesterol, supports the immune system, selectively inhibits the synthesis of RNA in cancer cells through disturbing the synthesis of some proteins, inhibits the methylation of the nucleic acid, proves to be a powerful antioxidant, protects kidneys from damage, acts as an antibiotic showing a bacteriostatic effect against several pathogenic bacteria, including pneumococci, streptococci and *Staphylococcus aureus*, as well as anti-inflammatory effects, improves sexual performance, acts as an aphrodisiac, and many more others.

MODERNÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUROVIN ZE ZPRACOVÁNÍ VINNÝCH HROZNŮ

PETR CVINER, KAROLÍNA PÁDROVÁ
a IRENA KOLOUCHOVÁ

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-techno-
logická, Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
padrovak@vscht.cz

Došlo 5.4.16, přijato 16.6.16.

Klíčová slova: polyfenoly, vinařství, odpadní produkty,
Vitis vinifera

Obsah

1. Pěstování vinné révy *Vitis vinifera*
2. Technologie výroby vína
3. Odpady ze zpracování vinných hroznů
 - 3.1. Vinné třapiny
 - 3.2. Vinné matoliny
 - 3.3. Vinné kaly
4. Vinohradnické odpady
5. Antioxidační a biologické účinky fenolických látek
 - 5.1. Uplatnění antioxidantů v potravinářském průmyslu
 - 5.2. Uplatnění antioxidantů v lékařství
 - 5.2.1. Kardiovaskulární onemocnění
 - 5.2.2. Antikancerogenní účinky
 - 5.2.3. Antimikrobiální účinky
6. Závěr

1. Pěstování vinné révy *Vitis vinifera*

Vitis vinifera je jednou z nejpěstovanějších plodin světa. Tab. I uvádí údaje o celkové ploše vinic na území vybraných zemí Evropy z roku 2014. Mezi největší producenty vína v Evropě se řadí Španělsko, Francie, Itálie, Portugalsko, Rumunsko, Řecko, ale také Německo či Ma-

darsko. V České republice v roce 2014 činila plocha osázených vinic 15 783 ha, přičemž 93 % tohoto území připadalo na Jihomoravský kraj¹. Výnosy se v témže roce pohybovaly okolo 4,03 t/ha, tj. téměř 63,5 tisíc tun sklizených hroznů². Nejaktuálnější údaje statistické databáze FaoStat uvádí, že celosvětová roční produkce činila za rok 2013 přibližně 77 milionů tun vypěstované vinné révy³.

Vitis vinifera je popínávací rostlina s důležitou vlastností apikální dominance, která se projevuje převahou růstu letorostů vrcholové části rostliny⁴. Vinohradník proto každým rokem, nejčastěji během měsíce února, provádí tzv. zimní řez. Cílem řezu je probírka a odstranění přebytečných výhonů – letorostů, což je pro budoucnost keře, jeho správný růst a plození zásadní. Během vegetačního období révy vinné je důležité zajistit optimální listovou plochu, která je zodpovědná za fyziologické děje, především fotosyntézu, dýchání a transpiraci. Intenzita odlistění ovlivňuje složení hroznů (obsah cukrů, kyselin) a kvalitu vinných produktů⁵.

2. Technologie výroby vína

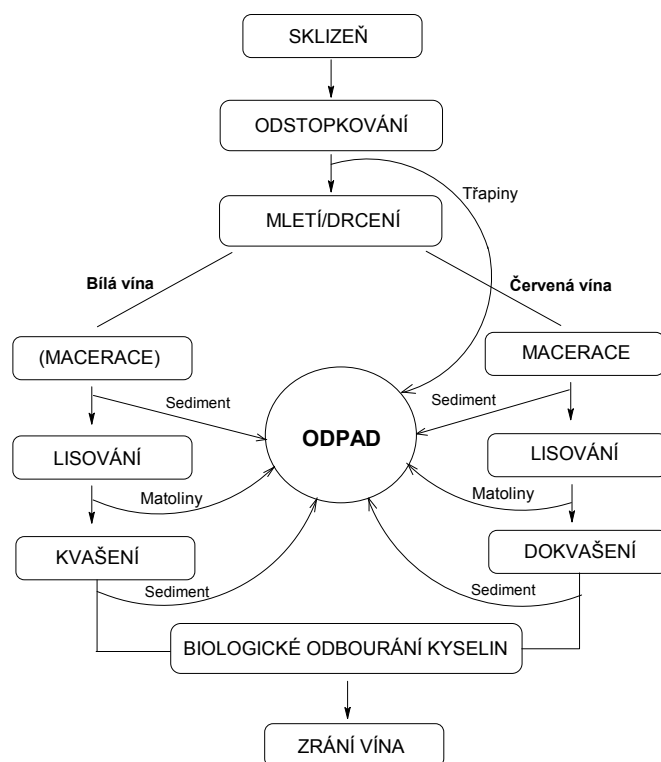
Technologické postupy používané při zpracování vinných hroznů ovlivňují podobu vznikajících odpadů. Prvními kroky, společnými pro výrobu bílých i červených vín, jsou po sklizni procesy odstopkování a mletí vinných hroznů (obr. 1). Odpadní meziprodukty vznikají již na počátku zpracování vinných hroznů při jejich odzrnění v mlýnko-odzrňovači, jsou jimi třapiny. Samotné bobule mohou být následně pomlety⁶.

U bílých vín (a u modrých hroznů používaných pro výrobu klaretu) je vzniklý rmut lisován za vzniku hroznového moštu, který je již připraven ke kvašení. Lisování může předcházet několikahodinová macerace, která se však v případě bílých vín týká pouze aromatických odrůd (tj. muškátové odrůdy, odrůdy „tramínového“ typu aj.)⁶. Naopak u modrých odrůd, tedy při výrobě červených vín, je macerace nepostradatelným krokem, jelikož se při ní extrahují aromatické a barevné látky. Při maceraci modrých hroznů, která trvá 4 až 14 dní, dochází vlivem vznika-

Tabulka I

Osázená plocha vinic (v 1000 ha) ve vybraných evropských zemích v roce 2014

Země	Ploha (v 1000 ha)	Země	Ploha (v 1000 ha)	Země	Ploha (v 1000 ha)
Španělsko	947,3	Rumunsko	174,6	Rakousko	44,8
Francie	757,9	Řecko	110,9	Bulharsko	31,9
Itálie	682,2	Německo	100,1	Srbsko	21,2
Portugalsko	179,0	Maďarsko	69,3	ČR	15,8



Obr. 1. Schéma výroby bílých a červených vín a vznik meziproduktů

jícího ethanolu k uvolnění nejen barviv, ale i fenolických látek⁷. Celkový obsah fenolických látek je zpravidla vyšší u červených vín než u bílých.

Lisování rmutu vede vždy ke vzniku značného množství odpadu. Tím je zbytek po vylisování označovaný jako vinné matoliny. Při samotném kvašení a dokvašení hroznového moštu dochází postupem času k sedimentaci. Vzniklý sediment (vinné kaly) je dalším zdrojem odpadu vznikajícího při zpracování vinných hroznů⁶. K sedimentaci a tvorbě vinného kalu dochází však i v průběhu školení vína, a to v důsledku biologického odbourávání kyselin. To je založeno na principu jablečno-mléčného kvašení a je nepostradatelným krokem především ve vinařských oblastech České republiky.

3. Odpady ze zpracování vinných hroznů

Mezi hlavní meziprodukty zpracování vinných hroznů patří matoliny, které zaujímají největší podíl (13 hm.%), dále jsou to vinné kaly (6 hm.%) a třapiny (3 hm.%). Celkově tedy tvoří odpad vzniklý při vinifikaci asi 22 hm.%. Množství vzniklého odpadu není výrazně závislé na odrůdě hroznů ani technologii dodržované při jejich zpracování⁹.

Nařízení Rady (ES) č. 1234/2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty, ve znění Nařízení Rady (ES) č. 491/2009, kterým se výše uvedené nařízení mění, stanoví, že členské státy se mohou rozhodnout, jakým způsobem budou po svých vinařích požadovat odstranění vedlejších produktů (článek 103v ve spojení s bodem D Přílohy XVb)^{8,9}. V České republice postup při odstraňování vedlejších produktů vinařství stanovuje Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 323/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o vinohradnictví a vinařství. Ta v § 5 říká, že odstranění vedlejších produktů se může provádět nejen destilací, ale též jejich prodejem, likvidací ve vinici nebo jiným prokazatelným způsobem¹⁰.

3.1. Vinné třapiny

Vinné třapiny jsou jako odpad nejčastěji ukládány na otevřená pole. Vzhledem k vysokému obsahu polyfenolických látek není tento postup považován za příliš ekologický, protože při něm dochází ke značnému snížení pH půdy¹¹. Tradiční způsob zpracování bioodpadu, kompostování, je rovněž často aplikovanou metodou zpracování třapin.

Další z potenciálních variant využití třapin je užití jako krmiva pro zvíř. Tuto variantu však komplikuje intolerance zvířat vůči některým složkám tohoto meziproduktu¹².

V současné době jsou vinné třapiny studovány z hlediska možného zdroje polyfenolických látek, které disponují antioxidační, ale také antimikrobiální a antikancerogenní aktivitou. Celkové množství fenolických látek (nejčastěji uváděné v mg kyseliny galové (GA) na gram sušiny vzorku) v extraktech z třapin se liší především v závislosti na odrůdě *Vitis vinifera*, ale také na způsobu přípravy extraktů. Wenzel a spol. popsali vliv teploty na množství fenolických látek ($35\text{--}65\text{ mg GA g}^{-1}$ sušiny; $163 \pm 0,9$ až $260 \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)¹³. Llobera a Cañellas uvádějí celkové množství fenolických látek extrahovaných z třapin až dvojnásobně vyšší ($116 \pm 2\text{ mg GA g}^{-1}$ sušiny), když extrakce proběhla ve dvou krocích, nejprve ve směsi methanol:voda (50/50, v/v), pak v roztoku acetonitril:voda (70/30, v/v)¹⁴. Anastasiadi a spol. stanovili při použití extrakční směsi methanol:voda:HCL (90/9,5/0,5; v/v) celkové množství fenolických látek u extraktů z třapin 367–587 mg GA g⁻¹ sušiny¹⁵. Použitím stejné metodiky, ale třapin z odlišných odrůd *Vitis vinifera*, stanovili Sahpazidou a spol. celkové množství fenolických látek v extraktech v rozmezí 318–415 mg GA g⁻¹ sušiny¹¹.

Třapiny jsou též zdrojem vlákniny, která je pro lidský organismus velmi prospěšná. Vláknina snižuje obsah cholesterolu v krvi, dále riziko výskytu kardiovaskulárního onemocnění a chrání též lidský organismus před výskytem některých typů rakoviny, především rakoviny tlustého střeva. V této souvislosti se uvažuje o možném využití vinných třapin k prevenci některých onemocnění¹⁶.

Extrakt z vinných třapin se zdá být rovněž slibnou alternativou oxidu siřičitého, který je využíván ve vinařství při tzv. síření vína za účelem jeho konzervování. Antioxidační i antimikrobiální účinky oxidu siřičitého se shodují s účinky fenolických látek extrahovaných z vinných třapin. Tato alternativa se zdá být výhodná nejen z ekonomického pohledu, ale také ve vztahu k životnímu prostředí. Nezanedbatelným přínosem tohoto nového postupu by byla také částečná eliminace využití oxidu siřičitého, které je spojeno s rizikem vzniku některých nemocí. Z tohoto důvodu byly již dříve pro používání oxidu siřičitého zavedeny množstevní limity¹⁷.

Vinné třapiny mohou být rovněž použity jako pevný substrát pro mikrobiální produkci ligninolytických enzymů. Tyto enzymy jsou produkovány jen úzkou skupinou plísní, např. *Basidiomycota*. Třapiny zbylé po zpracování vinných hroznů tak zároveň představují vhodný a levný zdroj uhlíku pro některé biotechnologické procesy¹⁸.

3.2. Vinné matoliny

Součástí vinných matolin jsou nejen slupky a semena, ale také zbytky třapin, tedy stopky, které nebyly při předchozím kroku výroby řádně odseparovány. Praktické a relativně často využívané je zpracování vinných matolin na matolinovou pálenku neboli matolinovici. Jedná se o lihovinu, která se vyrábí výhradně ze zkvašených vinných matolin. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 110/2008 povoluje při výrobě této lihoviny přidání vinných kalů k matolinám, a to však v množství nejvýše

25 kg na 100 kg použitých matolin. Toto nařízení dále stanoví minimální obsah ethanolu v matolinovici na 37,5 obj.%, přičemž přidání alkoholu zakazuje. Povolen je přídavek pouze karamelu pro úpravu zbarvení¹⁹. Nejznámějšími výrobky jsou např. italská grappa nebo francouzský marc.

Pro „malovinaře“ se zdá být vhodnou variantou zpracování tohoto druhu odpadu kompostování, které je však obtížněji aplikovatelné ze strany vinařských podniků, které se na produkci odpadu podílejí z vyšší míry. Vzhledem k nízké nutriční hodnotě a vysokému obsahu ligninu, polyfenolů a draslíku není příliš vhodné využívat vinné matoliny ani jako zemědělské krmivo pro býložravce²⁰.

Stejně jako třapiny, jsou i vinné matoliny významným zdrojem pro získání přírodních antioxidantů²¹. Ne příliš důsledná extrakce vinných matolin během výroby vína činí z těchto odpadních produktů ideální substráty s vysokým obsahem fenolických látek. Celkový obsah fenolických látek je u matolin zpravidla nižší než u třapin, nicméně opět výrazně závisí na použitém extrakčním postupu a na samotné odrůdě *Vitis vinifera*. Llobera a Cañellas stanovili celkové množství fenolických látek extrahovaných z matolin ($26,3 \pm 0,4\text{ mg GA g}^{-1}$ sušiny) po dvoukrokové extrakci, nejprve ve směsi methanol:voda (50/50, v/v), pak v roztoku acetonitril:voda (70/30, v/v)¹⁴. Další studie při použití odlišného extrakčního postupu udává celkové množství fenolických látek v matolinách 33–75 mg GA g⁻¹ sušiny²². Závislost extrakčního postupu na množství vyextrahovaných fenolických látek z matolin popsali i Drosou a spol., kdy se hodnoty pohybovaly v relativně širokém rozmezí 24–439 mg GA g⁻¹ sušiny²³.

Vinná semena, která jsou rovněž součástí vinných matolin, obsahují vysoké množství nenasycených mastných kyselin, a proto jsou častým zdrojem především pro výrobu jemných a chuťově velmi příjemných vinných olejů. Nicméně mohou být rovněž významným zdrojem fenolických látek, dokonce i po vylisování²⁴.

3.3. Vinné kaly

Vinné kaly jsou dalším neméně významným vedlejším produktem vznikajícím při výrobě vína po procesu hlavního kvašení. Sediment obsahuje především mikrobiální biomasu tvořenou kvasinkami a bakteriemi, dále nerozpustné sacharidy (celulosa, hemicelulosa), fenolické látky, anorganické látky a organické kyseliny (zejména kyselina vinná)²⁵.

Tento odpadní materiál je zpracováván různým způsobem. Dle výše zmíněného nařízení a vyhlášky vždy záleží na zvážení samotného vinaře. Běžně užívanou praxí je zaorání do země, což však může nežádoucím způsobem okyselovat půdu na vinici. Vysoký obsah fenolických látek a nízká nutriční hodnota znemožňují využití vinných kalů pro krmivářské účely²⁶.

Asi nejvýznamnější je využití tohoto odpadního meziproduktu pro získání kyseliny vinné. Ta nachází uplatnění v potravinářském, farmaceutickém, ale i vinařském průmyslu. Lze uvažovat i o průmyslové výrobě ethanolu des-

tilací nebo využití vinných kalů jako levného zdroje mikrobiální biomasy^{27,28}. Vinné kaly rovněž obsahují fenolické látky a mohou být využity jako zdroj antioxidantů²⁹. Obsah fenolických látek se však bude lišit v závislosti na použité technologii výroby vína³⁰.

4. Vinohradnické odpady

Rovněž ve vinohradnictví vzniká odpadní materiál (listy a letorosty), který je nejčastěji kompostován. V případě letorostů je možno jej zpracovat na štěpky a dále prakticky využít.

Nedávno prokázaná přítomnost fenolických látek ve vinohradnických odpadech nabízí novou možnost jejich využití jako potenciálního zdroje antioxidantů^{31–33}. Četin a spol.³⁴ stanovili celková množství fenolických látek v extraktech z letorostů. Látky byly extrahovány směsí ethanol:voda (60/40, v/v) za zvýšené teploty (80 °C). Zastoupení těchto látek se v jednotlivých extraktech lišilo v závislosti na odrůdě *Vitis vinifera* v rozmezí hodnot 25,3 až 36,6 mg GA g⁻¹ sušiny³⁴. Závislost volby extrakčního postupu na množství vyextrahovaných fenolických látek (konkrétně stilbenoidů) dokazují ve své studii Soural a spol.³⁵ nebo Karacabey a Mazza³⁶.

Byl také zjištěn výrazný vliv doby a způsobu uskladnění výhonů *Vitis vinifera* na množství stanovovaných stilbenoidů. Za dobu 8 měsíců uchování tohoto materiálu, od zimního řezu, byl zaznamenán až pětinašobný nárůst koncentrace stilbenoidů³⁷.

5. Antioxidační a biologické účinky fenolických látek

Nejrozšířenějšími sekundárními metabolity rostlin jsou fenolické látky, tedy přírodní antioxidanty, jejichž biologické účinky jsou předmětem současného výzkumu v této oblasti. Nejpočetnější skupinu fenolických látek tvoří skupina flavonoidů. Mezi ně patří flavonoly, flavan-

-3-oly nebo anthokyaniny. Významnými biologickými účinky pak disponuje zejména skupina stilbenoidů. Mezi nejvýznamnější zástupce stilbenů se řadí resveratrol a jeho glykosidická forma polydatin, dále pak pterostilben nebo pinosylvin (obr. 2)³⁸. Relativně rozšířeným zdrojem všech těchto látek je právě *Vitis vinifera* a v současné době existuje i několik potravinových doplňků s deklarovaným obsahem resveratrolu, vyrobených z hroznů *Vitis vinifera*. Všechny výše uvedené odpadní meziproducty vzniklé při zpracování vinných hroznů lze tedy pokládat za potenciální zdroje biologicky aktivních sloučenin s antioxidačními účinky.

5.1. Uplatnění antioxidantů v potravinářském průmyslu

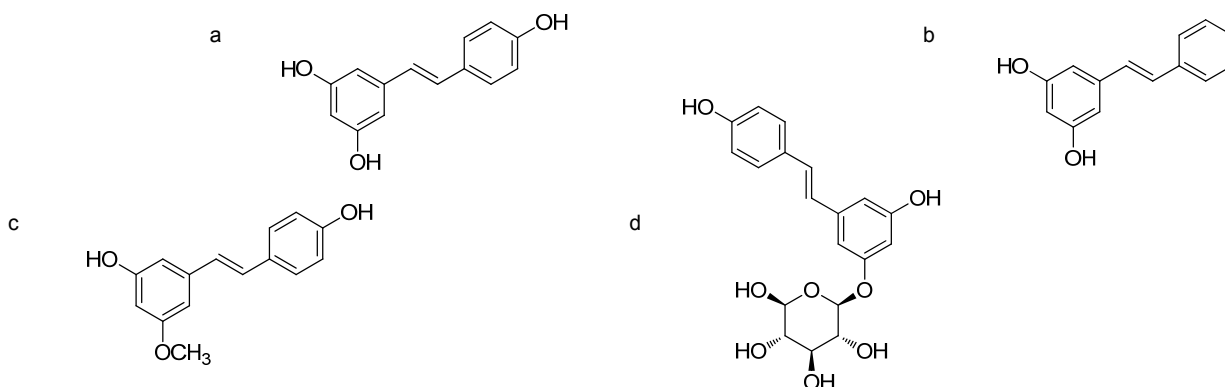
Antioxidanty se přidávají do potravin nejčastěji za účelem prodloužení jejich trvanlivosti. V potravinářském průmyslu oxidativní jevy znehodnocují především tuky procesem oxidativního žluknutí tuků. Tyto změny pak snižují jak výživovou, tak senzorickou hodnotu potravin³⁹. Antioxidanty nachází uplatnění i jako látky zvyšující stabilitu barvy potravinářských výrobků^{40,41}.

Podmínky přidávání antioxidantů do potravin jsou upraveny legislativou. Nejvyšší povolené množství a druhy přídatných látek, mezi něž se řadí i antioxidanty, využití při výrobě potravin, stanoví Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. V příloze č. 7 této vyhlášky je seznam povolených antioxidantů, skupiny potravin, v nichž se mohou vyskytovat, a podmínky použití antioxidantů⁴².

5.2. Uplatnění antioxidantů v lékařství

5.2.1. Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění jsou spojována s vysokou hladinou cholesterolu v krvi. Právě vysoké hladiny LDL (low density lipoproteins) cholesterolu v krvi indukují tvorbu aterosklerotických plátů, tedy nahromadě-



Obr. 2. Strukturní vzorce resveratrolu (a), pinosylvinu (b), pterostilbenu (c), polydatinu (d)

ní tukové hmoty ve stěnách cév. Se vznikem tohoto onemocnění jsou úzce spjaty peroxidační reakce lipidů. Těmto reakcím lze předcházet působením antioxidantů, mezi které patří fenolické látky obsažené ve víně a odpadních surovinách jeho zpracování. Výsledky studií dokazují i skutečnost, že fenolické látky se z tohoto pohledu jeví účinnějšími antioxidanty než např. kyselina askorbová či tokoferol⁴³. Na portugalské univerzitě v Coimbre byl testován inhibiční účinek bílého a červeného vína na oxidaci LDL cholesterolu. Snížení těchto oxidačních reakcí bylo dosaženo jak při pokusech *in vitro*, tak *in vivo*. Výraznější účinky byly zaznamenány u červených vín⁴⁴.

5.2.2. Antikancerogenní účinky

Řada studií potvrzuje rovněž antikancerogenní účinek antioxidantů, který souvisí s inhibicí oxidativních mutací DNA a se snižováním abnormálního nárůstu buněčných populací, tedy s proliferací rakovinných buněk⁴⁵. Zejména kvercetin, epikatechin a resveratrol jsou fenolické látky, jež chrání DNA proti oxidativnímu narušení její struktury^{46,47}. Byla dokázána také schopnost aktivních složek extraktu z odpadních surovin zpracování vinných hroznů zpomalit proliferaci rakovinných buněk, a to u rakoviny prsu, tlustého střeva, ledvin, štítné žlázy a jater¹¹.

5.2.3. Antimikrobiální účinky

V současné době je značná část výzkumu zaměřena na studium antimikrobiálních účinků polyfenolů extrahovatelných nejen z vinných třapin. Man-Ying Chan popsal antimikrobiální účinky resveratrolu proti skupině plísní, které jsou původci některých dermatologických onemocnění u lidí⁴⁸. Dias a spol.⁴⁹ se zabývali výzkumem antimikrobiální aktivity extraktů vinných třapin proti patogenům zažívacího traktu lidí, speciálně proti vybraným druhům gram pozitivních a gram negativních bakterií. Výsledky studie ukázaly rozdílnou citlivost jednotlivých kmenů bakterií na extrakty vinných třapin různých odrůd *Vitis vinifera*. Extrakty vinných třapin se jeví účinnějšími proti gram pozitivním bakteriím, což je dáno rozdílnou stavbou buněčné stěny⁴⁹. Byl vysledován i vliv flavonoidů a fenolických kyselin na inhibici růstu gram negativní bakterie *Helicobacter pylori*, jež osídluje žaludeční sliznici a způsobuje chronickou gastritidu⁵⁰.

Resveratrol prokázal inhibiční účinek na tvorbu mikrobiálního biofilmu (*in vitro*) a negativní efekt na stabilitu jeho struktury⁵¹. Biofilm je heterogenní struktura tvořená mikrobiální populací buněk, které jsou obklopeny polysacharidovou matrix, a které mezi sebou navzájem komunikují⁵². Biofilmové populace jsou oproti suspenzně rostoucím buňkám výrazně odolnější a biofilmové kontaminace představují závažný problém nejen v potravinových provozech. Naskytá se tak možnost využít resveratrol jakožto aditivum zvyšující trvanlivost potravin a zároveň zajišťující jejich zdravotní nezávadnost. Tuto možnou aplikaci resveratrolu však komplikuje fakt, že resveratrol je ve vodných roztocích málo rozpustný a stabilní⁵³.

6. Závěr

Vedlejší produkty vinařského průmyslu byly dlouho opomíjenou surovinou s vysokým obsahem polyfenolických látek (resveratrol, polydatin), které mohou být využity jak ve formě potravinových doplňků, tak jako účinná směs látek s antimikrobiální aktivitou. Zavádění moderních technologií ve vinařství zvyšuje možnosti dlouhodobého využití odpadních surovin, především třapin, které disponují vysokým obsahem celkových polyfenolů. Letorosty se zdají být nejvhodnějším zdrojem resveratrolu – jedné z nejstudovanějších látek s antimikrobiální a antioxidační aktivitou.

Tato práce byla realizována v rámci „Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost“ CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory „Národního programu udržitelnosti I“ - NPU I (LO1601 - č.: MSM-T-43760/2015).

LITERATURA

1. <http://apl.czso.cz/pll/eutab/html.h?ptabkod=tag00012#aV>, staženo 21. leden 2016.
2. <https://www.czso.cz/document-s/10180/20543367/2701411528.pdf/5c04795a-ba28-444d-ab81-0dfcc8a84e3a?version=1.0.>, staženo 21. leden 2016.
3. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, staženo 21. leden 2016.
4. Kraus V.: *Pěstujeme révu vinnou*. Grada Publishing, Praha 2012.
5. Peña-Olmos J. E., Casierro-Posada F., Herzberg M.: Rev. Fac. Nac. Agron. (Medellin) 66, 6891 (2013).
6. Pavloušek P.: *Výroba vína u malovínařů*. Grada Publishing, Praha 2010.
7. Sacchi K. L., Bisson L. F., Adams D. O.: Am. J. Enol. Vitic. 56, 197 (2005).
8. ES 1234/2007 o společné organizaci zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty („jednotné nařízení o společné organizaci trhů“) (Nařízení evropského parlamentu a rady) Sbírka zákonů 2007, L 299, str. 331.
9. ES č. 491/2009 o společné organizaci zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty („jednotné nařízení o společné organizaci trhů“) (Nařízení evropského parlamentu a rady). Sbírka zákonů 2009, L 154, str. 56.
10. Předpis č. 323/2004 Sb. *Vyhláška, kterou se provádějí některá ustanovení zákona o vinohradnictví a vinařství*. Sbírka zákonů 2004, 18.
11. Sappazidou D., Geromichalos G. D., Stagos D., Apostolou A., Haroutounian S. A., Tsatsakis A. M., Tzanakakis G. N., Hayes A. W., Kouretas D.: Toxicol. Lett. 230, 218 (2014).
12. Spatafora C., Barbagallo E., Amico V., Tringali C.: LWT Food Sci. Technol. 54, 542 (2013).
13. Wenzel J., Samaniego C. S., Wang L., Nelson L., Ketchum K., Ammerman M., Zand A.: Food Sci. Nu-

- tr. 3, 569 (2015).
14. Llobera A., Cañellas J.: *Food Chem.* 101, 659 (2007).
 15. Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A.-L., Haroutounian S. A.: *LWT Food Sci. Technol.* 48, 316 (2012).
 16. González-Centeno M. R., Rosselló C., Simal S., Garau M. C., López F., Femenia A.: *LWT Food Sci. Technol.* 43, 1580 (2010).
 17. Ruiz-Moreno M. J., Raposo R., Cayuela J. M., Zafrilla P., Piñeiro Z., Moreno-Rojas J. M., Mulero J., Puertas B., Giron F., Guerrero R. F., Cantos-Villar E.: *Ind. Crops Prod.* 63, 152 (2015).
 18. Rodríguez Couto S., Rodríguez R., Gallego P., Sanromán A.: *Acta Biotechnol.* 23, 65 (2003).
 19. ES č. 110/2008 *O definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89* (Nařízení evropského parlamentu a rady) *Sbírka zákonů 2008*, str. 54.
 20. Vaccarino C., Tripodo M., Curto R. L., Cimino G.: *Bioresour. Technol.* 44, 197 (1993).
 21. Lafka T.-I., Sinanoglou V., Lazos E. S.: *Food Chem.* 104, 1206 (2007).
 22. Rockenbach I. I., Rodrigues E., Gonzaga L. V., Calari V., Genovese M. I., Gonçalves A. E. d. S. S., Fett R.: *Food Chem.* 127, 174 (2011).
 23. Drosou C., Kyriakopoulou K., Bimpilas A., Tsimogiannis D., Krokida M.: *Ind. Crops Prod.* 75, 141 (2015).
 24. Maier T., Schieber A., Kammerer D. R., Carle R.: *Food Chem.* 112, 551 (2009).
 25. Perez-Bibbins B., Torrado-Agrasar A., Salgado J. M., Oliveira R. P., Dominguez J. M.: *Waste Manage.* 40, 72 (2015).
 26. Versari A., Castellari M., Spinabelli U., Galassi S.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 485 (2001).
 27. Dimou C., Kopsahelis N., Papadaki A., Papanikolaou S., Kookos I. K., Mandala I., Koutinas A. A.: *Food Res. Int.* 73, 81 (2015).
 28. Perez-Serradilla J. A., de Castro M. D.: *Food Chem.* 111, 447 (2008).
 29. Barcia M. T., Pertuzatti P. B., Rodrigues D., Bochi V. C., Hermosin-Gutierrez I., Godoy H. T.: *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 895 (2015).
 30. Tao Y., Wu D., Zhang Q. A., Sun D. W.: *Ultrason. Sonochem.* 21, 706 (2014).
 31. Rayne S., Karacabey E., Mazza G.: *Ind. Crops Prod.* 27, 335 (2008).
 32. Farhadi K., Esmailzadeh F., Hatami M., Forough M., Molaie R.: *Food Chem.* 199, 847 (2016).
 33. Melzoch K., Hanzlíková I., Filip V., Buckiová D., Šmidrkal J.: *Agric. Conspec. Sci* 66, 53 (2001).
 34. Çetin E. S., Altinöz D., Tarçan E., Baydar N.: *Ind. Crops Prod.* 34, 994 (2011).
 35. Soural I., Vrchotová N., Trříska J., Balík J., Horník S., Cuřínova P., Šykora J.: *Molecules* 20, 6093 (2015).
 36. Karacabey E., Mazza G.: *Food Chem.* 119, 343 (2010).
 37. Gorena T., Saez V., Mardones C., Vergara C., Winterhalter P., von Baer D.: *Food Chem.* 155, 256 (2014).
 38. Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H.: *Plant Secondary Metabolites – Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing. Blackwell Publishing, Oxford 2006.
 39. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin*. OSSIS, Tábor 2009.
 40. Li S., Seymour T., King A., Morrissey M.: *J. Food Sci.* 63, 438 (1998).
 41. Daeseok H., Seok J. K., Sang H. K., Dong M. K.: *J. Food Sci.* 63, 69 (1998).
 42. Předpis č. 4/2008 Sb. *Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin*. *Sbírka zákonů 2008*, str. 105.
 43. Sánchez-Moreno C., Jiménez-Escrig A., Saura-Calixto F.: *Nutr. Res.* 20, 941 (2000).
 44. Serafini M., Laranjinha J. A., Almeida L. M., Maiani G.: *J. Nutr. Biochem.* 11, 585 (2000).
 45. Percival M.: *Clin. Nutr. Insights* 10, (1998).
 46. Athar M., Back J. H., Tang X., Kim K. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 274 (2007).
 47. Liu G.-A., Zheng R.-L.: *Pharmazie* 57, 852 (2002).
 48. Man-Ying C. M.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 99 (2002).
 49. Dias C., Domínguez-Perles R., Aires A., Teixeira A., Rosa E., Barros A., Saavedra M. J.: *LWT Food Sci. Technol.* 61, 25 (2015).
 50. Bae E.-A., Han M. J., Kim D.-H.: *Planta Med.* 65, 442 (1999).
 51. Duarte A., Alves A. C., Ferreira S., Silva F., Domingues F. C.: *Food Res. Int.* 77, 244 (2015).
 52. Fletcher M. H., Jennings M. C., Wuest W. M.: *Tetrahedron* 70, 6373 (2014).
 53. Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazue F., Ghiringhelli F., Latruffe N.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 48 (2011).

P. Cviner, K. Pádřová, and I. Kolouchová
(Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Modern Utilization of Bio-waste from Wine Grape Processing**

Vitis vinifera is one of the most widely grown crops throughout the world. During the production of wine, various by-products are accumulated. The most important waste by-products include stems, grape pomace and wine lees. This is the reason why the wine making industry became one of the main producers of biowaste which burdens the environment. However, the waste by-products may be a source of many valuable substances. Therefore, the research is focused on the possibility to use the winery waste by-products as a new source of antioxidants; it is especially the utilization of the stems and the canes which have not been used for this purpose yet. The antioxidants can further be used in food industry or medicine.

NOVÉ PSYCHOAKTIVNÍ LÁTKY

LUCIE FOJTÍKOVÁ^a, BARBORA HOLUBOVÁ^a
a MARTIN KUCHAR^{b,c}

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, ^b Ústav chemie přírodních látek, ^c Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
lucie.fojtikova@vscht.cz, barbora.holubova@vscht.cz,
martin.kuchar@vscht.cz

Došlo 5.1.17, přijato 19.1.17.

Klíčová slova: nové psychoaktivní látky, syntetické drogy, kanabinoidy, fenylethylaminy, katinony, spice, bath salts

Obsah

1. Úvod
2. Definice nových psychoaktivních látek (NPS) a legislativa na Evropské úrovni
3. Hlavní skupiny NPS
 - 3.1. Syntetické kanabinoidy
 - 3.2. Syntetické katinony
 - 3.3. Fenylethylaminy
4. Metody detekce nových syntetických látek
 - 4.1. Screening syntetických kanabinoidů
 - 4.2. Detekce katinonů a fenylethylaminů
5. Závěr

1. Úvod

V posledních letech se zvyšuje počet nových psychoaktivních látek na evropské i světové úrovni. Nové psychoaktivní látky (NPS, z angl. New Psychoactive Substances), nebo také nové syntetické drogy, legal highs, designer drugs, případně research chemicals jsou syntetizovány jako strukturní analoga nebo chemické deriváty již zákonem kontrolovaných látek^{1,2}. Bývají nabízeny jako sběratelské předměty, vykuřovadla či soli do koupele, tedy jako látky, u nichž není deklarováno použití k vnitřnímu užití. Touto cestou se jejich výrobci vyhýbají právnímu postihu. Současný nárůst NPS je připisován rozvoji jistého druhu tanečních zábavních scén a ochotě zejména mladých lidí vyhledávat a získávat nové psychedelické zkušenosti.

2. Definice nových psychoaktivních látek (NPS) a legislativa na Evropské úrovni

Nová psychoaktivní látka je definována jako: Nová omamná nebo psychotropní látka v čisté formě nebo v přípravku, která nepodléhá kontrole podle Jednotné úmluvy Organizace spojených národů o omamných látkách z roku 1961 nebo podle Úmluvy Organizace spojených národů o psychotropních látkách z roku 1971, ale která může představovat srovnatelnou hrozbu pro veřejné zdraví jako látky uvedené v těchto úmluvách³.

Problematika NPS je řešena na celoevropské úrovni. Rada Evropské unie přijala v červnu 1997 Společný postup v oblasti nových syntetických drog (Joint Action on New Synthetic Drugs), jehož cílem bylo zajišťovat co nejlepší a nejrychlejší informovanost o syntetických drogách, jež se nově vyskytnou ve státech EU. Dokument se vztahoval na syntetické drogy nepodléhající kontrole podle mezinárodních úmluv, viz výše. Na základě Společného postupu byl vytvořen tzv. systém včasného varování před novými drogami (EWS, z angl. Early Warning System on New Synthetic Drugs), který je koordinován Evropským monitorovacím střediskem pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA, z angl. European Monitoring centre for Drugs and Drug Addiction) a Europol⁴.

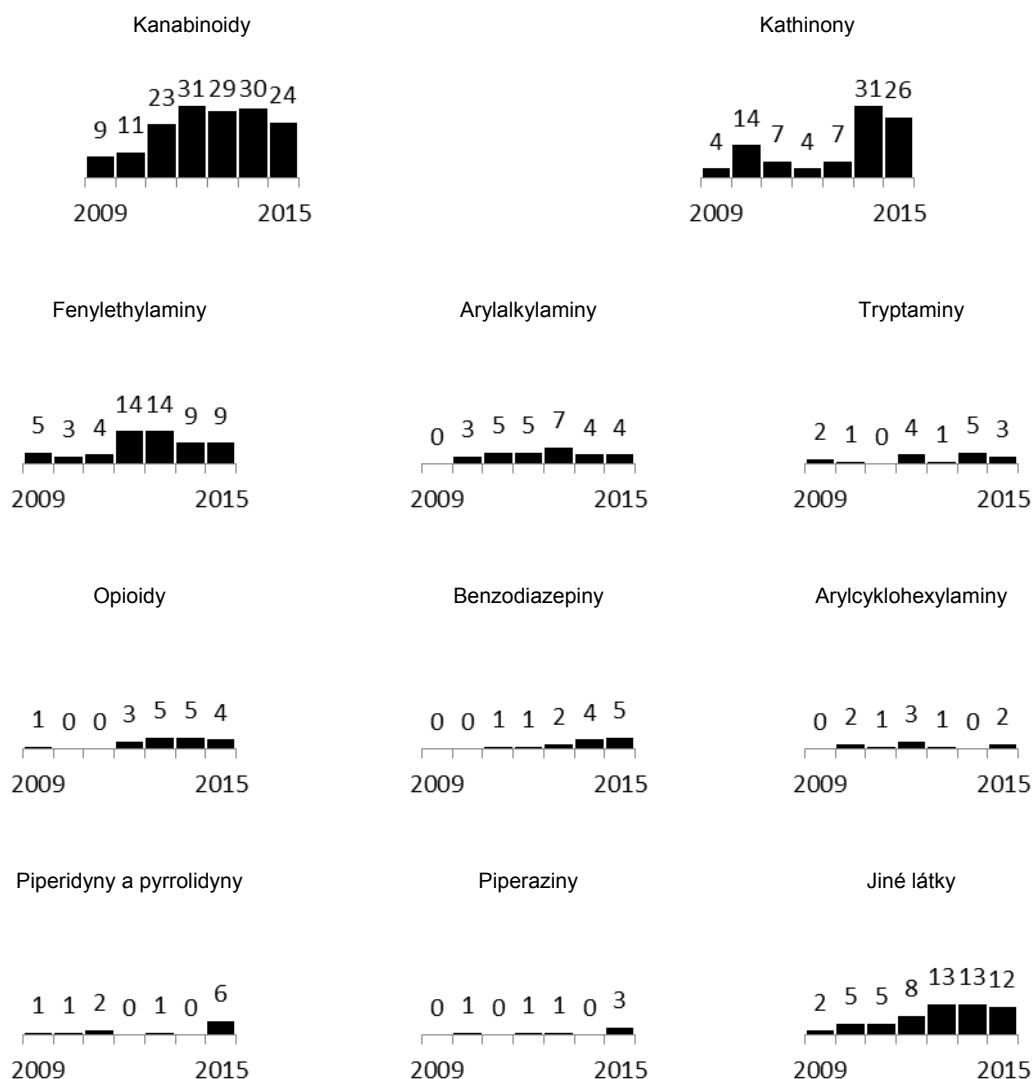
V roce 2005 byl Společný postup proti novým syntetickým drogám nahrazen rozhodnutím Rady o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových psychoaktivních látek, jenž se vztahuje nejen na nové syntetické látky, které nejsou zahrnuté v mezinárodních úmluvách, ale i na obecně nové omamné a psychotropní látky včetně veterinárních či humánních léčivých přípravků, které nejsou kontrolovány mezinárodními úmluvami, a také znovuobjevení se některých starých psychotropních látek a/nebo vysoce rizikových způsobů užívání drog⁴.

3. Hlavní skupiny NPS

EMCDDA monitoruje značnou škálu NPS, které dělí podle struktury nebo funkce do jedenácti skupin (obr. 1)². Počet NPS se každým rokem zvyšuje. Pro představu – v r. 2015 bylo do EWS nahlášeno 98 NPS, čímž se jejich počet zvýšil na více než 560, (70 % bylo zjištěno v posledních pěti letech). Nejpočetnějšími skupinami hlášených látek jsou syntetické kanabinoidy, katinony a fenylethylaminy.

3.1. Syntetické kanabinoidy

Syntetické kanabinoidy (SK) představují největší procentuální podíl zachycených NPS. Většina těchto látek

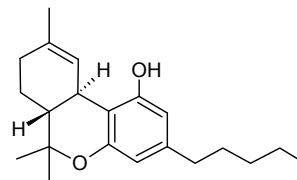


Obr. 1. Počet a kategorie nových psychoaktivních látek poprvé hlášených do systému včasného varování EU, 2009–2015 (převzato z práce²)

byla původně připravena jako léčiva, proto je jejich název spojen se jmény vědců a institucí kde byly připraveny (př. JWH-200 – Dr. John William Huffman; CP-47,497 – Charles Pfizer; HU-210 – Hebrew University)⁵. Jsou agonisté kanabinoidních receptorů (CB_1 a CB_2), vykazují tedy podobné účinky jako Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC, psychoaktivní látka marihuany, obr. 2). Popularitu mezi uživateli získaly v návaznosti na legislativní omezování marihuany. Na trhu se začaly objevovat kolem roku 2008 jako vykuřovadla balená v pestrobarevných sáčcích převážně s názvem *Spice* a popiskou „nevhodné k lidské spotřebě“^{6,7}.

Z chemického hlediska jsou SK velmi různorodé, nemají řádně prostudovanou farmakologii a toxikologii.

Řada z nich však vykazuje vyšší afinitu ke kanabinoidním receptorům než Δ^9 -THC, jejich účinky proto mohou být silnější a užívání nebezpečnější ve srovnání s marihuanou.



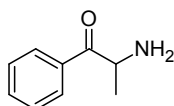
Obr. 2. Strukturní vzorec Δ^9 -tetrahydrokanabinolu

V souvislosti s užitím SK byla popsána široká škála nežádoucích psychoaktivních účinků, např. úzkostné stavy, psychózy, změna vnímání času a prostoru, poruchy paměti, problémy s koncentrací. Fyziologické účinky SK se značně liší, byly popsány sedativní účinky, ale také neklid, nevolnost, návaly horka, pálení očí, suchost v ústech, třes a bušení srdce. Dlouhodobé užívání *Spice* produktů vedlo k rozvoji tolerance a abstinenci syndromu^{8,9}.

3.2. Syntetické katinony

Syntetické katinony jsou různorodou skupinou derivátů přírodního katinonu (obr. 3). Katinon je monoaminový alkaloid obsažený ve stromu kata jedlá (*Catha edulis*), který je chemicky podobný amfetaminům. Stimuluje centrální nervovou soustavu a způsobuje uvolnění katecholaminů z presynaptických úložišť do oblasti centrální nervové soustavy a periferního nervového systému. Za obměňováním struktury katinonu byla snaha připravit deriváty se stejným nebo vyšším farmakologickým účinkem. V původní struktuře jsou měněny délky alkylových řetězců, počty alkylů na dusíku, nahrazují se alkyly na aromatickém jádře za halogeny. Další možností je celková záměna benzenu za jiné aromatické jádro (thiofen, naftalen). Tímto způsobem vznikl např. mefedron, methylon, butylon, fletedron a MDPV¹⁰.

Katinony se prodávají především v krystalické formě jako koupelové soli (bath salt). V internetových obchodech se dají koupit např. pod anglickými názvy *Bliss*, *Magic*, *Meow Meow* nebo *Zoom*, ovšem opět s poznámkou „ne pro lidskou spotřebu“, „rostlinné potraviny“ a „insekticidy“. Takovéto označení brání v zakročení bezpečnostními agenturám a zmíněné látky se stávají snadno dostupnými¹¹. Syntetické katinony mohou být užívány orálně, intranasálně, intravenózně nebo rektálně.



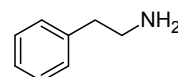
Obr. 3. Strukturní vzorec katinonu

Všechny deriváty katinonu mají podobné účinky jako kokain a metamfetamin, které stimulují uvolňování a inhibují zpětné vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu. Přesný mechanismus účinku je předmětem výzkumu. Farmakokinetika je vzhledem k proměnlivému složení „koupelových solí“ nepředvídatelná. Důsledkem užívání těchto látek může být halucinace, paranoia, neklid, euforie, sebevražedné myšlenky, ale také poruchy srdečního rytmu, hypertenze nebo špatné prokrvení periferních tkání. Publikovány byly také závažné komplikace, jako je například selhání ledvin, sebevraždy, vraždy a smrt^{11,12}.

3.3. Fenylethylaminy

Do této skupiny spadají NPS odvozené od strukturního motivu fenylethylaminu (obr. 4). Fenylethylamin je látka vyskytující se nejen v lidském organismu, ale i v řadě přírodních produktů a potravinách. Tento biogenní amin nevykazuje psychoaktivní účinky. V organismu vzniká metabolickou přeměnou z aminokyseliny fenylalaninu a následně podléhá dalším metabolickým přeměnám působením enzymu monoaminoxidasy a dopamin- β -hydroxylasy¹².

Deriváty fenylethylaminu jsou zneužívány na celém světě. Jedná se o širokou skupinu látek, do které spadá přinejmenším 200 různých syntetických derivátů¹³. Velké množství možných modifikací samostatného aromatického jádra, substituentů na aromatickém jádře, postranního řetězce či substituce na atomu dusíku vedla a v budoucnosti povede k možnosti získat stovky až tisíce velmi účinných sloučenin¹⁴.



Obr. 4. Strukturní vzorec fenylethylaminu

Nejrozšířenějšími látkami z této skupiny jsou extáze (MDMA) a její analoga 3,4-methylenedioxyamfetamin (MDA) a 3,4-methylenedioxyethylamfetamin (MDEA), dále pak stimulanty amfetamin a metamfetamin. Poslední dvě jmenované látky byly již za 2. světové války součástí balíčků pro přežití u leteckých jednotek. Díky stimulačním účinkům měly zvýšit bojeschopnost vojáků¹⁵.

V Evropě byl zaznamenán především výskyt látek ze skupiny tzv. 2C's (2C-B, 2C-D, 2C-E, 2C-I, 2C-B-Fly, 2C-T-7) a substituované deriváty amfetaminu (DOB, DOI, DOC). Řada výše uvedených látek je často vydávána za jinou drogu s velice podobnými účinky. V posledních letech je na drogové scéně vysoký nárůst podvodů, kdy jsou tablety vydávány za extázi, avšak tyto prodávané tablety obsahují jiné psychoaktivní látky¹⁶.

Látky z této skupiny vyvolávají u lidí senzoricko-percepční (změněné vnímání barev, zvuků, čichu), psychické (značně proměnné a často protichůdné změny psychiky) a somato-motorické příznaky (stavy slabosti, třes, zvracení)¹⁵. V některých případech bylo užití fenylethylaminů spojeno se závažnými nežádoucími reakcemi, a některé z nich dokonce se smrtí¹³.

4. Metody detekce nových syntetických látek

Vznik stále nových psychoaktivních látek na rekreačním drogovém trhu je neustálou výzvou pro analytické toxikology. Přestože většina nových látek může způsobit vážné toxicity, nejsou NPS rutinně detegovatelné běžně zavedenými analytickými metodami. Jako klíčová se pak

ukazuje identifikace hlavních prokázaných metabolitů v poměrně komplikované matici¹⁷.

Imunochemické techniky zaměřené na klasické drogy (kokain, opiáty, benzodiazepiny, THC) nedetegují většinu nových psychoaktivních látek. V těchto imunochemických testech, založených na interakci protilátky s antigenem (stanovovaná droga), hraje významnou roli protilátka, která musí vykazovat dostatečnou citlivost a specifitu vůči stanovovanému antigenu¹⁸. Drobná strukturní změna v molekule antigenu (NPS) může negativně ovlivnit jeho reaktivitu s protilátkou proti původnímu antigenu a tím pádem způsobit negativní výsledek testu. Při porovnání struktury NPS a tradičních drog, lze vidět větší či menší strukturní variabilitu, která vysvětluje, proč jsou testy na klasické drogy nevhodné pro stanovení nových drog.

U sofistikovanějších metod, jako je hmotnostní spektrometrie, nelze NPS identifikovat z důvodu chybějících referenčních hmotnostních spekter v používaných knihovnách. Pokud se tedy objeví neznámá látka, nejprve musí být objasněna její struktura díky kombinaci informací z různých spektroskopických, hmotnostně spektrometrických a chemických metod¹⁹. Laboratoře pracující v oboru klinické a soudní toxikologie tak získají novou referenční látku a poté mohou buď aktualizovat stávající metody, nebo vyvinout nové, které pokryjí i novou psychoaktivní látku²⁰.

4.1. Screening syntetických kanabinoidů

Zvyšující se popularita NPS a rizika spojená s jejich užíváním vedla k vývoji rychlých metod pro detekci syntetických kanabinoidů v různých matricích (orální tekutiny, moč, sérum/plazma, vlasy, bylinné směsi). Pro rychlé orientační testování na bázi LFIA (Lateral Flow Immunoassay), využitelné v diagnostice intoxikací ve zdravotnictví či při dopravních kontrolách řidičů, existuje na trhu několik komerčních souprav. Tyto testy poskytují pouze kvalitativní informaci o přítomnosti či nepřítomnosti drogy.

Pro laboratorní podmínky je vhodnější imunoanalytická metoda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), kterou lze v určitých případech použít i ke kvantifikaci drog. V literatuře je popsáno několik ELISA k detekci vybraných syntetických kanabinoidů v moči či orálních tekutinách^{21–24}. Jsou dostupné také komerční ELISA soupravy, jež jsou určeny pro analýzu kanabinoidů z plně krve, séra nebo moči (firma Neogen, Randox). Úskalím všech těchto metod je to, že jsou schopny detegovat pouze vybrané strukturní typy syntetických kanabinoidů a nedetegují nedávno objevená analoga (např. QUPIC nebo CHMINACA).

Pro konfirmaci pozitivních nálezů screeningových testů se využívají chromatografické metody. Identifikace a kvantifikace syntetických kanabinoidů v bylinných směsích se nejčastěji provádí plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS). Biologické vzorky jako moč, krev, sérum, sliny nebo vlasy bývají analyzovány technikou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS)^{20,25}.

4.2. Detekce kathinonů a fenylethylaminů

Existuje několik komerčních LFIA a ELISA souprav (od firem Imunalysis, Neogen, Randox, OraSure) pro stanovení amfetaminu, metamfetaminu – drog natolik rozšířených, že je lze v dnešní době chápat spíše za klasické. V nedávné době firma Randox představila dva ELISA kity pro detekci kathinonů (MDPV a mefedron/metkatinon ELISA kit). Výsledky studie zaměřené na testování specifity komerčních ELISA souprav (16 typů, zahrnujících MDPV a mefedron/metkatinon ELISA) však odhalily, že valná většina kitů, přestože obsahuje polyklonální protilátky, je vysoce specifická pouze na určitý strukturní typ²⁶.

Nejběžnější instrumentální metodou pro detekci kathinonů a fenylethylaminů je plynová chromatografie (GC) spojená s detekčním systémem k potvrzení struktury (např. hmotnostní spektrometr (MS) nebo infračervený detektor (IRD)). Tato kombinace je důležitá, protože během GC se látky ve směsi oddělí podle velikosti, ale teprve MS/IRD pomůže identifikovat látky podle různých funkčních skupin²⁷. K identifikaci a kvantifikaci vzorků z vlasů, krve (i posmrtně), séra, plasmy, mozkomíšního moku nebo moči lze použít nejen metody GC ale také LC-MS/MS^{19,20,28}.

5. Závěr

Nové psychoaktivní látky představují stále populárnější formu rekreačních návykových látek, zejména u dospívajících osob. Tento fenomén má vzrůstající tendenci a lze očekávat nelegální syntézu stovek dalších látek s těžko odhadnutelnou toxicitou. V poslední době se do popředí dostávají především látky ze skupiny syntetických kanabinoidů, syntetických kathinonů a fenylethylaminů. Tyto syntetické látky představují modifikované struktury ilegálních nebo kontrolovaných substancí, nejsou detegovatelné běžnými screeningovými metodami a velmi často jsou spojeny s různými zdravotními následky, které mohou vést až ke smrti. Včasná detekce NPS je tedy velmi potřebná. Kromě tradičních instrumentálních metod jako je LC/MS nebo GC/MS bylo v souvislosti s analýzou syntetických kanabinoidů, kathinonů a fenylethylaminů vyvinuto několik uživatelsky nenáročných imunochemických metod, které jsou schopny detegovat alespoň některé zástupce těchto skupin.

Tato práce byla podpořena projektem bezpečnostního výzkumu Ministerstva vnitra (projekt VI20172020056). Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT No 20-SVV/2016).

LITERATURA

1. King L. A., Kicman A.T.: *Drug Test. Anal.* 3, 401 (2011).
2. EMCDDA: *European Drug Report 2016: Trends and Development*. Publications Office of the European

- Union, Luxembourg 2016.
3. Rozhodnutí rady 2005/387/JVV o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových psychoaktivních látek. Úřední věstník Evropské unie, článek 3, str. 33.
 4. Mravčík V., Běláčková V., Drápalová V., Zábranský T. (ed.): *Nové psychoaktivní látky v České republice: výskyt, rizika a související opatření*. Klinika adiktologie 1. LF UK v Praze a VFN v Praze 2015.
 5. Kuchař M.: *Drugs Forensics Bull* 4, 25 (2012).
 6. Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda Y.: *Forensic Sci. Int.* 198, 31 (2010).
 7. Dresen S., Ferreiroos N., Pütz M., Westphal F., Zimmermann R., Auwärter V.: *J. Mass Spectrom.* 45, 1186 (2010).
 8. Seely K. A., Lapoint J., Moran J. H., Fattore L.: *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 234 (2012).
 9. Rosenbaum C. D., Carreiro S. P., Babu K. M.: *J. Med. Toxicol.* 8, 15 (2012).
 10. Hegrová M., Řezanková K., Kuchař M., Řezanka P.: *Chem. Listy* 110, 200 (2016).
 11. Khullar V., Jain A., Sattari M.: *J. Gen. Intern. Med.* 29, 1200 (2014).
 12. Kuchař M., v knize: *Klinická adiktologie* (Pokorný M., ed.), část 1, kap. 3. Grada Publishing, a.s., Praha 2015.
 13. Caudevilla-Gállico F., Riba J., Ventura M., González D., Farré M., Barbanoj M. J., Bouso J. C.: *J. Psychopharmacol.* 26, 1026 (2012).
 14. Doležal M.: *Prakt. Lékáren.* 4, 170 (2012).
 15. Fusek J., v knize: *Vojenská toxikologie* (Patočka J., ed.), kap. 5. Grada Publishing, a.s., Praha 2004.
 16. Páleníček T.: *Zaostřeno na drogy* 4, 1 (2010).
 17. Hajkova K., Jurasek B., Sykora D., Palenicek T., Miskatková P., Kuchar M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1171 (2016).
 18. Goselová S., Blažková M., Holubová B., Karamonová L., Rauch P.: *Chem. Listy* 108, 114 (2014).
 19. UNODC: Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials. United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna (2013).
 20. Peters F. T., Meyer R., v knize: *Novel Psychoactive Substances*, kap. 6. Elsevier, Amsterdam 2013.
 21. Namera A., Kawamura M., Nakamoto A., Saito T., Nagao M.: *Forensic Toxicol.* 33, 175 (2015).
 22. Arntson A., Ofsa B., Lancaster D., Simon J., McMullin M., Logan B.: *J. Anal. Toxicol.* 37, 284 (2013).
 23. Mohr A., Ofsa B., Keil A., Simon J., McMullin M., Logan B.: *J. Anal. Toxicol.* 38, 427 (2014).
 24. Rodrigues W., Catbagan P., Rana S., Wang G., Moore, C.: *J. Anal. Toxicol.* 37, 526 (2013).
 25. Debruyne D., Le Boisselier R.: *Subst. Abuse Rehabil.* 6, 113 (2015).
 26. Swortwood M. J., Hearn W. L., DeCaprio A. P.: *Drug Test. Anal.* 6, 716 (2013).
 27. Banks M. L., Worst T. J., Rusyniak D. E., Sprague J. E.: *J. Emerg. Med.* 46, 632 (2014).
 28. Ellefsen K. N., Anizan S., Castaneto M. S., Desrosiers N. A., Martin T. M., Klette K. L., Huestis M. A.: *Drug Test. Anal.* 6, 728 (2014).

L. Fojtíková^a, B. Holubová^a, and M. Kuchař^b
^{(^a Department of Biochemistry and Microbiology, ^b Department of Chemistry of Natural Compounds, ^c Forensic Laboratory of Biologically Active Substances, University of Chemistry and Technology, Prague): **New Psychoactive Substances**}

The presented review demonstrates that new psychoactive substances represent an increasingly popular form of recreational drugs. In recent years, primarily substances from the group of synthetic cannabinoids, synthetic cathinone and phenethylamines come to the fore. These synthetic substances pose a significant health risk for users and their early detection is desirable. Besides traditional instrumental methods, such as LC/MS or GC/MS, several user-friendly immunochemical methods were developed in connection with the analysis of synthetic cannabinoids, cathinones and phenethylamines, which can detect at least some members of these groups.

INTERAKCE ŽLUČOVÝCH KYSELIN A PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ

ŠÁRKA HORÁČKOVÁ, ANDREA
MÜHLHANSOVÁ a MILADA PLOCKOVÁ

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Fakulta potravinářské
a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-
technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
sarka.horackova@vscht.cz

Došlo 15.8.16, přijato 29.8.16.

Klíčová slova: probiotika, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,
žluč, hydrolasa žlučových solí

Obsah

1. Úvod
2. Žluč a žlučové kyseliny
3. Obranné mechanismy buňky vůči žluči
4. Hydrolasa žlučových solí
5. Význam mikrobiální hydrolasy žlučových solí pro hostitele
6. Závěr

1. Úvod

Probiotika jsou mikroorganismy, které po podání v dostatečném množství účinkují pozitivně na zdraví hostitele¹. Výběr probiotických mikroorganismů probíhá na základě zkoumání celé řady vlastností zahrnujících bezpečnostní, funkčně-zdravotní a technologická kritéria². Jedním ze základních požadavků je schopnost přežívat podmínky trávicího traktu v takové koncentraci, která umožní jejich působení v gastrointestinálním traktu (GIT). Jednou ze stěžejních vlastností probiotických mikroorganismů je tolerance ke žluči. Za normálních fyziologických podmínek se může v lidském tenkém střevě vyskytovat gradient koncentrace žlučových solí od 40 mmol l⁻¹ k méně než 1 mmol l⁻¹ (2–0,05 %)³. Někteří autoři uvádějí hodnoty pouze v rozmezí 2–1,5 % v první hodině trávení s následným poklesem na hodnotu 0,3 % (cit.⁴). Kromě normální fyziologické funkce pro trávení tuků zajišťuje žluč svojí toxicitou silnou antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům, které nejsou na přítomnost žlučových solí adaptovány.

2. Žluč a žlučové kyseliny

Žluč je žluto-zelená kapalná látka, která je syntetizována v játrech hepatocyty. Obsahuje žlučové kyseliny, cholesterol, fosfolipidy (hlavně fosfatidylcholin), pigment biliverdin a steroidní hormony. Z jater je transportována buďto přímo do dvanáctníku, nebo je dočasně skladována a zakoncentrována ve žlučníku. Po konzumaci potravy je žlučník vyprázdněn a žluč je vyloučena žlučovodem do dvanáctníku, kde slouží jako emulgátor a umožňuje trávení lipidů⁵.

Žlučové kyseliny a soli tvoří přibližně 50–60 % organických složek žluči. Primární žlučové kyseliny – kyselina cholová a chenodeoxycholová jsou rovněž syntetizovány *de novo* v játrech z cholesterolu (prakticky pouze z LDL částic) multienzymovým procesem. Klíčovým enzymem této metabolické dráhy je cholesterol-7-hydroxylasa, která katalyzuje přeměnu cholesterolu na 7 α -hydroxycholesterol. Na hydrofobní steroidní jádro je poté napojena aminokyselina glycin nebo taurin za vzniku hlavních molekul konjugovaných žlučových kyselin amfifilního charakteru (kyselina glykocholová, glykochenodeoxycholová, taurocholová a taurochenodeoxycholová). Pokud dojde k propojení s jinou aminokyselinou (např. leucinem nebo lysinem), jsou tyto konjugáty rychle hydrolyzovány pankreatickými karboxypeptidasami⁵. Poměr glyko-konjugovaných a tauro-konjugovaných kyselin je v lidské žluči 3:1 (cit.⁶). Konjugace kyselin aminokyselinami snižuje jejich pK, např. kyselina cholová má pK 6,4, zatímco kyselina glykocholová 4,4 (cit.⁷). Sekundární žlučové kyseliny vznikají ve střevě enzymovou činností mikroorganismů. Prvním krokem je odštěpení glycinu nebo taurinu za vzniku primárních žlučových kyselin a jejich následná transformace 7 α -dehydroxylací na kyselinu deoxycholovou a lithocholovou^{5,8} nebo 7 α -dehydrogenací – z kyseliny chenodeoxycholové vzniká 7-oxolithocholová, která epimerací může přecházet na kyselinu urodeoxycholovou⁹.

Lidská játra denně vyprodukují asi jeden litr žluči, avšak jen poměrně malé množství je z těla odvedeno. Zpětně je reabsorbováno kolem 95 % žlučových kyselin a asi 5 % je vyloučeno stolicí a musí být syntetizovány znovu¹⁰, čímž se organismus může zbavovat cholesterolu⁶. Žlučové kyseliny se za normálních podmínek dostávají zpět do jater procesem enterohepatální cirkulace, což je proces sekrece žlučových kyselin z jater do žluči a dále do střeva s následnou reabsorpcí¹¹. Reabsorpce – pasivní difuze probíhá podél celého střeva a aktivní transport pak v terminálním ileu⁶.

3. Obranné mechanismy buňky vůči žluči

Většina probiotických bakterií, které jsou v současné době používány v potravinách či doplňcích stravy, patří mezi rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Byla publikována celá řada prací zabývajících se jejich schopností tolerance a růstu v přítomnosti žlučových solí^{12,13}. Tato vlastnost je kmenově specifická a nelze říci, který druh bakterií je při přítomnosti žlučových solí odolnější. Odolnost bakterií či zlepšení jejich růstu v přítomnosti žlučových solí ovlivňuje pH, teplota a další faktory (např. charakteristika membrán buněk)¹⁴.

Existuje několik mechanismů, které mohou tuto toleranci vysvětlovat. Prvním z nich je aktivní vypuzování žlučových solí, které se hromadí v cytoplasmě prostřednictvím efluxní pumpy. Bylo popsáno několik transportérů u kmenů *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. longum* a *B. breve* odpovědných za toleranci ke žluči^{15,16}. Buňka může k vylučování využívat případně také proton-motivní sílu⁷. Další možnosti jsou změny ve složení lipidů bakteriálních membrán u buněk, které byly vystaveny působení žlučových solí¹⁷. Tyto změny jsou kmenově specifické a jejich výsledkem jsou alterace ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, které mohou přispívat ke snížení difuze žlučových solí^{17,18}. Změny v morfologii buněk byly potvrzeny i skenovací a transmisí elektronovou mikroskopií. Buňky (*L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200) kultivované v prostředí hovězí žluči se prodlužovaly a vykazovaly nepravidelnosti a svaštění buněčné stěny. Kromě toho se výrazně snižovala hydrofobita povrchu buněk, autoagregační a koagregační schopnosti pravděpodobně kvůli detergentnímu účinku žlučových solí na mastné kyseliny na povrchu buněčné stěny. Dále byla také snížena adhezní schopnost ke střevním buněčným liniím HT29MTX. Předpokládá se, že byla narušena produkce jednoho nebo i několika adhezivních proteinů¹⁹. U kmenů *L. brevis* byl významně zvýšen relativní obsah kyseliny olejové v buněčných lipidech, pokud byla ke kultivačnímu médiu MRS přidána žluč²⁰. Bustos a spol.²¹ prokázali rozdílnou syntézu 25 bílkovin jako odpověď na přítomnost žlučových kyselin. Hlavní funkční kategorie přiřazené těmto bílkovinám byly metabolismus nukleotidů a glycerolipidů, transkripce a translace, pH homeostáze a stresová odpověď.

Ochrannou funkci mohou plnit také další povrchové struktury buněk, jako je exopolysacharidová vrstva^{20,22} nebo tzv. S-vrstva u laktobacilů. Bylo potvrzeno, že gen zodpovědný za produkci S-vrstvy u *L. acidophilus* ATCC 4356, *slpA*, byl indukován v přítomnosti žluči o koncentraci v rozmezí 0,01–0,05 % (cit.²³). Zvýšená produkce exopolysacharidů v přítomnosti žluči byla potvrzena i u *B. animalis* subsp. *lactis*²⁴.

Přítomnost žlučových solí hraje významnou roli rovněž ve změnách vlastností, povrchových struktur a expresi genů povrchových bílkovin u patogenních mikroorganismů gastrointestinálního traktu, jako jsou *Shigella* spp.²⁵, *Listeria monocytogenes*²⁶, *Campylobacter jejuni*²⁷. Při analýze 37 membránových proteinů u *Bacteroides fragilis*

bylo zjištěno, že 8 z nich je syntetizováno pouze v přítomnosti žlučových solí²⁸. Podrobný souhrnný článek o ovlivnění životního cyklu a kolonizační rezistence vůči *Clostridium difficile* v přítomnosti sekundárních žlučových solí zpracovali Winston a Theriot²⁹.

4. Hydrolasa žlučových solí

Velká pozornost v souvislosti s růstem probiotik v přítomnosti žlučových solí je věnována aktivitě enzymu hydrolasa žlučových solí, která se dává i do souvislosti s terapeutickým účinkem těchto mikroorganismů ke snižování obsahu sérového cholesterolu. Přítomnost BSH enzymu byla zjištěna u několika bakteriálních rodů pocházejících z trávicího traktu, jako např. u kmenů bakterií *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*, *E. coli*^{30,31}, *Enterococcus* spp.³², *Eubacterium* spp.³³. I když většina autorů se zabývá přítomností tohoto enzymu především u Gram pozitivních bakterií izolovaných z trávicího traktu, byl tento enzym potvrzen i u mikroorganismů získaných z fermentovaných mléčných výrobků, syrového kravského mléka, horkých pramenů či fermentované zeleniny³⁴.

Hydrolasa žlučových solí (BSH – bile salt hydrolase), nebo také choloylglycin hydrolasa (EC 3.5.1.24) je konstitutivní, intracelulární enzym, který katalyzuje hydrolýzu amidové vazby, dochází k uvolnění připojené aminokyseliny (glycin, taurin) od steroidního jádra žlučové kyseliny^{5,35}. Enzym je klasifikován jako N-koncová nukleofilní hydrolasa, na N-konci enzymu je cysteinový zbytek, jehož thiolová skupina je katalyticky aktivním místem⁶. Kromě cysteinu 2 se na aktivním centru tohoto enzymu podílejí aminokyseliny arginin 18, kyselina asparagová 21, asparagin 175 a arginin 228. BSH enzym vykazuje vysoký stupeň podobnosti v aminokyselinové sekvenci s penicillin V amidasou (EC 3.5.1.11) izolovanou z *Bacillus sphaericus*³⁶. Optimální podmínky působení tohoto enzymu se mohou mírně lišit v závislosti na jeho zdroji. Taranto a spol.³⁷ zjistil, že optimální pH enzymu je 4,5–5,5 a optimální teplota 37–45 °C pro *L. reuteri*. Přídavek Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} a Hg^{2+} iontů měl za následek snížení aktivity enzymu na 46–0 %. Jako významné inhibitory BSH aktivity u kmene *L. acidophilus* PF01 byly identifikovány některé látky používané jako aditiva v krmivářském průmyslu (KIO_3 , $NaHIO_3$, $NaIO_4$, $CuSO_4$, $CuCl_2$), dále riboflavin či některá antibiotika, kde dosahovala inhibice téměř 100 % (cit.³⁸). Jiný zdroj³³ udává optimální pH 7 a teplotu 37 °C pro *L. buchneri* ATCC 4005. Při navýšení teploty aktivita prudce klesala a při 60 °C byla téměř nulová. Pro produkci enzymu byla optimálním zdrojem uhlíku sacharosa a maltosa a optimálním zdrojem dusíku směs peptonu a kvasničného extraktu. Produkce BSH enzymu u laktobacilů je vyšší ve stacionární fázi růstu než ve fázi exponenciální^{37,39}. Hydrolasa žlučových solí působí na široké spektrum vázaných žlučových kyselin⁴⁰. Celá řada autorů se shoduje, že tento enzym vykazuje

vyšší substrátovou specifitu ke glyko-konjugovaným kyselinám než k tauro-konjugovaným^{37,39,41}.

Přítomnost a uspořádání genů kódujících BSH enzym je u laktobacilů a bifidobakterií velmi variabilní. Analýzou genů u vybraných kmenů rodu *Bifidobacterium* se zabývá několik studií^{42,43}. U některých druhů laktobacilů byl zjištěn pouze jeden gen – *L. fermentum*⁴⁴, *L. casei*⁴⁵, *L. gasseri*⁴⁶. Naproti tomu 2 geny byly potvrzeny u *L. acidophilus* NCFM (*bshA* a *bshB*)⁴⁷ a *L. johnsonii*⁴⁸. U *L. salivarius* se uvádějí 2 geny⁴⁹, ale jiní autoři⁴⁶ pouze 1 gen. U *L. plantarum* se prokázala přítomnost 4 různých genů pro BSH aktivitu^{50,51}.

Přesná funkce BSH enzymu není zcela objasněna. Dekonjugované žlučové soli vykazují silnou antimikrobiální aktivitu v porovnání se žlučovými solemi syntetizovanými hostitelem. Samotná kyselina cholová může být více toxická vůči buňce než její konjugované deriváty, je více hydrofobní a může volně vstupovat do buněk⁵². Dekonjugace žlučových solí uvolňuje protony, a tím způsobuje intracelulární acidifikaci a poškození DNA⁵. V buňkách se pak obecně aktivují systémy odpovědi na oxidační stres⁵³. Nekonjugované kyseliny jsou ale slabší kyseliny (viz výše), a tak zachycení současně transportovaných protonů může působit proti poklesu pH probíhajícímu v prostředí žluči⁵.

Nejčastěji se v souvislosti s BSH aktivitou uvádějí následující možné výhody pro produkční kmen:

1. Nutriční funkce – aminokyseliny uvolněné po dekonjugaci mohou sloužit jako potenciální zdroje uhlíku, dusíku a energie, výhodou je to zejména pro hydrolytické kmeny bakterií^{5,6,35}. U probiotických bakterií nebylo prokázáno využití steroidního jádra žlučových kyselin. Jejich biotransformace však může probíhat pomocí jiných bakterií přítomných v GIT^{9,36}.

2. Detoxikace žluči – může hrát roli v toleranci bakterií ke žluči a tedy i v přežívání podmínek trávicího traktu. Protože nedisociované formy žlučových solí mohou vykazovat toxicitu, která je způsobena intracelulárním okyselením podobným jako u organických kyselin, předpokládá se, že bakterie s pozitivní aktivitou BSH mají schopnost se chránit proti tomuto vlivu tvorbou vedlejších produktů^{4-6,35}. Jak ale bylo uvedeno výše, volné žlučové kyseliny (kyselina cholová a deoxycholová) mohou být více toxické než jejich konjugované deriváty. Proto se někteří autoři přiklání k vysvětlení, že je dekonjugace spíše antagonistickou reakcí k podpoře autochtonních mikroorganismů GIT proti patogenům³⁴. Nicméně dalším předpokladem podporujícím teorii detoxikace je, že produkty dekonjugace za nízkého pH (vytvořeného např. působením bakterií mléčného kvašení) v intestinálním traktu precipitují^{5,6}. Byly ale rovněž publikovány práce^{54,55}, které nepotvrzují korelaci mezi BSH aktivitou a tolerancí ke žluči. Také ne všechny mikroorganismy gastrointestinálního traktu vykazují aktivitu BSH enzymu a jsou přitom schopné přežít průchod GIT a vykazovat růst¹².

3. Změna složení membránových lipidů – může usnadňovat inkorporaci (adsorpce nebo absorpce) cholesterolu nebo žluči na bakteriální membránu^{14,56}, čímž se zvyšuje její pevnost, mění se propustnost nebo náboj, a to

může ovlivnit citlivost k α -defensinům či jiným obranným molekulám hostitele. Tento mechanismus může být důležitý pro vytvoření případné perzistentní infekce^{5,6}.

5. Význam mikrobiální hydrolasy žlučových solí pro hostitele

Z výše zmíněných zkoumaných funkcí přisuzovaných BSH enzymu je zřejmé, že neméně sledovaná bude i problematika vlivu jeho působení na hostitele. V současné době se stále více studují mechanismy, které napomáhají v této souvislosti k redukci hladiny sérového cholesterolu. Způsob snižování hladiny cholesterolu přímo souvisí s dekonjugací žlučových solí katalyzovanou tímto enzymem. Volné dekonjugované žlučové kyseliny jsou méně rozpustné a hůře resorbovatelné v intestinálním traktu, a tak jsou v této formě vyloučeny z těla. Toto vyloučení vede ke snížení koncentrace žlučových solí a následnou reakcí organismu je pak nová syntéza žlučových solí právě z cholesterolu, čímž dochází k redukci hladiny sérového cholesterolu^{5,6,13,39,57}. Popsaný mechanismus působení na hladinu sérového cholesterolu je srovnatelný s léčbou pomocí cholestaminu. Terapie pomocí probiotik s BSH aktivitou může být tedy pokládána za „biologickou“ alternativu běžné léčby³³. Prováděné studie většinou potvrzují schopnost probiotických bakterií snižovat obsah cholesterolu⁵⁸, ale např. u randomizované studie na 156 dobrovolnících nebyly účinky probiotických kmenů *L. acidophilus* La5 a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 na hladinu cholesterolu a triglyceridů potvrzeny⁵⁹.

Dekonjugace žlučových solí může mít ale i nežádoucí účinky. Pokud je tato reakce v tenkém střevě hostitele rozsáhlejší, mohla by vést k onemocnění zvaném steatorea (tzv. tuková stolice). Navíc zvýšené koncentraci sekundárních žlučových kyselin ve střevě se připisují i účinky podporující vznik kolorektálního karcinomu^{35,60} či žlučových kamenů, kdy změna poměru koncentrace žlučových solí a cholesterolu vede k precipitaci cholesterolu se solemi vápníku a žlučovými pigmenty⁸. Také se objevují teorie, že následnou modifikací dekonjugovaných žlučových solí mohou vznikat toxické sloučeniny, které naruší střevní mikroflóru, což může způsobovat průjemová onemocnění, záněty střevní sliznice a aktivovat karcinogeny ve střevě. Jako další negativní vlastnost se uvádí nižší emulzifikační schopnost dekonjugovaných žlučových kyselin než u konjugovaných, následkem čehož může docházet ke zhoršenému trávení lipidů a narušení absorpce mastných kyselin a monoglyceridů^{5,6,54}.

6. Závěr

Jak je patrné z výše uvedených skutečností, funkce enzymu BSH ještě není plně upřesněna. Zařazení jeho aktivity do žádaných vlastností probiotik by tedy mělo být provedeno s opatrností a po objasnění určitých nejasností souvisejících s tímto enzymem.

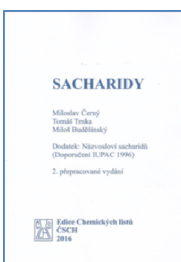
LITERATURA

1. FAO/WHO: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Canada (2002).
2. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., Mattila-Sandholm T.: *J. Biotechnol.* 84, 197 (2000).
3. Islam K. B., Fukiya S., Hagio M., Fujii N., Ishizuka S., Ooka T.: *Gastroenterology* 141, 1773 (2011).
4. Noriega L., Gueimonde M., Sánchez B., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C. G.: *Int. J. Food Microbiol.* 94, 79 (2004).
5. Begley M., Gahan C. G. M., Hill C.: *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625 (2005).
6. Begley M., Hill C., Gahan C. G. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729 (2006).
7. Philipp B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 903 (2011).
8. Noriega L., Cuevas I., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C. G.: *Int. Dairy J.* 16, 850 (2006).
9. Bortolini O., Medici A., Poli S.: *Steroids* 62, 564 (1997).
10. Patel A. K., Singhanian R. R., Pandey A., Chincholkar S. B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 166 (2010).
11. Lubanda H., Vecka M.: *Chem. Listy* 103, 40 (2009).
12. Vinderola C. G., Reinheimer J. A.: *Food Res. Int.* 36, 895 (2003).
13. Vizoso Pinto M. G., Franz Ch. M. A. P., Schillinger U., Holzapfel W. H.: *Int. J. Food Microbiol.* 109, 205 (2006).
14. Li G.: *Procedia Environ. Sci.* 12, 1180 (2012).
15. Ruiz L., Margolles A., Sánchez B.: *Frontiers Microbiol.* 4, 1 (2013).
16. Price C. E., Reid S. J., Driessen A. J., Abratt V. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 923 (2006).
17. Taranto M. P., Murga M. L. F., Lorca G., De Valdez G. F.: *J. Appl. Microbiol.* 95, 86 (2003).
18. Ruiz L., Sánchez B., Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilán C. G., Margolles A.: *FEMS Microbiol. Lett.* 274, 316 (2007).
19. Burns P., Reinheimer J., Vinderola G.: *Res. Microbiol.* 162, 782 (2011).
20. Suzuki S., Kimoto-Nira H., Suganuma H., Suzuki C., Saito T., Yajima N.: *Can. J. Microbiol.* 60, 183 (2014).
21. Bustos A. Y., de Valdez G. F., Raya R., Almeida A. M., Fadda S., Taranto M. P.: *Food Res. Int.* 77, 599 (2015).
22. Suzuki S., Yakabe T., Suganuma H., Fukao M., Saito T., Yajima N.: *Can. J. Microbiol.* 59, 549 (2013).
23. Khaleghi M., Kermanshahi R. K., Yaghoobi M. M., Zarkesh-Esfahani S. H., Baghizadeh A.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 749 (2010).
24. Madiedo P. R., Gueimonde M., Arigoni F., Reyes-Gavilán C. G., Margolles A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1204 (2009).
25. Prouty A. M., Schwesinger W. H., Gunn J. S.: *Infect. Immun.* 70, 2640 (2002).
26. Melo J., Schrama D., Hussey S., Andrew P. W., Faleiro M. L.: *Int. J. Food Microbiol.* 163, 51 (2013).
27. Dzieciol M., Wagner M., Hein I.: *Res. Microbiol.* 162, 991 (2011).
28. Boente R. F., Pauer H., Silva D., Filho J. S., Sandim V., Antunes L., Ferreira R., Zngali R. B., Domingues R., Lobo L. A.: *Anaerobe* 39, 84 (2016).
29. Winston J. A., Theriot C. M.: *Anaerobe* (2016), v tisku. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.003>.
30. Jarocki P., Podlesny M., Glibowski P., Targonski Z.: *PLoS One* 9, e114379 (2014).
31. Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T., Mireau I.: *J. Dairy Sci.* 82, 2530 (1999).
32. Chand D., Ramasamy S., Suresh C. G.: *Process Biochem.* 51, 263 (2016).
33. Sridevi N., Vishwe P., Prabhune A.: *Food Res. Int.* 42, 516 (2009).
34. Reyes-Nava L. A., Rivera-Expinoza Y., Herald J.: *Agric. Food Sci. Res.* 3, 49 (2014).
35. Tanaka H., Hashiba H., Kok J., Mireau I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2502 (2000).
36. Ridlon J. M., Kang D. J., Hylemon P.: *J. Lipid Res.* 47, 241 (2006).
37. Taranto M. P., Sesma F., Font de Valdez G.: *Biotechnol. Lett.* 21, 935 (1999).
38. Lin J., Negga R., Zeng X., Smith K.: *Pathogens* 3, 947 (2014).
39. Nguyen T. D. T., Kang J. H., Lee M. S.: *Int. J. Food Microbiol.* 113, 358 (2007).
40. Guo C. F., Zhang L. W., Han X., Li J. Y., Du M., Yi H. X., Feng Z., Zhang Y. C., Xu X. R.: *J. Dairy Sci.* 94, 1732 (2011).
41. Ramasamay K., Abdullah N., Wong M. C., Karuthan C., Ho Y. W.: *J. Sci. Food Agric.* 90, 65 (2010).
42. Kim G., Miyamoto C. M., Meighen E., Lee B. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5603 (2004).
43. Shuhaimi M., Ali A. M., Saleh N. M., Yazid A. M.: *Biotechnol. Lett.* 23, 1775 (2001).
44. Kumar R., Rajkumar H., Kumar M., Varikuti S. R., Athimamula R., Shujaiddin M., Ramagoni R., Kondapalli N.: *Mol. Biol. Rep.* 40, 5057 (2013).
45. Zhang W. Y., Wu R. N., Sun Z. H., Sun T. S., Meng H.: *Ann. Microbiol.* 59, 721 (2009).
46. Jiang J., Hang X., Zhang M., Liu X., Li D., Yang H.: *Ann. Microbiol.* 60, 81 (2010).
47. McAuliffe O., Cano R. J., Klaenhammer T. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4925 (2005).
48. Elkins C. A., Moser S. A., Savage D. C.: *Microbiology* 147, 3403 (2001).
49. Bi J., Fang F., Lu S., Du G., Chen J.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 96, 46 (2013).
50. Ren J., Sun K., Wu Z., Yao J., Guo B.: *J. Food Sci.* 76, 622 (2011).
51. Lambert J. M., Bongers R. S., de Vos W. M., Kleerebezem M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4719 (2008).
52. Oelschlaeger T. A.: *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57 (2010).

53. Whitehead K., Versalovic J., Roos S., Britton R. A.: Appl. Environ. Microbiol. 74, 1812 (2008).
54. Ahn Y. T., Kim G. B., Lim Y. S., Baek Y. J., Kim Y. U.: Int. Dairy J. 13, 303 (2003).
55. Moser S. A., Savage D. C.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 3476 (2001).
56. Miremadi F., Ayyash M., Sherkat F., Stojanovska L.: J. Funct. Foods 9, 295 (2014).
57. Lye H. S., Rahmat-Ali G. R., Liong M. T.: Int. Dairy J. 20, 169 (2010).
58. Ishimwe N., Daliri E. B., Lee B. H., Fang F., Du G.: Mol. Nutr. Food Res. 59, 94 (2015).
59. Ivey K. L., Hodgson J. M., Kerr D. A., Thompson P. L., Stojceski B., Prince R. L.: Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis. 25, 46 (2015).
60. De Boever P., Wouters R., Verschaeve L., Berckmans P., Schoeters G., Verstraete W.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 709 (2000).

Š. Horáčková, A. Mühlhanová, and M. Plocková
(Department of Dairy, Fat and Cosmetics, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Interaction between Bile Acids and Probiotic Microorganisms**

One of the most important properties of probiotic microorganisms, among which belong especially *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., is their ability to survive the conditions in gastrointestinal tract, i.e. low pH and tolerance to bile acids. The bacterial strains could use several different defend mechanisms against bile salts as are special transporters responsible for active efflux, alteration in properties of cell wall or different synthesis of surface proteins and fatty acids. Protective function can be fulfilled also by S-layer or by the increased exopolysaccharides production. Many bacteria present in gastrointestinal tract show the activity of bile salt hydrolase. This enzyme (choloylglycine hydrolase EC 3.5.1.24) is constitutive intracellular enzyme responsible for the hydrolysis of amide bond between glycine or taurine and steroid nucleus of bile acid. Bile salt hydrolase can bring several advantages to production strain, such as improvement of nutrition (use of released amino-acids), detoxication of bile or facilitation of cholesterol incorporation in the bacterial membrane which increases its strength or changes the membrane permeability. Bile salt deconjugation could also lead to a reduction of serum cholesterol in a host.



Miloslav Černý, Tomáš Trnka, Miloš Buděšínský

SACHARIDY, 2. přepracované vydání

Edice Chemické listy, Česká společnost chemická, Praha 2016

ISBN 978-80-86238-92-0, s. 319, cena 350 Kč

Tato učebnice sacharidů zahrnuje monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a jejich deriváty, jak přírodní, tak syntetické. Uvádí jejich strukturu a zabývá se jejich syntézou, chemickými, fyzikálními a popřípadě i biologickými vlastnostmi. V porovnání s prvním vydáním z roku 2010 je toto druhé vydání výrazně upraveno po stránce formální i věcné. Byly přidány některé podkapitoly týkající se biologicky aktivních neoglykoderivátů a rozšířena byla podkapitola Nukleární magnetická rezonance o nové metody měření spekter. Odkazy na literaturu jsou doplněny do konce roku 2016. Nově bylo jako dodatek připojeno Názvosloví sacharidů doporučené komisí IUPAC. Učebnice je k dostání na katedře organické chemie PřF UK Praha u Ing. M. Lorence nebo v sekretariátu České společnosti chemické, Novotného lávka 5, Praha 1.

EXTRAKTY AKO MODERNÁ LIEKOVÁ FORMA PRE PRÍRODNÉ LIEČIVÁ

SLAVOMÍR KURHAJEC^{a,b}, DANA SABADKOVÁ^b,
ALEŠ FRANC^b a DAVID VETCHÝ^b

^a Katedra farmakognózie a botaniky, Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, ^b Ústav technológie liek, Farmaceutická fakulta, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika
slavomir.kurhajec@uvlf.sk, vetchyd@vfu.cz

Došlo 13.4.16, prijaté 2.9.16.

Kľúčové slová: rastlinné extrakty, extrakčné metódy, prírodné látky

Obsah

1. Úvod
2. Rastlinné extrakty a ich rozdelenie
3. Prehľad extrakčných metód
 - 3.1. Soxhletova extrakcia
 - 3.2. Ultrazvukom urýchlená extrakcia
 - 3.3. Extrakcia plynnou fázou
 - 3.4. Extrakcia nadkritickými kvapalinami
 - 3.5. Tlakom urýchlená kvapalinová extrakcia
 - 3.6. Mikrovlnná extrakcia
 - 3.7. Mikroextrakcia tuhú fázou
 - 3.8. Extrakcia sorpčnými miešadielkami
 - 3.9. Disperzia matrice na tuhej fáze
 - 3.10. Extrakcia kvapalinou doplnená o extrakciu tuhú fázou
4. Budúce trendy extrakčných metód

1. Úvod

Rastlinné extrakty patria medzi historicky najstaršie liekové formy. Ich príprava pôvodne vychádzala z empirických postupov, ktoré boli súčasťou ľudových receptárov. S rozvojom lekárstva sa extrakty stávali súčasťou liekopisov a väčšina lekární využívala k ich príprave rôzne individuálne metódy. S rozvojom priemyslu sa produkcia extraktov stala predovšetkým súčasťou industriálnej výroby a magistraliter príprava sa z lekární prakticky vytratila. Súčasný trend uprednostňujúci prírodné liečivá však pozvoľna vedie k ich renesancii a rastlinné extrakty a ich metódy prípravy zostávajú stále neoddeliteľnou

súčasťou liekopisov. Cieľom tohto článku je vymedziť súčasnú podobu klasifikácie rastlinných extraktov v súlade s liekopismi a zdokumentovať metódy prípravy najdôležitejších priemyselných aj lekárenských princípov.

2. Rastlinné extrakty a ich rozdelenie

Extrakty sú prípravky tekutej, polotuhej alebo tuhej konzistencie získané extrakčnými metódami zvyčajne zo sušených rastlinných drog alebo zo živočíšneho materiálu¹. Droga je konzervovaná, upravená alebo neupravená rastlina, jej časť, prípadne produkt, slúžiaci k výrobe liečiv, technicky dôležitých látok alebo priamo používaný k liečivým, technickým alebo iným účelom². Extrakcii sa môžu podrobiť jednotlivé rastlinné či živočíšne drogy, prípadne ich zmesi. Samotnej príprave extraktov obvykle predchádza úprava použitého materiálu napríklad odtučnením či inaktivovaním enzýmov. Medzi najčastejšie používané extrahovadlá patria voda, etanol, propylénglykol, glycerol alebo ich zmesi³. Liekopis rozlišuje dva základné druhy extraktov. Patria sem štandardizované extrakty, ktoré sa upravujú pomocou inertných prísad na požadovaný obsah látok so známym liečebným účinkom a kvantifikované extrakty, ktoré sa pripravujú zmiešaním extraktov rôznych šarží na požadovaný obsah uvažovaných látok¹. Ostatné extrakty sú definované výrobným postupom a svojimi vlastnosťami.

3. Prehľad extrakčných metód

Extrakčné metódy možno rozdeliť na tradičné a moderné (tab. I). Tradičné techniky využívajú jednoduché a nenáročné zariadenia, no mnohokrát bývajú zdĺhavé a vyžadujú použitie väčšieho množstva rozpúšťadla. Pojmom moderné extrakčné metódy sú označované procesy, ktoré vznikli v posledných 20 rokoch so zámerom ušetriť čas a množstvo rozpúšťadla potrebného pre extrakciu so zachovaním rovnakej, prípadne väčšej efektívnosti procesu⁴. Podľa typu procesu sa rozdeľujú na periodické, kontinuálne a polokontinuálne. V periodických metódach sa národa drogy a vyluhovadla vkladá do extrakčného systému jednorázovo a extrakcia prebieha v uzavretom okruhu do rovnovážneho stavu. Medzi takéto metódy patrí macerácia, ktorá môže prebiehať pri izbovej ako aj pri zvýšenej teplote krátkodobo (30 min) alebo dlhodobo (po dobu 3 až 7 dní)⁵. Ďalej sú to infúzia a dekokcia, ktoré sa používajú hlavne na prípravu extraktov z liečivých drog alebo čajových zmesí na okamžitú spotrebu. Pri infúzii sa droga zahrieva na vriacom vodnom kúpeli spravidla 5 min a slúži na extrakciu látok z mäkkých častí rastlín (vňate,

Tabuľka I

Tradičné a moderné extrakčné metódy

Metódy	Výhody	Nevýhody	Lit.
<i>Tradičné extrakčné metódy</i>			
Macerácia	jednoduchá, lacná, bez zložitého technického zariadenia	časová náročnosť	4
Perkolácia	jednoduchá, rýchla, kontinuálna metóda, vysoká výťažnosť	veľké množstvo rozpúšťadla, riziko upchatia perkolátora	4
Infúzia/ dekokcia	jednoduchá, lacná, krátky extrakčný čas	možnosť termickej degradácie	4
Destilácia	selektívna metóda na extrakciu silíc	možnosť termickej degradácie	
Soxhletova extrakcia	nenáročná na čas a rozpúšťadlá, odpadá filtrácia	riziko tepelnej degradácie, tvorba zrazenín v extrakte, nemožnosť miešania	4
Ultrazvukom urýchlená extrakcia (UAE)	vysoká účinnosť, krátky extrakčný čas	riziko degradácie izolovaných látok, zlá automatizácia	7
Extrakcia plynnou fázou	selektívna extrakcia prchavých látok	selektívna adsorpcia a desorpcia širokej skupiny látok	13
<i>Moderné extrakčné metódy</i>			
Extrakcia nadkritickými kvapalinami (SFE)	rýchla, ekologická, v extrakte chýbajú rezíduá rozpúšťadiel	vysoká cena, nutnosť upraviť vzorku (dehydratovaním)	15
Tlakom urýchlená kvapalinová extrakcia (PLE)	vhodná na veľké množstvo vzoriek, vysoká výťažnosť, nenáročná na rozpúšťadlá	možnosť termickej degradácie	10
Mikrovlnná extrakcia (MAE)	rýchla, vysokoúčinná, na rozpúšťadlá nenáročná, možnosť automatizácie	len pre polárne rozpúšťadlá, degradácia niektorých látok	26
Mikroextrakcia tuhou fázou (SPME)	možnosť automatizácie selektívna na prchavé látky, nenáročná na rozpúšťadlá	stacionárna fáza je krehká a je komerčne ťažšie dostupná	33
Extrakcia sorpčnými miešadielkami (SBSE)	vyššia výťažnosť než SPME	veľké množstvo extrakčnej fázy	35
Disperzia matrice na tuhej fáze (MSPD)	rýchla, lacná, vhodná pre nestabilné látky na rozpúšťadlá nenáročná,	absencia automatizácie	4
Extrakcia kvapalinou doplnená o extrakciu tuhú fázou (QuEChERS)	rýchla, jednoduchá metóda, nízke nároky na rozpúšťadlá a technické vybavenie	niekedy je nutná úprava vzorky (zahustením)	4

listy, kvety), zatiaľ čo pri dekokcii trvajúcej obvykle 30 min sa extrahujú tvrdé časti rastlín – kôra, korene, kožovité listy a niektoré plody⁵. Medzi periodické extrakčné metódy patrí aj destilácia, pri ktorej sa samotná droga podrobí priamemu pôsobeniu vodnej pary. Tá so sebou strháva napr. lipofilné terpenické silice, ktoré sa zachytávajú v separátore a dajú sa od vody pomerne ľahko izolovať⁶. Metódy kontinuálne sú charakterizované ustáleným priebehom a droga s vylúhovadlom sa do systému privádzajú plynulo a plynulý je taktiež aj zber extraktu. Polokontinuálne metódy sú kombináciou predchádzajúcich dvoch kategórií. Prísun extrahovaného materiálu je jednorazový, prítok vylúhovadla a výtok extraktu je plynulý. Príkladom polokontinuálnej extrakčnej metódy je perkolácia. Tá sa

uskutočňuje pri laboratórnej alebo zvýšenej teplote v špeciálnych zariadeniach – perkolátoroch. Princíp perkolácie spočíva v tom, že čisté rozpúšťadlo extrahuje najviac vylúhovanú drogu a nevylúhovaná droga je obmývaná postupne sa koncentrujúcim rozpúšťadlom. Vysoká výťažnosť metódy sa vysvetľuje priaznivým koncentračným spádom vďaka stále pritekajúcemu čerstvému vylúhovadlu⁵.

3.1. Soxhletova extrakcia

Soxhletov extraktor je jedným z najstarších polokontinuálnych systémov. Práškový rastlinný materiál je uložený v celulózovej patrône extrakčného nástavca prí-

stroja, ktorý je umiestnený na vrchu zbernej banky pod spätným chladičom. Extrakčné rozpúšťadlo je v banke zahrievané, jeho výpary kondenzujú v chladiči a kvapkajú do patróny obsahujúcej drogu, ktorá je postupne extrahovaná. Po dosiahnutí určitej hladiny je rozpúšťadlo z patróny odvedené trubičkou extrakčného nástavca späť do banky. Následne sa celý proces opakuje s čerstvým rozpúšťadlom až do dosiahnutia kompletnej extrakcie⁷. Napriek niekoľkým nevýhodám (absencia miešania, časová náročnosť, neselektivita a možná termická degradácia) je kvôli svojej finančnej nenáročnosti a jednoduchosti Soxhletova extrakcia stále obľúbená⁴. Pomocou nej sa dajú získať alkaloidy či oleje z rôznych rastlinných semien alebo kantaridín z hmyzu rodu *Cantharis*⁸, ktorý sa najnovšie využíva pri odstránení bradavíc a pri terapii hepatálneho či ezofageálneho karcinómu⁹. Čoraz častejšie sa proces Soxhletovej extrakcie zvykne modifikovať s cieľom automatizácie a skrátenia času extrakcie s využitím vysokého tlaku, ultrazvuku či mikrovlnami⁵.

3.2. Ultrazvukom urýchlená extrakcia

Ultrazvukom urýchlená extrakcia (angl. ultrasound assisted extraction, UAE) je modifikovanou periodickou extrakčnou metódou, kedy sa vzorka vo vodnom kúpeli vystaví vplyvu ultrazvuku s frekvenciou pulzov nad 20 kHz. Vibrácie sú prenášané vodným prostredím za tvorby bublín s negatívnym tlakom (kavitáciou), ktorých implózia v systéme vyvolá lokálne vysoký tlak a teplotu. Tieto mechanické účinky vyvolávajú väčší prienik rozpúšťadla do rastlinného materiálu mechanizmom rozbitia časticových agregátov a narušením bunkovej steny¹⁰. Prakticky sa využíva ultrazvuk vo forme kúpeľa alebo sondy. Ultrazvukový kúpeľ má širšie využitie, no jeho nevýhodou je nerovnomerná distribúcia ultrazvukovej energie a pokles výkonu v priebehu procesu. Ultrazvukové sondy zabezpečujú zameranie energie priamo na vzorku, čím sa zvyšuje účinnosť extrakcie. Táto účinnosť závisí aj od frekvencie ultrazvuku, doby trvania a teploty⁷. Pri UAE sa generuje veľké množstvo tepla a aby sa predišlo stratám prchavých látok, je väčšinou nutné chladiť extrakčnú nádobu⁴. UAE je považovaná za výhodnú metódu na extrakciu kyseliny karnózovej z rozmarínu (*Rosmarinus officinalis* L. z čeľade *Lamiaceae*)¹¹. Kyselina karnózová je fenolový diterpén známy svojimi antioxidantnými a antibakteriálnymi vlastnosťami, pre ktoré nachádza uplatnenie v potravinárstve, kozmetike či výživových doplnkoch¹².

3.3. Extrakcia plynou fázou

Extrakcia plynou fázou (angl. headspace extrakcia) je základnou a často používanou metódou pre extrakciu prchavých látok. Extrahovaná vzorka je v kvapalnom alebo pevnom stave umiestnená v nádobe tak, aby bol nad ňou voľný priestor – headspace s obsahom plynu. Metóda je založená na rozdelení izolovaných látok medzi neprchavú kvapalinu príp. pevnú fázou a plynú fázou, ktorá bola

v kontakte s extrahovaným materiálom. Pokiaľ je vzorka v rovnovážnom stave s plynou fázou v uzavretom priestore, ide o statickú extrakciu. Ak nosný plyn prúdi nad hladinou vzorky alebo vzorkou prebubláva, tento postup sa označuje ako dynamická extrakcia. Extrahované látky sa následne zachytávajú v kryogénnej alebo sorpčnej pasci¹³. Metodika dynamickej extrakcie bola použitá napr. pri extrakcii a následnej detekcii butyltinových kontaminantov vo víne. Tieto látky sa používajú v poľnohospodárstve pre biocídne vlastnosti a nachádzajú uplatnenie aj pri výrobe plastov (zlepšujú stabilitu PVC pred pôsobením tepla a svetla)¹⁴.

3.4. Extrakcia nadkritickými kvapalinami

Pri extrakcii nadkritickými kvapalinami (angl. supercritical fluid extraction, SFE) sa rastlinný materiál vkladá do extrakčnej nádoby vybavenej regulátorom tepla, vstupným a výstupným tlakovým ventilom. Tlak v extrakčnej nádobe je udržiavaný pomocou kvapalinového čerpadla. Kvapalina sa spolu s rozpustenými zlúčeninami presúva do separátora, kde sa znižuje jej rozpúšťacia schopnosť znížením tlaku, alebo zvýšením teploty. Produkt sa odoberá pomocou ventilu, ktorý je umiestnený v dolnej časti separátora. Kvapalina je ďalej recyklovaná a vracia sa do obehu^{15,16}. Špecifikom SFE je používanie rozpúšťadiel v nadkritickom stave, kedy sú teplota a tlak rozpúšťadla zvýšené nad kritické hodnoty. Na extrakciu nepolárnych zlúčenín sa najčastejšie využíva kvapalný oxid uhličitý a na extrakciu polárnych zlúčenín je vhodný chlórfluórmetán (freón 22) prípadne oxid dusný. Nadkritické kvapaliny majú vlastnosti kvapalín aj plynov. K ich výhodám oproti konvenčne používaným rozpúšťadlami patrí vysoký difúzný koeficient, nízka viskozita a povrchové napätie prípadne jednoduchosť ovplyvnenia rozpúšťacej schopnosti zmenou tlaku a/alebo teploty¹⁵. Výrazné zlepšenie rozpustnosti polárnych zlúčenín možno doceliť pridaním kosolventu napr. metanolu, etanolu alebo acetonitrilu¹⁶. Svojmu využitiu vďaka SFE hlavne relatívne nízkej cene a obmedzeniam týkajúcich sa ostatných organických rozpúšťadiel. SFE sa používa na dekafeinizáciu kávy a čaju, pri extrakcii chmeľu, ale aj na odstránenie pesticídov zo ženšenu³. Táto technika bola tiež použitá na extrakciu silíc, terpenických prchavých látok, z borievky červeno-plodej (*Juniperus oxycedrus* L. z čeľade *Cupressaceae*)¹⁷ alebo flavonoidu – naringínu z grapefruitu (*Citrus paradisi* Macf. z čeľade *Rutaceae*)¹⁸, ktorý má schopnosť inhibovať rast nádorov a okrem antiflogistických účinkov disponuje aj schopnosťou znižovať poškodenie pokožky pri jej vystavení UVB žiareniu¹⁹. Ďalšie príklady využitia SFE sú uvedené v tab. II (modifikované podľa cit.²⁰).

3.5. Tlakom urýchlená kvapalinová extrakcia

Limity na mnohé nadkritické rozpúšťadlá používané pri SFE viedli k vývoju tlakom urýchlenej kvapalinovej extrakcie (z angl. pressurized liquid extraction, PLE), ktorá prebieha pri vysokej teplote s použitím klasických organic-

Tabuľka II

Príklady SFE pri extrakcii rastlinných látok (modifikované podľa cit.²⁰)

Liečivá látka	Rastlina (čeľaď)	Extrakčné podmienky a poznámka
Taxány (Taxol)	Tis obyčajný – ihličie <i>Taxus baccata</i> L. (<i>Taxaceae</i>)	CO ₂ s metanolom; 50 °C; 40,5 MPa; 100 min. Výtlačnosť je porovnateľná s LCS.
Prchavé látky	Evodia rutoplodá – plody <i>Evodia rutaecarpa</i> Benth. (<i>Rutaceae</i>)	CO ₂ ; 20 MPa ; 50 °C; 40 min. Dobrá výtlačnosť pre vysokomolekulárne oxygenované zložky.
Diosgenín	Smlďnec nipónsky – hľuzy <i>Dioscorea nipponica</i> Makino (<i>Dioscoreaceae</i>)	CO ₂ ; 21,5 MPa; 44 °C; 70 min vedie k najvyššiemu výtlačku.
Taxol, Bocatin III	Tis japonský – ihličie <i>Taxus cuspidata</i> Sieb. et Zucc. (<i>Taxaceae</i>)	CO ₂ s etanolom; 40 °C; 30 MPa; metóda prietokovej cely.
Silice	Rimbaba obyčajná – kvety <i>Tanacetum parthenium</i> L. (<i>Asteraceae</i>) Vratič obyčajný – kvety <i>Tanacetum vulgare</i> L. (<i>Asteraceae</i>) Rumanček kamilkový – kvety <i>Matricaria recutita</i> L. (<i>Asteraceae</i>)	CO ₂ ; 450 °C; 25 MPa; čas neuvedený. Na rozlíšenie zložiek jednotlivých rastlín je možné využiť chromatogram.
Oxindolové alkaloidy	Mačací pazúr – koreň <i>Uncaria tormentosa</i> Willd. (<i>Rubiaceae</i>)	CO ₂ samostatne, ale aj s metanolom; 60 °C; 25,5–45,5 MPa; 60 min. Pre maximálnu výtlačnosť je možné pre ďalšiu extrakciu (4 hodiny) použiť čistý CO ₂ .
Flavokawafny	Piepor opojný – koreň <i>Piper methysticum</i> Forst. (<i>Piperaceae</i>)	CO ₂ samostatne, ale aj s metanolom; 60 °C; 25,5 MPa; 30–60 min.
Tanšínón II A	Šalvia červenokorenná – koreň, podzemok <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge. (<i>Lamiaceae</i>)	CO ₂ ; 60 °C; 15 MPa; 30 min; na rozlíšenie jednotlivých druhov je možné využiť GC.
Flavanóny a Xantóny	Maklura oranžová – koreň, kôra <i>Maclura pomifera</i> Raf. (<i>Moraceae</i>)	CO ₂ samostatne a s etanolom; 40–100 °C; 40,5 MPa; 45 min; prísada metanolu k CO ₂ zvyšuje výtlačnosť.
Flavonoidy	Šišiak bajkalský – koreň <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi. (<i>Lamiaceae</i>)	CO ₂ s metanolom a vodou (20:2,1:0,9); 50 °C; 20 MPa; (čas neuvedený).

kých rozpúšťadiel. Pevná alebo polotuhá vzorka sa pri nej umiestňuje do uzavretej extrakčnej komory, ktorá je naplnená rozpúšťadlom a zahriata v piecke na 50–200 °C. Ohrievanie spôsobuje expanziu rozpúšťadla a tým aj zvýšenie tlaku v komore. Ventil komory sa v pulzoch automaticky otvára a zatvára. Rozpúšťadlo, ktoré cez neho unikne, je zhromažďované v ampulke. Fáza statickej extrakcie trvá 5–10 min a pokračuje pumpovaním čerstvého rozpúšťadla za účelom prepláchnutia vzorky a hadičiek. Rozpúšťadlo prítomné v systéme sa neskôr vytlačí stlačeným ply-

nom, najčastejšie dusíkom, a zhromažďí taktiež v ampulke²¹. Metóda PLE je vhodná na rýchlu a opakovateľnú extrakciu veľkého množstva vzoriek. Extrakčná výtlačnosť je vyššia príp. porovnateľná s tradičnými technikami. Vyznačuje sa časovou nenáročnosťou a nízkou spotrebou rozpúšťadiel, no existuje tu riziko degradácie termolabilných zložiek v dôsledku vysokých pracovných teplôt¹⁰. Pomocou PLE sa extrahovali saponíny zo semien pagaštanu konského (*Aesculus hippocastanum* L. z čeľade *Sapindaceae*). Extrakty pagaštanu sa často indikujú

pri chronických venózných ochoreniach²². Metóda PLE môže byť použitá na extrakciu xantónov a flavanónov z kôry makuľury oranžovej (*Maclura pomifera* Raf. z čeľade *Moraceae*)²³, ktoré v sebe skrývajú antiflogistické, analgetické, antibakteriálne a antioxidačné účinky²⁴. Pomerne dobrú výťažnosť zaznamenala metodika PLE pri extrakcii známeho lokálneho anestetika – kokainu, z listov kokainovníka pravého (*Erythroxylum coca* Lam. z čeľade *Erythroxylaceae*)²⁵.

3.6. Mikrovlnná extrakcia

Vyššia účinnosť mikrovlnnej extrakcie (angl. microwave assisted extraction, MAE) je spôsobená ohrevom rozpúšťadla účinkom mikrovln s frekvenciou od 0,3 do 300 GHz (v praxi sa najčastejšie používa frekvencia 2,45 GHz)¹⁵. Na absorpciu mikrovlnného žiarenia je potrebná prítomnosť polárnej látky, ktorou je okrem rozpúšťadla aj vlhkosť (voda) prirodzene obsiahnutá v droge. Krátky extrakčný čas a veľká výťažnosť sú zapríčinené rovnakým smerom pôsobenia teplotného a koncentračného gradientu. Pri klasických extrakciách totiž koncentračný gradient smeruje z extrahovaného materiálu smerom do rozpúšťadla, ale teplotný gradient smeruje od zdroja tepla cez rozpúšťadlo do vnútra substrátu²⁶. Komerčne sú dostupné mikrovlnné extraktory pracujúce s otvoreným systémom. Extrakcia sa v nich uskutočňuje pri atmosférickom tlaku s rozpúšťadlami o nízkej hodnote dielektrickej konštanty. Pri tejto metóde nevzniká veľmi vysoká teplota, a preto je vhodná aj na extrakciu niektorých termolabilných látok. V otvorenom systéme je napr. možné zo semien lupiny menlivej (*Lupinus mutabilis* Sweet z čeľade *Fabaceae*) extrahovať chinolizidínový alkaloid sparteín²⁷, ktorý disponuje antiarytmickým a potenciálne aj spazmolytickým účinkom²⁸. Ďalším príkladom je izolácia fenolického derivátu gossypolu z bavlníkových semien (*r. Gossypium* z čeľade *Malvaceae*)²⁹, u ktorého boli pozorované antivirotické a antitumorózne účinky³⁰.

Extraktory pracujúce s uzavretým systémom majú kontrolovanú teplotu a tlak. Prednostne sa u nich používajú rozpúšťadlá s vysokou hodnotou dielektrickej konštanty. Droga je teda vystavená pôsobeniu vysokej teploty a tlaku podobne ako v PLE¹⁵.

Uzavretý systém bol použitý pri extrakcii karotenoidov z mletej papriky (*Capsicum annuum* L. z čeľade *Solanaceae*)³¹. Takto získané karotenoidy (β -karotén, α -karotén, β -kryptoxantín) môžu slúžiť ako zdroje vitamínu A a makulárnych pigmentov (luteín, zeaxantín) potrebných pre správnu funkciu oka³².

3.7. Mikroextrakcia tuhú fázou

Mikroextrakcia tuhú fázou (angl. solid phase microextraction, SPME) patrí medzi periodické metódy využívajúce pasívnu difúziu. Kremenné vlákno pokryté vrstvou sorpčného materiálu, ktorý predstavuje stacionárnu fázu, je vložené do kvapalnej alebo plynnej vzorky prípadne prie-

storu nad vzorkou. Obsahové látky sa následne rozdeľujú medzi vzorku a tuhú fázu až do vzniku rovnováhy. Výťažok SPME je určený rozdeľovacím koeficientom vlákna a vzoriek. SPME prebieha bez použitia rozpúšťadla, čím zabezpečuje vyššiu senzitivitu, nakoľko nedochádza k riedeniu obsahových látok rozpúšťadlom³³. Pomocou SPME boli s úspechom izolované prchavé zložky (prevažne terpeny) rozličných rastlín z oblasti Auvergne vo Francúzsku³⁴.

3.8. Extrakcia sorpčnými miešadielkami

Medzi periodické metódy patrí aj extrakcia sorpčnými miešadielkami (angl. stir bar sorptive extraction, SBSE). Miešadlá pokryté polymérom (najčastejšie polydimetylsiloxán) sú umiestnené do kvapalnej vzorky a obsahové látky sa následne prerozdeľujú medzi fázy³⁵. Sorpcia môže prebiehať aj v priestore nad vzorkou, kedy je do vzorky umiestnené miešadlo a do priestoru nad vzorkou vlákno pokryté adsorpčným polymérom. Tento postup sa aplikuje najmä na stanovovanie prchavých látok. V porovnaní so SPME využíva SBSE väčší objem fáz, čo má za následok vyššiu výťažnosť procesu. SBSE bola využitá pri extrakcii látok zodpovedných za vôňu rozličných rastlín. Touto metódou sa z hrozna pomerne ľahko izolujú oxidačné produkty citronellolu³⁶. Tie vďaka vôni pripomínajúcej ruže predstavujú zaujímavú surovinu pre parfumériu³⁷.

3.9. Disperzia matrice na tuhej fáze

Disperzia matrice na tuhej fáze (angl. matrix solid phase dispersion, MSPD) je patentovaný proces na rozdrobovanie a extrakciu pevných, polotuhých a viskózných vzoriek³⁸. Pri tejto technológii sa látka mechanicky rozťiera s pevným, abrazívnym sorbentom, čo vedie k porušeniu bunkových membrán rastlinného materiálu a uvoľneniu extrahovaných látok, ktoré sa čiastočne rozpustia a následne adsorbujú na povrch sorbentu, čo nazývame extrakcia tuhú fázou (SPE). Obsahové látky sa zo sorbentu eluujú vhodným rozpúšťadlom. Výťažnosť MSPD závisí od typu a množstva pevného nosiča, množstva vzorky, eluotropickej sily a množstva rozpúšťadla. Ako nosič sa často používajú modifikované silikagély, najmä s naviazaným oktadecylovým reťazcom⁴. MSPD je rýchla, jednoduchá, flexibilná a na množstvo rozpúšťadla nenáročná metóda, ktorá však na druhej strane vyžaduje manuálne zmiešanie drogy a pevného nosiča v mažiari a práve preto nie je plne automatizovaná⁴. Je možné ju uplatniť pri extrakcii xantónov a flavanónov z koreňa makuľury oranžovej (*Maclura pomifera* Raf. z čeľade *Moraceae*)³⁹ s miernou anti-HIV aktivitou⁴⁰ ako aj na formuláciu moderných výživových doplnkov s antioxidačným účinkom na báze chlorofylu⁴¹. Pri jeho extrakcii sa rovnako ako v prípade iných polárnych rastlinných látok využívajú polárne nosiče, napr. Florisil® alebo oxid hlinitý⁴².

3.10. Extrakcia kvapalinou doplnená o extrakciu tuhú fázou

Táto metóda bola primárne publikovaná ako metóda pre extrakciu pesticídov z ovocia a zeleniny⁴³. V skutočnosti ide o proces, ktorý zahŕňa niekoľko fáz úpravy vzorky založených na mikroextrakcii organickým rozpúšťadlom (acetonitril) s následným prečistením pomocou disperznej SPE. Označuje sa tiež ako rýchla, ľahká, lacná, robustná, efektívna a bezpečná extrakcia (angl. quick, easy, cheap, rugged, effective, and safe, QuEChERS). Vzorka sa pretrepáva s rozpúšťadlom a na odstránenie vody z organickej frakcie slúži bezvodý síran horečnatý. Pridavok primárneho a sekundárneho amínu zabezpečuje oddelenie polárnych rastlinných zložiek (organické kyseliny, cukry). Na odstránenie sterolov a pigmentov možno použiť grafitovaný uhlík⁴. Nevýhodou metódy je nemožnosť automatizácie, no vďaka svojej jednoduchosť a rýchlosti sa po doplnení o GC-MS alebo LC-MS analýzu často využíva na stanovenie reziduí rôznych chemických látok v jedle či rastlinných produktoch. Metóda QuEChERS je často súčasťou detekcie pesticídov a herbicídov (organofosfáty, organochloridy a triazíny) v olivách a olivovom oleji⁴⁴.

4. Budúce trendy extrakčných metód

Environmentálne či ekonomické faktory ostanú aj naďalej dôležitým aspektom v problematike extrakčných procesov. Čoraz častejšie sa na úkor konvenčných organických rozpúšťadiel uplatňujú GRAS rozpúšťadlá (z angl. generally recognized as safe – všeobecne považované za bezpečné), ku ktorým patrí nadkritický oxid uhličitý, voda alebo polyetylén glykol⁴⁵. Preferujú sa techniky s nízkou spotrebou energie (napr. MAE) a čoraz viac sa používajú nové pomocné technické látky zvyšujúce výťažnosť⁴. Jedná sa predovšetkým o enzýmy, ktoré sú pri extrakcii schopné rozrušiť bunkové steny a membrány spracovaného materiálu. Napríklad enzymatickým ošetrením kardamónových semien (*Elettaria cardamomum* Maton. z čeľade *Zingiberaceae*) je možné získať vyšší obsah silíc⁴⁶. Blízka budúcnosť pravdepodobne zmení aj charakter extrahovaného materiálu, ktorý už aj dnes stále častejšie tvoria bunkové kultúry toho rastlinného orgánu, kde sú obsahové látky zastúpené najviac⁴⁷.

Zoznam skratiek

MAE	mikrovlnná extrakcia (microwave assisted extraction)
MSPD	disperzia matrice na tuhej fáze (matrix solid phase dispersion)
PLE	tlakom urýchlená kvapalinová extrakcia (pressurized liquid extraction)
QuEChERS	extrakcia kvapalinou doplnená o extrakciu tuhú fázou; rýchla, ľahká, lacná, robustná, efektívna a bezpečná extrakcia (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe),

SBSE	extrakcia sorpčnými miešadielkami (stir bar sorptive extraction)
SFE	extrakcia nadkritickými kvapalinami (supercritical fluid extraction)
SPE	extrakcia tuhú fázou (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakcia tuhú fázou (solid phase microextraction)
UAE	ultrazvukom urýchlená extrakcia (ultrasound assisted extraction)

LITERATÚRA

1. Council of Europe: *European Pharmacopoeia, eighth edition*. Council of Europe, Strasbourg 2013.
2. Nagy M., Grančai D., Mučaji P.: *Farmakognózia: Biogénia prírodných látok*. Osveta, Bratislava 2011.
3. Raaman N.: *Phytochemical techniques*. New India Publishing, New Delhi 2006.
4. Hostettman K., Chen S., Marston A., Stuppner H.: *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods, 3 Volume*. Set. John Wiley & Sons, Chichester 2014.
5. Komárek P., Rabišková M.: *Technologie léků*. Galén, Praha 2006.
6. Ormeño E., Goldstein A., Niinemets Ü.: *Trends Anal. Chem.* 30, 978 (2011).
7. Yeshak M. Y., Burman R., Eriksson C., Göransson U.: *Phytochem. Lett.* 5, 776 (2012).
8. Kasture A. V., Parakh S. R., Gokhale S. B., Hasan S. A.: *Pharmaceutics I, eighteenth edition*. Pragati Books, Pune 2012.
9. Rauh R., Kahl S., Boechzelt H., Bauer R., Kaina B., Effertth T.: *Chinese Med.* 8, 1 (2007).
10. Seidel V.: *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa 2006.
11. Albu S., Joyce E., Paniwyk L., Lorimer J. P., Mason T. J.: *Ultrason. Sonochem.* 11, 261 (2004).
12. Birtic S., Dussort P., Pierre F. X., Bily A. C., Roller M.: *Phytochemistry* 115, 9 (2015).
13. Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V., Dvořák J., Hašková D.: *Kvasny Prum.* 58, 2 (2012).
14. Azenha M., Vasconcelos M. T.: *Anal. Chim. Acta* 458, 231 (2002).
15. Wang L., Weller C. L.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 1963 (2006).
16. Lang Q., Wai C. M.: *Talanta* 53, 771 (2001).
17. Marongiu B., Porcedda S., Caredda A., De Gioannis B., Vargiu L., La Colla P.: *Flavour Frag. J.* 18, 390 (2003).
18. Giannuzzo A. N., Boggetti H. J., Nazreno M. A., Mishima H. T.: *Phytochem. Anal.* 14, 221 (2003).
19. Bianchi F., Careri M., Musci M.: *Food Chem.* 89, 527 (2005).
20. Huie C. W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 23 (2002).
21. Kaufmann B., Christen P.: *Phytochem. Anal.* 13, 105 (2002).

22. Felipe M. B. M., de Carvalho F. M., Félix-Silva J., Fernandes-Pedrosa M. F., Scortecchi K. C., Agnez-Lima L. F., de Medeiros S. R. B.: *Biomed. Prev. Nutr.* **3**, 261 (2013).
23. Da Costa C. T., Margolis S. A., Benner B. A. J., Horton D.: *J. Chromatogr. A* **167**, 831 (1999).
24. Kupeli E., Orhan I., Tokar G., Yesilada E.: *J. Ethnopharmacol.* **107**, 169 (2006).
25. Brachet A., Rudaz S., Mateus L., Christen P., Veuthey J. L.: *J. Sep. Sci.* **24**, 865 (2001).
26. Veggi P. C., Martinez J., Meireles M. A. A.: *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Springer Science, New York 2013.
27. Darko Matovic M. D. (ed.): *Biomass Now – Sustainable Growth and Use*. Intech, Timisoara 2013.
28. Villalpando-Vargas F., Medina-Ceja L.: *Brain Res.* **59**, 1624 (2015).
29. Bahtiyorbekovich Y. A., Abdurakhmanov A. S., Pardayevich S. Q.: *AJTNS I*, 118 (2015).
30. Wang X., Howell C. P., Chen F., Yin J., Jiang Y.: *Adv. Food Nutr. Res.* **58**, 215 (2009).
31. Csiktusnádi Kiss G. A., Forgács E., Cserháti T., Mota T., Morais H., Ramos A.: *J. Chromatogr. A* **41**, 889 (2000).
32. Fraser P. D., Bramley P. M.: *Prog. Lipid Res.* **43**, 228 (2004).
33. Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. A* **1**, 880 (2000).
34. Cornu A., Carnat A., Martin B., Coulon J., Lamaison J., Berdaqué J.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 203 (2001).
35. Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L. A., Etchebarria N., Zuloaga O.: *J. Chromatogr. A* **2642**, 1217 (2010).
36. Luan F., Mosandl A., Gubesch M., Wuest M.: *J. Chromatogr. A* **369**, 1112 (2006).
37. Maróstica M. R., Pastore G. M.: *Food Sci. Technol.* **26**, 690 (2006).
38. Barker S. A.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **70**, 151 (2007).
39. Teixeira D. M., Da Costa C. T.: *J. Chromatogr. A* **175**, 1062 (2005).
40. Groweiss A., Cardellina J. H., Boyd M. R.: *J. Nat. Prod.* **63**, 1537 (2000).
41. Daoud H. G.: *Chlorophyll. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. vyd. Elsevier Publ. Comp, Amsterdam 2003.
42. Abhilash P. C., Jamil S., Singh N.: *J. Chromatogr. A* **43**, 1176 (2007).
43. Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajhbaheer D., Schenck F. J.: *J. AOAC Int.* **86**, 412 (2003).
44. García-Reyes J. F., Ferrer C., Gómez-Ramos M. J., Fernández-Alba A. R., Molina-Díaz A.: *Trends Anal. Chem.* **26**, 239 (2007).
45. Kerton F. M., Marriott R.: *Alternative Solvents for Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2013.
46. Baby K. C., Ranganathan T. V.: *Ind. Crops Prod.* **89**, 200 (2016).
47. Sharangi A. B., Datta S.: *Value Addition of Horticultural Crops: Recent Trends and Future Direction*, Springer, London 2015.

S. Kurhajec^{a,b}, D. Sabadková^b, A. Franc^b, and D. Vetchý^b (^a Department of Pharmacognosy and Botany, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice, Slovakia, ^b Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno): **Extract as a Modern Dosage Form for Natural Drugs**

Plant extracts still constitute a part of commonly used dosage forms, but they can also be understood as raw materials for pharmaceutical industry. The production of extracts is based on the periodic, continuous and semi-continuous methods, which can also be classified as conventional extraction methods (maceration, percolation, infusion, decoction, distillation, Soxhlet extraction, ultrasound assisted extraction and headspace extraction) or modern extraction methods (supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, microwave assisted extraction, solid phase micro extraction, stir bar sorptive extraction, matrix solid phase dispersion, quick easy cheap rugged effective and safe extraction). The extraction-method efficiency depends on the characteristics of the extracted material (e.g. particle size, ballast materials, thickness of the cell wall), physical factors (e.g. temperature, pressure, microwave, ultrasound), the extraction time, mixing (it influences the concentration gradient), solvent type and the presence of cosolvent. For environmental reasons, it is suitable to produce the extracts by using certain gases in supercritical conditions as solvents (e.g. carbon dioxide, nitrogen) or other generally recognized as safe solvents (e.g. water, propylene glycol) that provide a high yield at a correct methodology.

VYUŽITIE OTRÚB Z RÔZNYCH ODRÔD PŠENICE PRI VÝROBE PEKÁRSKÝCH VÝROBKOV

MICHAELA LAUKOVÁ^a, JOLANA
KAROVIČOVÁ^a, ZLATICA KOHAJDOVÁ^a
a MÁRIA BABULICOVÁ^b

^a Oddelenie potravinárskej technológie, Ústav potravinárstva a výživy, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 01 Piešťany

michaela.laukova@stuba.sk

Došlo 16.1.17, prijaté 3.4.17.

Kľúčové slová: pšenica, pšeničné otruby, špaldové otruby, kvalitatívne parametre

Úvod

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jednou z najrozšírejších rastlín, ktorá tvorí významnú časť potravy v mnohých krajinách¹. Jednotlivé odrody pšenice sa od seba líšia agrotechnickými vlastnosťami (hektárový výnos, odolnosť voči škodcom a chorobám), ale aj kvalitou zrna a jeho vhodnosťou na mletie a pečenie².

Pšenica Lubica je prvým slovenským krížencom pšenice letnej formy ozimnej a pšenice špaldovej. Táto odroda si zachováva kvalitu špaldovej pšenice a zároveň dosahuje vysoké úrody zrna, ktoré netreba odplevovať³.

Pšeničné otruby, vedľajší produkt získaný pri spracovaní pšenice na múku, predstavujú okolo 14,5 % z celkovej hmotnosti zrna⁴. Tvoria vonkajšiu vrstvu cereálnych zŕn a obsahujú nucelárnu epidermu, obal zrna, perikarp a aleurónovú vrstvu⁵.

Otruby sú najznámejším zdrojom nerozpustnej vlákniny⁶ a do istej miery obsahujú aj vo vode rozpustnú vlákninu, čo predstavuje hrubú vlákninu (10 %), pentózy (26,5 %), celulózu (21,4 %), škrob (7,51 %), celkové sacharidy (5,04 %), sacharózu (2,98 %) a redukujúce sacharidy (4,42 %)⁷. Epidemiologicky je dokázané, že denná spotreba cereálnych výrobkov obohatených o pšeničné otruby znižuje riziko chorôb ako je obezita, kardiovaskulárne ochorenia a rakovina hrubého čreva. Z tohto dôvodu je inkorporácia otrúb do cereálnych výrobkov zaujímavý a lacný spôsob zvýšenia ich nutričnej hodnoty¹.

Využitie pšeničných otrúb v cereálnych výrobkoch má však niekoľko technologických nevýhod. V porovnaní s výrobkami z pšeničnej múky sa pridaním otrúb zhoršuje kvalita konečných produktov, ako je napríklad zníženie objemu výrobku, zmeny v textúre a celkovom vzhľade

produktu^{1,8}. Negatívny účinok prídavku otrúb závisí od odrody pšenice, veľkosti častíc daných otrúb a od metódy ich predchádzajúcej úpravy⁹.

Cieľom práce bolo vykonať analýzu chemického zloženia pšeničných, pološpaldových a špaldových otrúb, sledovať vplyv prídavku (5, 10 a 15 %) rôznych otrúb na kvalitatívne parametre pekárskych výrobkov. Súčasťou práce bolo aj senzorické hodnotenie pekárskych výrobkov.

Experimentálna časť

Materiál

Pšeničná múka hladká, pšeničné otruby (PO) (PRO-BIO, s.r.o., Staré Mesto, Česká republika), špaldové otruby (ŠO) (PRO-BIO, s.r.o., Staré Mesto, Česká republika) a ďalšie ingrediencie boli zakúpené v lokálnej maloobchodnej sieti. Vzorka otrúb z novo vyšľachtenej odrody pšenice Lubica (LO) (kríženc *Triticum aestivum* × *Triticum spelta*), bola získaná z Výskumného ústavu rastlinnej výroby, Piešťany, Slovenská republika a Výskumnosľachtiteľskej stanice Víglaš Pstruša, Slovenská republika.

Chemická analýza

Vo vzorkách otrúb a v hladkej múke bol podľa metódy AAC 2000 (cit.¹⁰) stanovený obsah vlhkosti (metóda 44-19.01)¹⁰, popola (metóda 08-01.01)¹⁰, tuku (metóda 30-25.01)¹⁰, bielkovín (metóda 46-13.01)¹⁰. Obsah škrobu bol stanovený metódou podľa Ewersa polarimetricky¹¹. Obsah celkovej potravinovej vlákniny (TDF) bol stanovený enzymaticko-gravimetrickou metódou¹².

Farinografické stanovenie

Reologické parametre pšeničného cesta (farinografická väznosť, stabilita cesta, čas vývinu cesta, stupeň mechanickej odolnosti) boli stanovené pomocou farinografu Brabender (Duisburg, Nemecko) podľa normy ISO 5530-1:2013 (cit.¹³).

Príprava bežného pečiva

Bežné pečivo bolo pripravené podľa základnej receptúry Kohajdová a Karovičová¹⁴, kde sa časť múky nahrádzala pšeničnými otrubami vo výške 0, 5, 10 a 15 %.

Kvalitatívne parametre bežného pečiva

Dve hodiny po pečení sa stanovili fyzikálne parametre pečiva: objem¹⁵, merný objem, straty pečením a klenutosť¹¹.

Senzorické hodnotenie

Pri senzorickom hodnotení jednotlivých znakov (tvar výrobku, farba, hrúbka/tvrdosť, vôňa a chuť kôrky; vôňa,

pružnosť, farba, chuť, lepivosť striedky) bola použitá 9-bodová hedonická stupnica¹¹. Pri hodnotení celkovej prijateľnosti výrobku bola použitá 100 mm úsečka s označením hraničných bodov (0 a 100 %)¹⁶.

Štatistické vyhodnotenie

Výsledky analýz sú vyjadrené ako priemer z troch meraní $\pm$ smerodajná odchýlka. Štatistické vyhodnotenie bolo vykonané v programe MS Excel, prostredníctvom jednofaktorovej analýzy rozptylu a t-testu pri hladine významnosti $P = 0,05$.

Výsledky a diskusia

Pšeničné otruby nie sú štandardizovaným produktom s definovanou kvalitou a chemickým zložením. Zloženie komerčných otrúb závisí od mnohých faktorov, vrátane triedy, do ktorej pšenica patrí, tvaru a veľkosti zrna, hrúb-

ky obalových vrstiev, spôsobu mletia a typu vyrobenej múky¹⁷. Chemické zloženie jednotlivých druhov otrúb a pšeničnej hladkej múky je uvedené v tab. I. Najvyšší obsah bielkovín (17,78 %) mali špaldové otruby. Obsah tuku a popola v špaldových otrubách (6,13 % a 6,97 %) bol v porovnaní s pološpaldovými otrubami (3,54 % a 3,50 %) takmer dvojnásobne vyšší. Z literárnych údajov vyplýva, že pšeničné otruby sú významným zdrojom potravinovej vlákniny¹⁷. Najvyššiu hodnotu obsahu TDF 45,44 % mali pšeničné otruby, na druhej strane, najnižší obsah TDF mali pološpaldové otruby (23,89 %). Pšeničné otruby môžu obsahovať vyššie množstvo škrobu, kvôli prichytenému zostatkovému endospermu, alebo nedostatočne odstráneným fragmentom voľnému endospermu¹. Vzorka pološpaldových otrúb obsahovala zvyškovú frakciu múky z procesu mletia v laboratóriu a mala vyšší obsah škrobu (49,70 %) ako komerčne dostupné vzorky pšeničných (15,69 %) a špaldových otrúb (17,64 %).

Významným ukazovateľom potenciálneho využitia múky a tiež kvality konečných výrobkov sú reologické

Tabuľka I

Chemické zloženie pšeničnej múky a otrúb

Vzorka ^a	Vlhkosť [%]	Popol [%]	Tuk [%]	Bielkoviny [%]	TDF [%]	Škrob [%]
HL	9,56 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,04	11,67 $\pm$ 0,02	1,95 $\pm$ 0,07	82,20 $\pm$ 0,61
LO	11,45 $\pm$ 0,04	3,50 $\pm$ 0,09	3,54 $\pm$ 0,03	14,18 $\pm$ 0,38	23,89 $\pm$ 0,05	49,70 $\pm$ 2,31
PO	10,84 $\pm$ 0,03	5,94 $\pm$ 0,03	5,02 $\pm$ 0,05	15,49 $\pm$ 0,11	45,44 $\pm$ 0,16	15,69 $\pm$ 0,75
ŠO	10,85 $\pm$ 0,07	6,97 $\pm$ 0,02	6,13 $\pm$ 0,04	17,78 $\pm$ 0,10	35,09 $\pm$ 0,70	17,64 $\pm$ 0,26

^a HL – hladká múka, LO – otruby z pološpaldovej pšenice, PO – pšeničné otruby, ŠO – špaldové otruby, TDF – celková potravinová vláknina

Tabuľka II

Farinografické parametre pšeničného cesta s prídavkom otrúb

Vzorka ^a	Väznosť [%]	Čas vývinu cesta [min]	Stabilita cesta [min]	Index mechanickej odolnosti [BJ] ^b
KV	54.27 $\pm$ 0.18	3.00 $\pm$ 0.02	16.15 $\pm$ 0.25	25.03 $\pm$ 1.04
PO 5%	56.39 $\pm$ 0.25	4.40 $\pm$ 0.11*	8.68 $\pm$ 0.08*	30.25 $\pm$ 1.50
PO 10%	60.31 $\pm$ 0.18*	5.31 $\pm$ 0.17*	7.37 $\pm$ 0.11*	38.08 $\pm$ 1.23
PO 15%	63.25 $\pm$ 0.34*	5.82 $\pm$ 0.11*	7.02 $\pm$ 0.05*	49.21 $\pm$ 0.13*
LO 5%	58.67 $\pm$ 0.45	4.01 $\pm$ 0.06*	9.15 $\pm$ 0.11*	42.29 $\pm$ 1.58*
LO 10%	59.93 $\pm$ 0.28*	4.39 $\pm$ 0.13*	8.72 $\pm$ 0.08*	55.13 $\pm$ 2.05*
LO 15%	62.31 $\pm$ 0.52*	5.27 $\pm$ 0.08*	7.18 $\pm$ 0.14*	58.89 $\pm$ 1.20*
ŠO 5%	59.75 $\pm$ 0.25	4.11 $\pm$ 0.11*	11.18 $\pm$ 0.13*	29.96 $\pm$ 0.75
ŠO 10%	61.17 $\pm$ 0.16*	5.21 $\pm$ 0.14*	7.48 $\pm$ 0.23*	46.18 $\pm$ 1.06*
ŠO 15%	63.55 $\pm$ 0.13*	5.62 $\pm$ 0.08*	6.34 $\pm$ 0.11 *	52.36 $\pm$ 1.08*

^a KV – kontrolná vzorka, LO – otruby z pološpaldovej pšenice, PO – pšeničné otruby, ŠO – špaldové otruby, ^b BJ – brabenderove jednotky; hodnoty * v indexe sú štatisticky významné rozdiely pri $P = 0,05$

vlastnosti cesta¹⁸. Reologické parametre pšeničného cesta s prídavkom rôznych druhov otrúb sú uvedené v tab. II. Zistilo sa, že prídavok otrúb mal za následok zvýšenie farinografickej väznosti. Najvyššia hodnota 63,55 % bola zaznamenaná pri 15 % prídavku špaldových otrúb. Nárast hodnoty väznosti je spôsobený prítomnosťou väčšieho počtu hydroxylových skupín v štruktúre vlákniny a ich početnými interakciami s vodou¹⁷. Nedochádza tak k správne mu vytvoreniu lepkovej štruktúry, pretože arabinoxylany prítomné v otrubách pevne viažu vodu, čím sa znižuje množstvo vody, ktorá je dostupná na tvorbu lepkovej štruktúry. Onipe a spol.¹⁹ uvádzajú, že prídavok otrúb spôsobuje zmeny v stabilite cesta a predĺženie času vývinu cesta. Zistilo sa, že s prídavkom otrúb sa hodnoty času vývinu cesta predĺžili, pričom najvyššie hodnoty pri všetkých prídavkoch boli pri prídavku pšeničných otrúb a najnižšie s prídavkom pološpaldových otrúb. Zvýšenie hodnoty času vývinu cesta naznačuje, že vyšší obsah vlákniny v zmesi spomaľuje proces hydratácie a vývinu lepkovej štruktúry¹⁸. Ďalej bolo stanovené, že hodnoty stability cesta sa s rastúcim obsahom otrúb znižovali. V porovnaní s pšeničným cestom bez prídavku otrúb sa stabilita cesta skrátila zo 16,15 min až na 6,34 min po prídavku 15 % špaldových otrúb. Aplikácia pšeničných otrúb mala za následok aj zvýšenie hodnôt indexu mechanickej odolnosti. Najvyššie hodnoty tohto parametra boli zaznamenané pri všetkých použitých prídavkoch pološpaldových otrúb.

Vplyv prídavku pšeničných otrúb na kvalitu cereálnych výrobkov závisí od typu výrobku, do ktorého sa pridávajú, od veľkosti ich častíc, spôsobu predúpravy otrúb a spôsobu prípravy daného výrobku. Aplikácia vyšších prídavkov pšeničných otrúb má negatívny vplyv na kvalitu konečného produktu¹⁹. Kvalitatívne parametre pečiva obohateného o otruby sú uvedené v tab. III. Zistilo sa, že objem pečiva bol v porovnaní s kontrolnou vzorkou

(330,25 cm³) významne nižší pri prídavku 15 % pološpaldových otrúb a 5–15 % špaldových otrúb. Najnižšiu hodnotu objemu dosiahlo pečivo s prídavkom 15 % špaldových otrúb (233,50 cm³). Pokles objemu výrobkov zaznamenali aj Gómez a spol.⁹ pri aplikácii extrudovaných aj neextrudovaných pšeničných otrúb do chleba. Tento efekt je spojený s nižšou schopnosťou cesta vytvoriť a zadržať plyn počas fermentácie⁹.

Stanovenie strát pečením vo výrobku je veľmi dôležité, pretože konečný pekársky produkt musí mať definovanú hmotnosť²⁰. Straty pečením v pečive s obsahom otrúb boli v rozmedzí 8,97–12,78 %. V dôsledku zvyšovania obsahu otrúb sa v pečive straty pečením znižovali. Najnižšie hodnoty pri všetkých prídavkoch boli pri pečive s obsahom pološpaldových otrúb, naopak najvyššie hodnoty boli pri pečive s prídavkom pšeničných otrúb.

Kohajdová a spol.¹¹ uvádzajú, že klenutosť pečiva pod hodnotou 0,50 je nevyhovujúca. Z výsledkov vyplýva, že klenutosť pečiva obohateného o otruby sa pohybovala v rozmedzí 0,53 až 0,41. Oproti kontrolnej vzorke (0,68) malo najnižšiu hodnotu klenutosti pečivo s prídavkom 15 % pološpaldových otrúb (0,41) a najvyššiu hodnotu pečivo s prídavkom 5 % špaldových otrúb (0,53).

Prídavok jednotlivých druhov otrúb vo výške 5 % mal v porovnaní s kontrolnou vzorkou, ktorá obsahovala 2,87 g/100 g vlákniny za následok zvýšenie obsahu celkovej potravinovej vlákniny. Výrobok obsahujúci aspoň 3 g vlákniny na 100 g možno označiť za zdroj vlákniny²¹. Túto podmienku spĺňa pečivo s 5 % prídavkom špaldových a pološpaldových otrúb, ktorých obsah vlákniny bol 4,33 a 5,59 g /100 g. V pečive s prídavkom pšeničných otrúb bol zistený najvyšší obsah vlákniny, 6,19 g/100 g, čím bola splnená podmienka minimálneho obsahu 6 g vlákniny v potravine a toto pečivo možno označiť ako pečivo s vysokým obsahom vlákniny²¹.

Tabuľka III

Kvalitatívne parametre pečiva s prídavkom otrúb

Vzorka ^a	Objem [cm ³]	Straty pečením [%]	Merný objem [cm ³ /100 g]	Klenutosť	Celková prijateľnosť [%]
KV	330,25 ± 11,09	12,90 ± 0,32	383,65 ± 11,98	0,68 ± 0,02	95,25 ± 4,36
LO 5%	318,75 ± 4,79	10,31 ± 0,47*	354,30 ± 6,67*	0,52 ± 0,01	95,08 ± 4,51
10%	288,75 ± 4,79*	9,31 ± 0,10*	317,24 ± 4,98*	0,44 ± 0,01*	92,00 ± 4,34*
15%	260,00 ± 4,08*	8,92 ± 0,43*	284,78 ± 3,66*	0,41 ± 0,01*	86,83 ± 4,31*
PO 5%	278,75 ± 7,50*	12,78 ± 0,62	318,80 ± 7,54*	0,46 ± 0,01*	84,17 ± 4,20*
10%	258,75 ± 11,09*	11,55 ± 0,40*	291,35 ± 11,88*	0,44 ± 0,02*	82,67 ± 4,08*
15%	257,50 ± 9,57*	10,12 ± 0,50*	285,38 ± 13,54*	0,42 ± 0,02*	81,33 ± 3,99*
ŠO 5%	261,00 ± 12,81*	10,79 ± 0,54*	291,10 ± 13,85*	0,53 ± 0,02*	81,00 ± 4,03*
10%	245,00 ± 5,77*	9,91 ± 0,49*	271,32 ± 5,54*	0,48 ± 0,02*	80,33 ± 3,80*
15%	233,50 ± 11,36*	8,97 ± 0,44*	255,19 ± 12,74*	0,43 ± 0,02*	79,50 ± 3,67*

^a KV – kontrolná vzorka, LO – otruby z pološpaldovej pšenice, PO – pšeničné otruby, ŠO – špaldové otruby; hodnoty * ^v indexe sú štatisticky významné rozdiely pri $P = 0,05$

Tabuľka IV
Senzorické hodnotenie pečiva

Vzorka ^a	Vzhľad	Farba kôrky	Vôňa	Farba striedky	Pružnosť	Žuvateľnosť	Chuť
KV	8,68±0,42	8,98±0,32	8,98±0,24	8,90±0,41	8,83±0,32	8,79±0,34	8,91±0,38
LO 5%	8,67±0,43	8,83±0,39	8,50±0,41*	8,67±0,40*	8,75±0,39*	8,75±0,42	8,83±0,30*
LO 10%	8,17±0,40*	8,67±0,43*	8,25±0,39*	8,67±0,36*	8,58±0,41*	8,33±0,35*	8,75±0,37*
LO 15%	7,58±0,36*	8,17±0,40*	7,92±0,34*	8,25±0,41*	8,33±0,38*	7,67±0,33*	8,08±0,29*
PO 5 %	8,08±0,39*	8,33±0,41*	8,25±0,38*	8,25±0,39*	8,25±0,33*	7,95±0,33*	7,92±0,36*
PO 10 %	8,00±0,39*	8,17±0,40*	8,25±0,41*	8,00±0,34*	8,17±0,36*	7,83±0,31*	7,83±0,34*
PO 15 %	7,92±0,33*	7,92±0,36*	8,08±0,40*	7,75±0,33*	8,08±0,37*	7,83±0,38*	7,67±0,31*
ŠO 5 %	8,17±0,40*	8,08±0,24*	8,00±0,28*	7,83±0,37*	7,75±0,37*	7,83±0,34*	7,92±0,35*
ŠO 10 %	7,67±0,26*	7,83±0,30*	8,00±0,39*	7,75±0,31*	7,67±0,29*	7,67±0,31*	7,58±0,30*
ŠO 15 %	7,58±0,39*	7,33±0,29*	7,50±0,29*	7,75±0,34*	7,58±0,33*	7,50±0,31*	7,42±0,30*

^a KV – kontrolná vzorka, LO – otruby z pološpaldovej pšenice, PO – pšeničné otruby, ŠO – špaldové otruby; hodnoty * v indexe sú štatisticky významné rozdiely pri $P = 0,05$

Výsledky senzorického hodnotenia jednotlivých vzoriek pečiva sú uvedené v tab. IV. Farba kôrky a striedky pečiva bola s rastúcim obsahom otrúb v porovnaní s kontrolnou vzorkou tmavšia. Pečivo s prídavkom 5 a 10 % pološpaldových otrúb malo prijateľnejšiu farbu v porovnaní s pečivom obohateným o pšeničné a špaldové otruby. Vo všeobecnosti, chuť pečiva s rastúcim prídavkom otrúb klesla. Najnižšiu hodnotu tohto deskriptora (7,42) malo pečivo s prídavkom 15 % špaldových otrúb. Heiniö a spol.²² uvádzajú, že pšeničné otruby dodávajú výrobkom horkastú chuť, čo je spôsobené prítomnosťou fenolových látok. Zhoršenie chuti pečiva mohlo byť ovplyvnené aj zložením obalových častí zrna, ktoré obsahujú značnú časť celulózy a lignínu²³. Obsah lignocelulózy vrstvy, väčšie častice a nerozpustná vláknina môžu taktiež spôsobiť, že výsledný produkt je tvrdší a má nesúrodú textúru. Žuvateľnosť a pružnosť pečiva, v porovnaní s kontrolnou vzorkou, sa so zvyšujúcim obsahom jednotlivých druhov otrúb zhoršovala. Pri výške prídavku 15 % bolo pečivo tvrdšie a menej pružné. Najnižšie hodnoty pružnosti a žuvateľnosti pri jednotlivých prídavkoch malo pečivo s obsahom špaldových a najvyššie hodnoty pečivo s obsahom pološpaldových otrúb.

Pri vyhodnotení celkovej prijateľnosti (tab. III) pečiva bolo so zvyšujúcim sa obsahom otrúb zistené postupné znižovanie bodového ohodnotenia. Vo všeobecnosti bolo pre hodnotiteľov v porovnaní s kontrolnou vzorkou (95,25 %) najprijateľnejšie pečivo s prídavkom pološpaldových otrúb a to pri každej výške prídavku, pričom najvyššiu hodnotu celkovej prijateľnosti malo pečivo s obsahom 5 % pološpaldových otrúb. Najnižšie hodnotenie dosiahlo pečivo s obsahom špaldových otrúb a to pri každej výške prídavku.

Záver

Pšeničné otruby sú vedľajším produktom získaným pri mletí pšenice a v cereálnych produktoch predstavujú lacný zdroj vlákniny. V práci sa sledoval vplyv inkorporácie pšeničných otrúb z rôznych odrôd pšenice na reologické parametre pšeničného cesta a kvalitatívne parametre pečiva. Samostatná časť práce bola venovaná senzorickému hodnoteniu pečiva. Bolo zistené, že s prídavkom rôznych druhov otrúb došlo k zvýšeniu hodnôt farinografickej väznosti, predĺženiu času vývinu cesta a tiež k skráteniu stability cesta. Prídavok otrúb mal tiež významný vplyv na kvalitatívne parametre pečiva. S rastúcim obsahom otrúb sa znižoval objem a špecifický objem pečiva. Senzorické hodnotenie ukázalo, že najprijateľnejšie pečivo bolo po prídavku 5 % pološpaldových otrúb. Z literárnych údajov vyplýva, že negatívny vplyv prídavku otrúb na kvalitatívne parametre výrobkov je možné eliminovať prídavkom zlepšujúcich látok alebo predúpravou pšeničných otrúb, napr. fermentáciou, alebo namáčaním. Na základe nariadenia Európskeho parlamentu a rady (ES) o výživových a zdravotných tvrdeniach o potravinách je možné konštatovať, že pečivo s 5% prídavkom špaldových a pološpaldových otrúb môžu byť považované za zdroj vlákniny a pečivo s 5% prídavkom pšeničných otrúb za potravinu s vysokým obsahom vlákniny.

Táto práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0487/16.

LITERATÚRA

- Hemdane S., Jacobs P. J., Dornez E., Verspreet J., Delcour J. A., Courtin C. M.: *Compr. Rev. Food Sci. F.* 15, 28 (2016).
- Ktenioudaki A., Butler F., Gallagher E.: *J. Cereal Sci.* 51, 402 (2010).
- Rückschloss E., Hanková A., Matúšková K.: Šlechtitelský seminář 2014: Pšenice 2014 „Rez nikdy nespí“, str. 16. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 2014.
- Xhabiri G., Acoski T., Stanojeska M., Sinani V.: *European Scientific Journal* 9, 154 (2013).
- Lattimer J. M., Haub M. D.: *Nutrients* 2, 1266 (2010).
- Verma A. K., Benerjee R.: *J. Food Sci. Technol.* 47, 247 (2010).
- Gajula H., Alav, S., Adhikari K., Herald T.: *J. Food Sci.* 73, 173 (2008).
- Hemdane S., Langenaeken N. A., Jacobs P. J., Verspreet J., Delcour J. A., Courtin C. M.: *J. Cereal Sci.* 71, 78 (2016).
- Gómez M., Jiménez S., Ruiz E., Oliete B.: *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 231 (2011).
- AACC (2000) Approved methods of american association of cereal chemists, 10th edn. The Association St. Paul, MN. moisture (method 44-19.01), ash (method 08-01.01), protein (method 46-13.01), crude fat (method 30-25.01).
- Kohajdová Z., Karovičová J., Jurasová M., Magala M.: *Cereálie, cukor, cukrovinky I., Návod na laboratorné cvičenia*. SCHK FChPT STU, Bratislava 2013.
- AOAC Method 985.29-1986 (2003) Total dietary fiber in foods. Enzymatic- gravimetric method.
- ISO 5530-1:2013. Wheat flour – Physical characteristics of doughs – Part 1: Determination of water absorption and rheological properties using a farinograph.
- Kohajdová Z., Karovičová J.: *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 9, 443 (2010).
- AACCI Method 10-05.01. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement.
- Lauková M., Kohajdová Z., Karovičová J.: *Acta Chim. Slovaca* 9, 14 (2016).
- Ellouze-Ghorbel R., Kamoun A., Neifar M., Belguith S., Ali Ayadi M., Kamoun A., Ellouze Chaabouni S.: *J. Texture Stud.* 41, 472 (2010).
- Kohajdová Z., Karovičová J., Jurasová M.: *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 11, 381 (2012).
- Onipe O. O., Jideani A. I. O., Beswa D.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 2509 (2015).
- Bojňanská T., Mocko K.: *J. Microbiol., Biotechnol. Food Sci.* 3, 190 (2014).
- Nariadenie Európskeho parlamentu a rady (ES) č. 1924/2006 z 20. decembra 2006 o výživových a zdravotných tvrdeniach o potravinách. Úradný vestník Európskej únie. On-line: http://www.uvzsr.sk/docs/info/hv/vzt_korigendumsk.pdf. Stiahnuté 10.1.2017.
- Heiniö R. L., Noort M. W. J., Katina K., Alam S. A., Sozer N., de Kock H. L., Herslethe M., Poutanen K.: *Trends Food Sci. Technol.* 47, 25 (2016).
- Katina K., Juvonen R., Laitila A., Flander L., Nordlund E., Kariluoto S., Piironen V., Poutanen K.: *Cereal Chem.* 89, 126 (2012).

M. Lauková^a, J. Karovičová^a, Z. Kohajdová^a, and M. Babulicová^b (^a Department of Food Technology, Institute of Food Science and Nutrition, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava; ^b National Agricultural and Food Centre, Research Institute of Plant Production, Piešťany): **Utilization of Wheat Bran from Different Wheat Varieties in Bakery Products**

The aim of this study was to evaluate the chemical composition of different kinds of wheat bran. Effects of the addition of the wheat bran to reach the concentration of 5, 10 and 15 % on wheat dough rheology, physical and sensory parameters of baked rolls were examined. It was concluded that the wheat bran addition increased water absorption and mixing tolerance index, prolonged dough development time and decreased dough stability. It was observed that addition of the bran significantly reduced volume and specific volume of baked rolls. The addition of the bran from crossbreed (Lubica) caused lower baking loss than that of wheat and spelt bran. Generally, bakery products containing the bran had lower values of cambering, as compared with the reference rolls. It resulted from the sensory evaluation that bakery products containing the wheat bran showed inferior appearance, taste and color values. It was also shown that baked rolls with the addition of 5 % wheat bran can be considered as food with high fiber content.

ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – ŠTRUKTÚRA, POLOHOVÁ ŠPECIFITA IZOENZÝMOV LIPOXYGENÁZ A ICH VÝZNAM

LÝDIA BEZÁKOVÁ^a, IVANA HOLKOVÁ^a,
ANDREA BALAŽOVÁ^a, MAREK OBLOŽINSKÝ^a
a PETER MIKUŠ^b

^a Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, ^b Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava
bezakova@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.3.17, prijaté 10.4.17.

Kľúčové slová: štruktúra lipoxigenáz, izoenzýmy lipoxigenáz, mutácia génov, polynenasýtené masné kyseliny, inhibitory lipoxigenáz

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika živočíšnych lipoxigenáz – štruktúrne črty a substrátová špecificita
 - 2.1. Substrátová špecificita lipoxigenáz
 - 2.2. Štruktúra lipoxigenáz
 - 2.3. Interakcia substrátu v aktívnom mieste lipoxigenáz
3. Nomenklatura lipoxigenáz
4. Izoenzýmy lipoxigenáz
 - 4.1. 5-Lipoxigenáza (5-LOX)
 - 4.2. 8-Lipoxigenáza (8-LOX)
 - 4.3. 12-Lipoxigenáza (12-LOX)
 - 4.4. 12/15-Lipoxigenáza (12/15-LOX)
5. Záver

1. Úvod

Lipoxigenázy (LOX, linoleát : O₂ oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) patria do génovej rodiny dioxygenáz, ktoré majú v aktívnom mieste viazaný ión železa. Katalyzujú priestorovo a polohovo špecifickú adíciu molekulového kyslíka na polynenasýtené masné kyseliny s *cis,cis*-1,4-pentadiénovým zoskupením dvojítych väzieb (ako sú kyselina arachidónová – C20:Δ4, ω-6; linolová – C18: Δ2, ω-6; alebo linolénová – C18: Δ3, ω-3), a tým premenu *cis,cis*-1,4-pentadiénovej štruktúry dvojítych väzieb na príslušné 1,3-*cis,trans*-5-hydroperoxidové deriváty¹. Lipoxigenázy sú kľúčovým enzýmom lipoxigenázovej cesty. Aktívna LOX metabolická cesta vyžaduje uvoľňovanie masných

kyselín z esterov lipidov lokalizovaných v bunkových membránach. Hydrolytické štiepenie fosfolipidov v membránach katalyzuje cytosolová fosfolipáza A₂ (cit.^{2,3}).

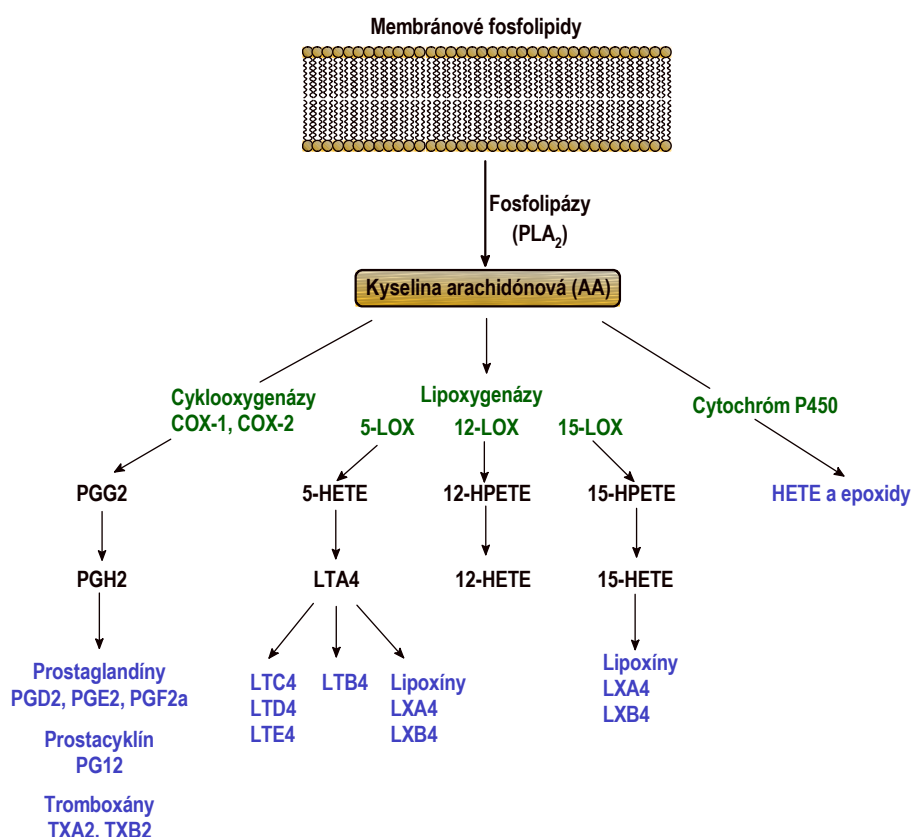
U cicavcov sa LOX vyskytujú v 4 izoformách, a to 5-, 8-, 12- a 15-LOX tvoriacich hydroxyeikosatetraénové kyseliny (HETE). 15-LOX môže byť zaradená do podtriedy retikulocytového typu (Typ 1) alebo epidermálneho typu (Typ 2). Vzhľadom k tomu, že retikulocytový typ 15-LOX je veľmi podobný na leukocytárny typ 12-LOX, tieto enzýmy sú označené ako 12/15-LOX (cit.⁴).

2. Charakteristika živočíšnych lipoxigenáz – štruktúrne črty a substrátová špecificita

2.1. Substrátová špecificita lipoxigenáz

Lipoxigenázy sa zaraďujú medzi lipidy peroxidujúce enzýmy schopné oxygenácie polynenasýtených masných kyselín na zodpovedajúce hydroperoxidové deriváty. Sú to dioxygenázy, t.j. katalyzujú adíciu molekulového kyslíka na voľné masné kyseliny (MK) alebo esterikované polynenasýtené masné kyseliny obsahujúce minimálne dve izolované *cis*-dvojité väzby za formovania príslušných hydroperoxidových derivátov. V bunkách cicavcov sú substrátmi LOX najmä polynenasýtené masné kyseliny (PNMK) – kyselina linolová (LA, C18:2) a kyselina arachidónová (AA, C20:4)⁷. Obidve slúžia ako substráty pre polohovo špecifické formy LOX. Vo všeobecnosti LOX cicavcov uprednostňujú ako substrát voľnú masnú kyselinu pred masnou kyselinou viazanou v esteroch lipidov. Nakoľko je koncentrácia voľných PNMK v bunke nízka, aktivácia lipoxigenázovej metabolickej cesty vyžaduje uvoľnenie substrátu – masnej kyseliny (MK) z esterov lipidov lokalizovaných v membráne bunky. Po hydrolytickom štiepení membránových lipidov za katalýzy fosfolipázou A₂ sú uvoľnené MK hlavne kyselina arachidónová (AA), kyselina eikozapentaénová (EPA) a kyselina doko-sahexaénová (DHA) oxygenované cyklooxygenázami (COX) na prostaglandíny, prostacyklíny a tromboxány, alebo lipoxigenázami (LOX) za vzniku hydroperoxy derivátov PNMK. Podobnú funkciu má aj cytochróm P-450 oxygenáza (CYP) pri premene AA na hydroperoxydy². Primárne produkty LOX metabolickej cesty sa následne menia na rôzne biologicky aktívne lipidové mediátory, ako sú leukotriény, lipoxíny, hepxilíny, eoxíny, resolvíny, protektíny a iné^{8,9} (obr. 1).

LOX môžu oxidovať aj PNMK, ktoré sú viazané v štruktúre fosfolipidov alebo esterov cholesterolu¹⁰. Vzniknutá hydrofilná peroxidová skupina MK môže meniť fyzikálno-chemické vlastnosti lipidov a oxidované lipidy



Obr. 1. **Metabolické cesty premeny kyseliny arachidónovej.** Kyselina arachidónová po uvoľnení z membrán účinkom fosfolipázy A_2 môže byť metabolizovaná cyklooxygenázami, lipoxygenázami a cytochróm P-450 oxygenázami⁸

v lipidovej dvojvrstve biologickej membrány strácajú ochrannú úlohu¹¹. LOX je tiež kľúčovým enzýmom pre tvorbu prooxidačných faktorov. Lipoxygenázami katalyzovaná tvorba peroxidov lipidov ovplyvňuje aj aktivitu redoxne závislej transkripcie a translácie, čo vedie k tzv. up-regulácii alebo down-regulácii expresie génov citlivých na redoxnú rovnováhu v bunke¹².

LOX patria medzi ubikvitárne enzýmy, rozšírené tak v rastlinnej, ako i živočíšnej ríši. Ich prítomnosť bola dokázaná a preskúmaná tiež u baktérií, húb, jednobunkových rias, a tiež nižších tried morských živočíchov⁸. LOX nie sú prítomné v genóme kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) z dôvodu neprítomnosti desaturáz potrebných na syntézu substrátu¹³.

Z hľadiska lokalizácie na subcelulárnej úrovni sú lipoxygenázy prítomné najmä v cytoplazme v solubilizovanej forme, ale nachádzajú sa tiež v cytoplazmatickej membráne, mitochondriách, mikrozómoch, matrixe a membráne chloroplastov, vo vakuolách a lipidových telieskach¹⁴.

2.2. Štruktúra lipoxygenáz

Zo štruktúrneho hľadiska je LOX monomérny enzým, ktorý v aktívnom centre obsahuje ión železa v nehémovej forme. Keďže LOX sú členmi multigénovej rodiny, dĺžka ich polypeptidového reťazca je variabilná. U cicavcov predstavuje 662–711 aminokyselín (AK) s molekulovou hmotnosťou 75 až 80 kDa. U rastlín je tvorený 838–923 AK s molekulovou hmotnosťou 94 až 104 kDa (cit.¹⁵). Aminokyselinové sekvencie rastlinných a cicavčích lipoxygenáz vykazujú signifikantnú homológiu. Izoenzýmy LOX zo sójových bôbov, LOX-1 a LOX-3, sú vo svojich sekvenciách aminokyselín identické na 72 %, ale zdieľajú iba 25% zhodu v sekvencii k akejkoľvek cicavčej 15-LOX. LOX u cicavcov sú o 165–261 AK kratšie ako LOX rastlín^{16,17}.

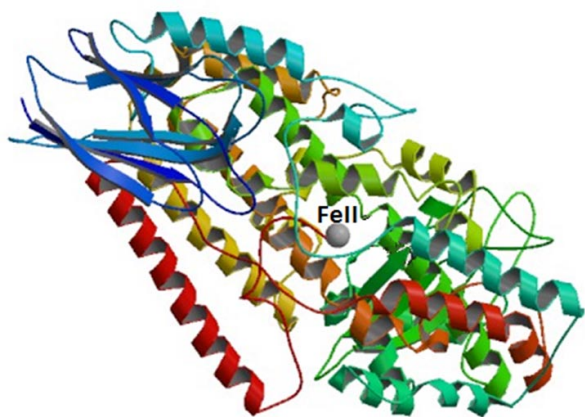
Súčasná poznávanie štruktúry LOX je založené na rozriešení kryštálovej štruktúry sójovej lipoxygenázy. Hoci sójová lipoxygenáza LOX-1 bola kryštalizovaná už v roku 1947, až v roku 1993 sa pomocou röntgenových difrakčných metód detailnejšie odhalila kryštálová štruktúra izoenzymov sójovej lipoxygenázy LOX-1 a LOX-3 izolovaných z *Glycine max*¹⁸. Postupne bolo popísané i priestorové usporiadanie AK cicavčej 15-LOX (cit.¹⁹), uskutočnila

sa kryštalizácia králičej retikulocytovej 15-LOX a neskôr bola vyriešená jej 3D-štruktúra²⁰.

Napriek rozdielnej AK sekvencii, 3D štruktúry rastlinných a cicavčích LOX sa vyznačujú vysokou mierou podobnosti. Všetky izoformy LOX sú zložené z jediného polypeptidového reťazca tvoriaceho dve hlavné domény. Rastlinné i cicavčie enzýmy majú N-terminálnu doménu zloženú z ôsmich antiparalelných β -barelov. U králičej 15-LOX je zakomponovaných 110 AK, avšak v prípade sójovej lipoxigenázy je táto doména výrazne väčšia ako u králičieho enzýmu^{17,21}.

C-terminálna doména je centrom katalytických dejov enzýmu, je zložená z 18 špirál prerušených antiparalelným β -barelom, formuje aktívne miesto, kde sa nachádza jeden atóm železa. Takmer vo všetkých lipoxigenázach je v aktívnom mieste nehémovo viazaný ión železa s výnimkou húb, u ktorých sa vyskytuje mangán. Helikálna doména navyše ohraničuje dve vnútorné dutiny. Prvá z nich má rúrkovitý tvar, vykazuje dioxygenázovú aktivitu a zároveň zabezpečuje kyslíku a mastným kyselinám prístup k atómu železa¹⁷.

Centrom C-terminálnej domény sú dva veľké helixy obsahujúce histidinové ligandy iónu železa. Ten je viazaný v oktaedrickej koordinačnej sfére pozostávajúcej z His365, His540, His544 a molekuly vody vytvárajúcej rohy oktaédrového štvorca a His360 s C-terminálnym Ile662 tvoriacich vertikálnu os. Sekvenčné analýzy odhalili vysokú konzervovanosť ligandov s výnimkou jedného histidinu¹³. U živočíchov sú teda štyri ligandy tvorené aminokyselinou histidín. Piatym ligandom je atóm kyslíka resp. molekula vody pochádzajúca z koncovej karboxylovej skupiny izoleucínu stabilizovaná vodíkovou väzbou. Posledným, šiestym ligandom môže byť serín, asparagín i histidín^{17,22–24}. Trojrozmerná štruktúra králičej 15-LOX bola stanovená na základe röntgenovej štruktúrnej analýzy⁴⁶. Schématický pohľad na štruktúru LOX je znázornený na obr. 2.



Obr. 2. Trojrozmerná štruktúra králičej 15-LOX s obsahom nehémového iónu železa v C-katalytickej doméne^{46,52}

2.3. Interakcia substrátu v aktívnom mieste lipoxigenáz

Na základe röntgenovej kryštalografickej analýzy je predpokladaná substrát-viažúca dutina „vrecúško“ králičej retikulocytovej 15-LOX definovaná nasledovne: „dno“ tvoria postranné reťazce Phe353, Met419, Ile418 a Ile593; „steny“ substrát viažúcej dutiny tvoria hydrofóbne AK zvyšky s výnimkou dvoch polárnych zvyškov – Glu357 a Gln548 – hraničiacich s iónom železa v aktívnom centre; „vchod“ dutiny vystiela bočný reťazec Arg403, ktorému sa pripisuje interakcia s karboxylovou skupinou substrátu^{25,26}. Predpokladá sa, že hydrofóbne vnútro dutiny spolu s nabitým bočným reťazcom arginínu na ústi dutiny usmerňujú vstup a uloženie kyseliny arachidónovej v dutine vo vhodnej polohe pre 5-, 8-, 12-, alebo 15-oxygenáciu. Podľa súčasných znalostí sa uplatňujú tri typy väzbových interakcií:

- hydrofóbne interakcie metylového konca substrátu s AK zvyškami tvoriacimi dno substrát viažúcej dutiny,
- π -elektrónové interakcie medzi násobnými väzbami substrátu a aromatickými postrannými reťazcami AK tvoriacich „steny“ dutiny,
- iónové interakcie koncovej karboxylovej skupiny substrátu a kladne nabitým AK zvyškom Arg403.

Pre polohovú špecifickosť LOX je dôležitá samotná hĺbka dutiny a jej objem. Hĺbka dutiny je daná trojicou AK tvoriacich dno dutiny (tzv. koncepcia triád). Mutagénne zmeny týchto AK na AK s menšími bočnými reťazcami viedli k zmene 12/15-LOX na 12-LOX a preferenčnú tvorbu 12-HETE (cit.^{13,20}) (obr. 3).

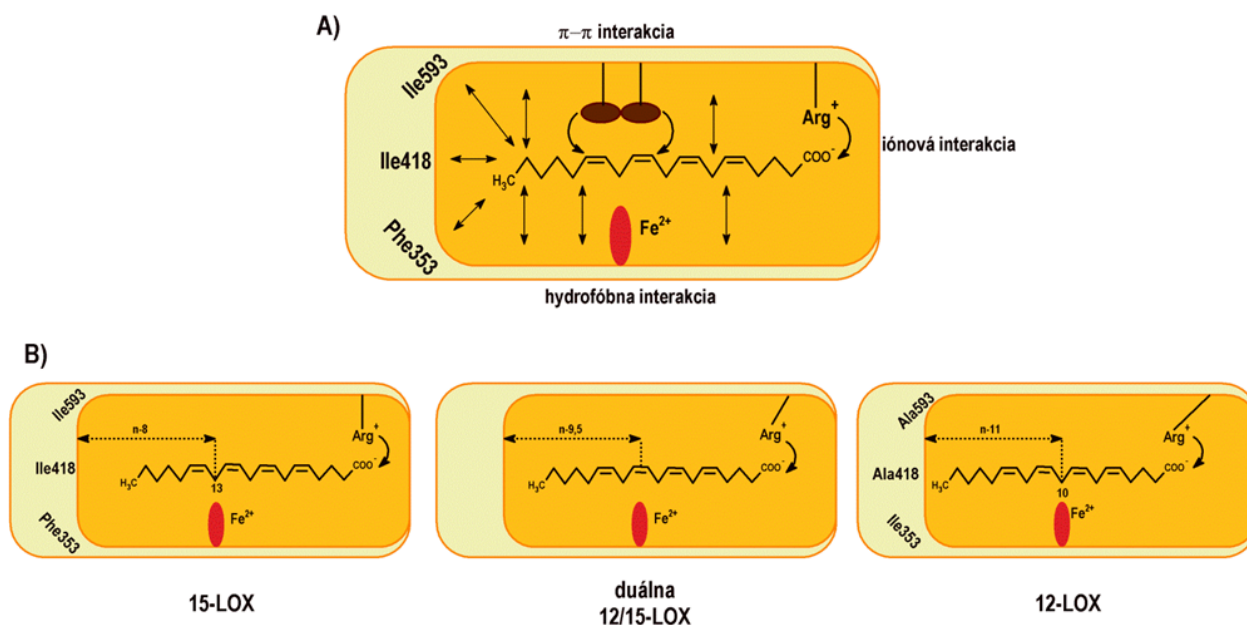
3. Nomenklatúra lipoxigenáz

Keďže LOX tvoria superrodinu enzýmov, systematika názvoslovia vychádza z pomenovania produktu ich metabolickej reakcie, resp. z polohy dioxygenácie na uhlíku ich substrátu, ktorým je u rastlín LA a AA u cicavcov^{17,27}.

LOX premieňa polynenasýtenú MK s obsahom 1,4-pentadienového systému dvojitéch väzieb na príslušné hydroperoxidové deriváty. Atmosferický kyslík slúži ako druhý substrát. Na podklade polohovej špecifity dioxygenácie AA rozlišujeme u cicavcov štyri základné typy izoenzýmov lipoxigenáz^{28–30}.

Sumárne možno LOX klasifikovať podľa polohy dioxygenácie AA, u živočíchov sa vyskytuje 5-, 8-, 12- a 15-LOX (cit.^{31,32}):

- 5-lipoxigenáza (5-LOX, EC 1.13.11.34, arachidonát 5-lipoxigenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-5 reťazca AA za vzniku (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-5*S*-hydroperoxyeikosa-6,8,11,14-tetraénovej kyseliny (5*S*-HpETE);
- 8-lipoxigenáza (8-LOX, EC 1.13.11.40, arachidonát 8-lipoxigenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-8 do reťazca AA za vzniku (5*Z*,9*E*,11*Z*,15*Z*)-(8*S*)-hydroxyeicosa-5,9,11,15-tetraénovej kyseliny (8*S*-HpETE);



Obr. 3. Interakcia medzi 15-LOX a substrátom – kyselinou arachidónovou (AA). Aktivne miesto LOX je vrecko, ktoré je tvorené bočnými reťazcami hydrofóbných aminokyselín (AK). Polyénové mastné kyseliny (MK) sú orientované metylovou skupinou k AK v aktivnom mieste. Nehémovo viazaný ión železa v aktivnom mieste je znázornený červenou farbou. (A) Medzi MK a AK v aktivnom mieste sa uplatňujú tri typy väzbových síl: (i) hydrofóbné interakcie medzi nepolárnymi reťazcami MK s postrannými reťazcami hydrofóbných AK – dvojité šípky, (ii) iónové interakcie medzi karboxylovou skupinou MK s Arg, (iii) π -elektrónové interakcie aromatických AK s dvojíťmi väzbami MK. (B) Substrát v aktivnom mieste 12- a 15-LOX enzýmov (singulárna polohová špecifita) a substrát v aktivnom mieste 12/15-LOX s duálnou špecifitou^{20,13}

- 12-lipoxygenáza (12-LOX, EC 1.13.11.31, arachidonát 12-lipoxygenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-12 do reťazca AA za vzniku (5Z,8Z,10E,14Z)-12S-hydroperoxyeikosa-5,8,10,14-tetraénovej kyseliny (12S-HpETE);
- 15-lipoxygenáza (15-LOX, EC 1.13.11.33, arachidonát 15-lipoxygenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-15 do reťazca AA za vzniku (5Z,8Z,11Z,13E)-15S-hydroperoxyeikosa-5,8,11,13-tetraénovej kyseliny (15S-HpETE).

Alternatívnym spôsobom klasifikácie je rozdelenie cicavčích LOX na základe fylogenetickú príbuznosti na štyri skupiny: 1) 12S/15S-LOX (zahŕňajúce retikulocytový a leukocytárny typ 12- a 15-LOX s duálnou polohovou špecifitou); 2) doštičkový typ 12S-LOX; 3) 5S-LOX a 4) epidermálny typ LOX (zahŕňa 12R-LOX, 15-LOX-2, 8S-LOX a typ LOX-3)^{33,34}.

S prihliadnutím na stereošpecifitu sa rozlišujú *S*-, resp. *R*-LOX (napr. 12S-LOX a 12R-LOX)^{33,34}. Priestorová špecifita je daná prítomnosťou unikátneho AK zvyšku na protiahlej strane voči nehémovo-viazanému atómu železa. V prípade, že substrát viažuce miesto je tvorené glycinom, vznikajú produkty s pravotočivou (*R*) konfiguráciou. Ak sa v tomto mieste vyskytuje alanín, je uprednostnená syntéza produktov s ľavotočivou (*S*) konfiguráciou. Polohová špecifita nie je absolútnou vlastnosťou enzýmu, ale vo veľkej miere závisí od substrátu a jeho štruktúry. Vstupom MK

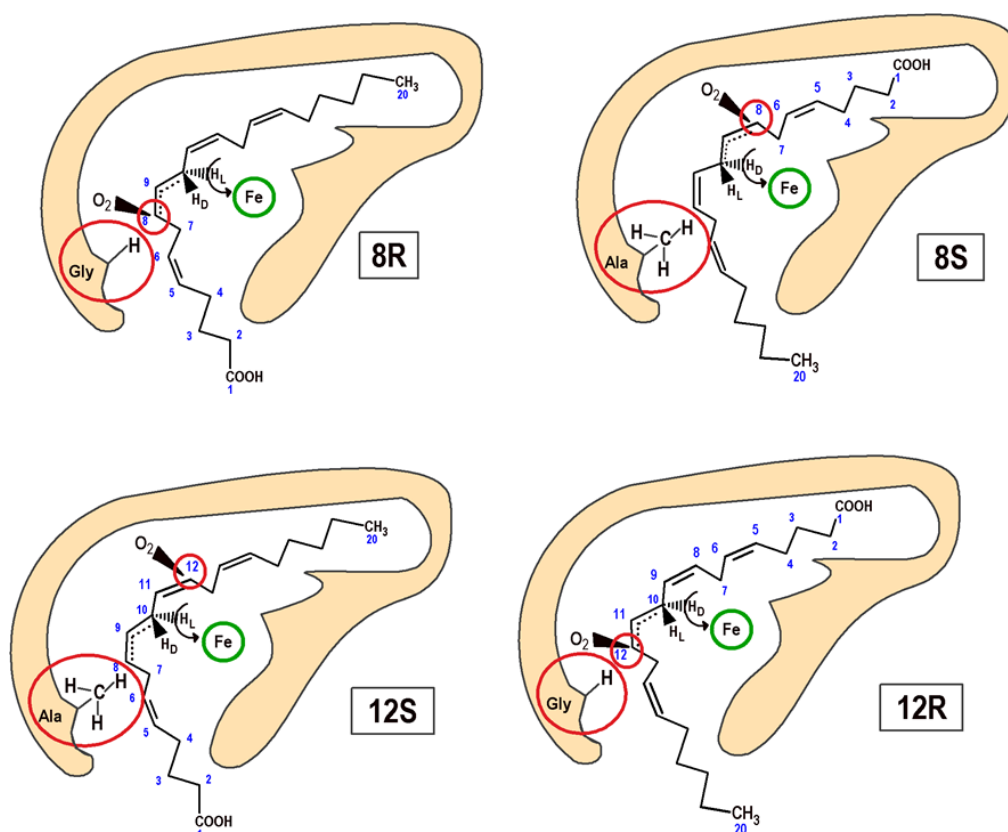
do aktivného miesta metylovým koncom („tail-first“ orientácia), dochádza k oxygenácii v polohe C-8. Ak MK vstupuje do aktivného miesta enzýmu karboxylovým koncom, s orientáciou „end-first“, nastáva oxygenácia v polohe C-12 (cit.^{13,35,36}) (obr. 4).

Ľudský genóm obsahuje šesť funkčných génov LOX (*ALOX5*, *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*), ktoré kódujú šesť rôznych LOX izoform. S výnimkou *ALOX5* génu, ktorý bol mapovaný na chromozóme 10, všetky ostatné LOX gény sú lokalizované na chromozóme 17. Zodpovedajúce gény myši boli detekované na chromozómoch 6 a 11 (cit.³⁷).

4. Izoenzýmy lipoxygenáz

4.1. 5-Lipoxygenáza (5-LOX)

Cicavčia 5-LOX je najlepšie charakterizovaným izoenzýmom s molekulovou hmotnosťou 78 kDa. Je distribuovaná najmä v bunkách imunitného systému, od monocytov, makrofágov, mastocytov, bazofilov, eozinofilov a neutrofilov³⁸, cez dendrické a penové bunky aterosklerotického tkaniva, až po žirné bunky a B-lymfocyty³⁰. Za fyziologických podmienok sa 5-LOX vyskytuje v inaktivovanej forme s viazaným kationom železa Fe²⁺. Konverzia 5-LOX na aktívnu Fe³⁺ formu vyžaduje prítom-



Obr. 4. Tvorba *R*-, resp. *S*-enantiomérov v aktívnom mieste 8-LOX alebo 12-LOX. Tvorba *R*- alebo *S*-enantiomérov v aktívnom mieste LOX je ovplyvnená prítomnosťou rôznych aminokyselín v substrát viažúcom vrecku LOX (cit. ³⁵)

nosť ATP, Ca^{2+} , 5-LOX aktivujúceho proteinu (FLAP) a hydroperoxidov. Práve potreba aktivácie a schopnosť asociácie s jadrovou membránou odlišuje 5-LOX od ostatných izoenzýmov. Napokon sa aktivovaná 5-LOX presúva z jadra do jadrovej membrány, resp. z cytozolu do cytoplazmatickej membrány. Konečným dôsledkom je produkcia leukotriénov – prozápalovo pôsobiach lipidových mediátorov. Spoločne s 15-LOX však na druhej strane zabezpečuje aj syntézu protizápalovo pôsobiach lipoxínov³⁹.

4.2. 8-Lipoxigenáza (8-LOX)

Existencia 8-LOX, ako jedného z LOX izoenzýmov, bola dokázaná v tkanivách potkanov a myši, u ktorých dochádza k expresii 8S-LOX, za vzniku 8S-HpETE. Prítom ľudský a hovädzí homológ tohto enzýmu sú schopné oxygenácie AA len na pozícii C-15, avšak 8-HETE vystupuje vo funkcii substrátu. 8S-HETE sa špecificky viaže a aktivuje receptory v bunkovom jadre PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor α), následne aktivuje transkripciu a transláciu, výsledkom je stimulácia diferenciácie keratinocytov⁴⁰.

Hoci indukovateľná myšacia 8S-LOX a jej ľudský homológ, 15S-LOX-2, zdieľajú 78% zhodu v aminokyselinovej sekvencii, ich polohová špecifita je odlišná. Výskum bol zameraný na determinanty polohovej špecifity s použitím riadenej mutagenézy. Výmenou tretiny C-terminálnej domény 8-LOX s odpovedajúcou časťou 15-LOX-2 sa získal chimerický enzým s výhradne 15S-lipoxigenázou aktivitou⁴¹.

4.3. 12-Lipoxigenáza (12-LOX)

V súčasnosti poznáme tri typy 12-lipoxigenáz, ktoré sa diferencujú na základe substrátovej špecifickosti, odlišnej imunologickej a biochemickej odpovede a podľa výskytu v určitom type tkaniva. Prvé dva typy boli izolované z ľudských buniek, ide o epidermálnu a trombocytovú 12-LOX. Prítomnosť leukocytovej 12-LOX bola zistená u ošípaných⁴².

Nárast aktivity 12-lipoxigenáz je spájaný najmä s výskytom imunodeficientných porúch a malígnych nádorov, predovšetkým rakovinou prsníka⁴³. Samotná 12-LOX a produkty jej metabolickej premeny 12(S)-HETE vedú k zvýšeniu tvorby vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF) v matrixe nádoru³⁸.

4.4. 15-Lipoxigenáza (15-LOX)

Izoenzýmy 15-LOX sa vyskytujú v dvoch formách, 15-LOX-1 a 15-LOX-2. 15-LOX-1 katalyzuje premenu LA na nestabilnú racemickú zmes 13-hydroperoxy-9Z,11E-oktadekadiénovej kyseliny (13-HpODE). Substrátom 15-LOX-2 je AA a konečným produktom oxygenácie je 15-hydroperoxyeikosatetraénová kyselina (15-HpETE)³⁸.

15-LOX bola popísaná v králičích retikulocytoch a je schopná oxidovať aj fosfolipidy biologických membrán¹⁰. Tento enzým bol purifikovaný do homogenity z králičích retikulocytov a biochemicky charakterizovaný⁴⁴. Neskôr bol podobný enzým izolovaný z ľudských eozinofilov⁴⁵. Porovnanie kinetických parametrov viedlo k záveru, že tento enzým, resp. *ALOX15* gén je ľudský ortológ kráľicej 15-LOX. 15-LOX retikulocytov u iných druhov cicavcov nebola popísaná. Avšak u myši, ošipaných a potkana bol identifikovaný leukocytový typ 12-LOX, a tento je považovaný za funkčný ekvivalent retikulocytového typu 15-LOX u týchto druhov⁴⁶. Retikulocytové ľudské a králičie 15-LOX zdieľajú vysoký stupeň fylogenetической príbuznosti s leukocytovým typom 12-LOX z prasat'a, potkanov a myši⁴⁶. Medzi leukocytovým typom 12-LOX a ďalšími 12-LOX izoformami je však iba nízky stupeň zhodnosti sekvencie. Ľudská retikulocytová 15-LOX a myšia leukocytová 12-LOX zdieľajú podobné mechanizmy regulácie cytokínov a expresiu génu. V ľudskom genóme neexistuje žiadny samostatný gén kódujúci leukocytový typ 12-LOX a u myši nie je ani žiadny dôkaz o gène pre 15-LOX retikulocytového typu. Avšak u kráľika sú samostatné gény pre retikulocytový typ 15-LOX a leukocytový typ 12-LOX. Vysoký stupeň (> 99 %) zachovania sekvencie medzi týmito izoformami môže pochádzať z génovej duplikácie⁴⁷. Tieto enzýmy boli označené 12/15-LOX a oxygenáciou AA produkujú aktívne metabolity lipidov, ktorých expresia sa vyskytuje v mnohých chorobných stavoch⁴⁸.

4.5. 12/15-Lipoxigenáza (12/15-LOX)

Ortológy *ALOX15* sa vyskytujú u väčšiny cicavcov a môžeme ich klasifikovať na základe polohovo špecifickej oxygenácie AA na 12- a 15-LOX (cit.¹³). 12-LOX katalyzuje vznik 12-HpETE produktov a je typická pre myši, ošipané a dobytok. U človeka, orangutána a šimpanza však prevláda ortológ *ALOX15* formujúci 15-HpETE produkty^{49,50}. Výnimkou je králik, u ktorého je exprimovaná izoforma 12-LOX súčasne s 15-LOX v závislosti od typu tkaniva⁵⁰. V nedozretých červených krvinkách prevláda 15-LOX izoforma, zatiaľ čo v monocytoch 12-LOX. Zaujímavosťou je prítomnosť jediného génu v genóme kráľika kódujúceho oba typy LOX izoformiem. Sekvencia DNA pre králičí enzým katalyzujúci vznik 15-HpETE naznačuje prítomnosť AK zvyškov s priestorovo objemnejším bočným reťazcom v aktívnom centre LOX. V polohe 353 je to fenylyalanín a v polohách 418 a 593 izoleucín. Ide o pozície determinujúce polohovú špecifitu LOX (cit.¹³). Avšak cDNA pre *ALOX15* izolovaná z monocytov

kráľika obsahuje na pozícii 353 leucín. Proteín, ktorý bol exprimovaný v *E.coli*, katalyzoval tvorbu produktov typu 12-HpETE (cit.⁵¹).

Koncept triád opisuje možnosť konvertovania 15-LOX, tvoriacej polohovo špecifické produkty 15-HpETE na 12-LOX formujúcej 12-HpETE produkty zmenou jedinej aminokyseliny v polynukleotidovom reťazci LOX (cit.⁴⁸). Ako cieľová AK u 15-LOX človeka (ktorá vedie k zmene polohovej špecificity LOX) môže byť izoleucín 418 a metionín 419, fenylyalanín 353 alebo izoleucín 593 (cit.²⁷). Všetky cieľové AK tvoria dno štrbiny aktívneho centra a determinujú hĺbku, do ktorej substrát môže vojsť⁴⁹. Aplikáciou tejto stratégie Ivanov a spol.¹³ premenili ľudskú 15-LOX na izoformu 12/15-LOX vyskytujúcu sa u hlodavcov a naopak, 12/15-LOX hlodavcov môže byť mutáciou jedinej AK čiastočne konvertovaná na „ľudskú“ 15-LOX. U potkana je však táto zmena možná len po ovplyvnení cieľových AK mutáciou podľa Borngräber I a Borngräber II (cit.⁴). Ľudská 15-LOX-2 tvorí výlučne 15-HpETE produkty. Myši ortológ oxygenuje ten istý typ substrátu za vzniku 8-HpETE produktov. Mutácia dvoch AK nachádzajúcich sa v kritických pozíciách umožňuje tento enzým myši premeniť na 15-LOX-2 podobnú ľudskej^{13,41}. Pekárová a spol. 12/15-LOX potkana exprimovali v *E. coli* a línii eukaryotických buniek N2a. Pripravili 6 typov mutantov typu Borngräber I, Sloane a Borngräber II, kde sa uskutočnila zmena jednej AK. Po stanovení LOX aktivity kontrolného enzýmu a mutovaných enzýmov RP-HPLC metódou sa pozorovala zmena aktivity, polohovej špecificity a preferencia substrátu⁴.

5. Záver

Tento prehľadný článok sa zameriava na objasnenie štruktúry a úlohy lipoxigenáz vo fyziologických i patologických procesoch a naznačuje stratégiu mutagenézy génov kódujúcich LOX s cieľom ovplyvniť polohovú špecifitu týchto enzýmov.

Izoenzýmové formy LOX sú prítomné v multiplných systémoch a orgánoch ľudského tela, zahŕňujúc adipocytové, vaskulárne, imunitné a nervové tkanivá. V dôsledku výraznej zvýšenej expzie izoenzymov LOX (5-, 8-, 12- a 15-LOX) a ich metabolitov v ľudskom organizme bolo zistené zakomponovanie do rôznych zápalových, nádorových a kardiovaskulárných ochorení, diabetes mellitus, ochorení centrálného a periférneho nervového systému.

Množstvo štúdií v ostatných rokoch prispieva k objasneniu úlohy, ktorú lipoxigenázy hrajú v uvedených ochoreniach. Vývoj zvieracích modelov s cieľovými génovými mutáciami ukazuje možnosti k lepšiemu pochopeniu úloh lipoxigenáz. Hľadanie selektívnych inhibítorov lipoxigenáz a jej izoenzymových foriem je aktívna oblasť skúmania a môže byť dôležitým výskumným nástrojom a sľubným cieľom pre liečbu širokého spektra ľudských ochorení.

Práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0392/14, VEGA 1/0873/15 a projektu APVV-0484-1.

LITERATÚRA

- Hoffman P., Bezáková L., Holková I., Pekárová M., Obložinský M.: Chem. Listy 106, 639 (2012).
- Tootle T. L.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 1629 (2013).
- Zuliani G., Galvani M., Leitersdorf E., Volpato S., Cavalieri M., Fellin R.: Curr. Pharm. Design 15, 4087 (2009).
- Pekárová M., Kühn H., Bezáková L., Ufer C., Heydeck D.: Arch. Biochem. Biophys. 571, 50 (2015).
- Walther M., Hofheinz K., Vogel R., Roffeis J., Kühn H.: Arch. Biochem. Biophys. 516, 1 (2011).
- Kühn H., Banthiya S., Van Leyen K.: Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 1851, 308 (2015).
- Valentine R. C., Valentine D. L.: Prog. Lipid Res. 43, 383 (2004).
- Funk C. D., Chen X. S., Johnson E. C., Zhao L.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 303 (2002).
- Andreou A., Feussner I.: Phytochemistry 70, 1504 (2009).
- Belkner J., Wiesner R., Kühn H.: Agents Actions Suppl. 37, 78 (1992).
- Kim G. H., Ryan J. J., Archer S. L.: Antioxid. Redox Signal. 18, 1920 (2013).
- Buelna-Chontal M., Zazueta C.: Cell Signal. 25, 2548 (2013).
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kühn H., Walter M.: Arch. Biochem. Biophys. 503, 161 (2010).
- Holková I., Bezáková L., Bilka F., Balážová A., Vanko M., Blanáriková V.: Plant Physiol. Biochem. 48, 887 (2010).
- Rapp J.: Dissertation, The University of Toledo, USA 2006.
- Chen X. S., Funk C. D.: J. Biol. Chem. 276, 811 (2001).
- Kühn H., Saam J., Eibach S., Holzhutter H. G., Ivanov I., Walther M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 93 (2005).
- Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M.: Science 260, 1482 (1993).
- Kuban R. J., Wiesner R., Rathman J., Veldink G., Nolting H., Sole V. A., Kühn H.: Biochem. J. 332, 237 (1998).
- Kühn H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 62, 255 (2000).
- Gianguido C., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Segraves E. N., Chruszcz M., Neidig M., Ruddat V., Zhou J., Weckler A. T., Minor W., Solomon E. I., Holman T. R.: Biochemistry 45, 1023 (2006).
- Gillmor S. A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F.: Nat. Struct. Biol. 4, 1003 (1997).
- Gilbert N. C., Bartlett S. G., Waight M. T., Neau D. B., Boeglin W. E., Brash A. R., Newcomer M. E.: J. Sci. 331, 217 (2011).
- Borngräber S., Kuban R. J., Kühn H.: Adv. Exp. Med. Biol. 469, 91 (1999).
- Cofta G., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Schwarz K., Walter M., Anton M., Gerth C., Feussner I., Kühn H.: J. Biol. Chem. 276, 773 (2001).
- Chidananda C., Sattur A. P.: J. Agric. Food Chem. 55, 2879 (2007).
- Radmark O., Samuelson B.: J. Lipid Res. 50, 40 (2009).
- Aparoy P., Reddy K. K., Reddanna P.: Curr. Med. Chem. 19, 3763 (2012).
- Joo Y. C., Oh D. K.: Biotechnol. Adv. 30, 1524 (2012).
- Marks F., Furstenberger G.: Prostaglandins, Leukotrienes, and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application. str. 109. Wiley-VCH, Weinheim 1999.
- Horn T., Kakularam K. R., Anton M., Richter C., Reddanna P., Kühn H.: Redox Biol. 1, 566 (2013).
- Jansen C., Hofheinz K., Vogel J., Roffeis M., Anton M., Reddanna P., Kühn H., Walter M.: J. Biol. Chem. 286, 37804 (2011).
- Gianguido C., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Schneider C., Pratt D. A., Porter N. A., Brash A. R.: Chem. Biol. 14, 473 (2007).
- Szefel J.: Curr. Mol. Med. 11, 1 (2011).
- Gilbert N. C., Rui Z., Neau D. B., Waight M. T., Bartlett S. M., Boeglin W. E., Brash A. R., Newcomer M. E.: FASEB J. 26, 3222 (2012).
- Furstenberger G., Marks F., Krieg P.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 235 (2002).
- Jisaka M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 136 (2005).
- Yeung J., Apola P. J., Vesci J., Stolla M., Rai G., Simeonov A., Jadhav A., Fernandez-Perez P., Maloney D. J., Boutaud O., Holman T. R., Holinstat M.: Thromb. Haemostasis 110, 569 (2013).
- Yeung J., Tourdot B. E., Adili R., Green A. R., Freedman C. J., Fernandez-Perez P., Yu J., Holman T. R., Holinstat M.: Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 36, 2068 (2016).
- Kühn H., Brash A. L.: J. Biol. Chem. 265, 1454 (1999).
- Turk R., Maas L., Brash A. L., Roberts J. L., Oates J. A.: J. Biol. Chem. 257, 12 (1988).
- Kühn H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 62, 255 (2000).
- Kühn H., Walter M., Kuban R. J.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 263 (2002).
- Dobrian A. D., Lieb D. C., Cole B. K., Taylor-Fishwick D. A., Chakrabarti S. K., Nadler J. L.: Prog. Lipid Res. 50, 115 (2011).
- Vogel R., Jansen C., Roffeis J., Reddanna P., Forsell P., Claesson H. E., Kühn H., Walter M.: J. Biol.

- Chem. 285, 5369 (2009).
49. Horn T., Adel S., Schumann R., Sur S., Kakularam K. R., Polamarasetty A., Reddanna P., Kühn H., Heydeck D.: *Prog. Lipid Res.* 57, 13 (2015).
 50. Berger M., Schwarz K., Thiele H., Reimann I., Huth A., Borngraber M., Kühn H., Thiele J.: *J. Mol. Biol.* 278, 935 (1998).
 51. Sloane D. L., Leung R., Barnett J., Craik C. S., Sigal E.: *Protein Eng.* 8, 275 (1995).
 52. Choi J., Chon J. K., Kim S., Shin W.: *Proteins* 70, 1023 (2008).

L. Bezáková^a, I. Holková^a, A. Balažová^a, M. Obložinský^a, and P. Mikuš^b (^a *Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University*, ^b *Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University*): **Animal Lipoxygenases – Structure, Positional Specificity of Lipoxygenase Isoenzymes and Their Importance**

Lipoxygenases (LOX) constitute a heterogeneous family of lipid peroxidizing enzymes which catalyze the stereospecific insertion of molecular oxygen into polyunsaturated fatty acids. The primary products of LOX reaction are hydroperoxy fatty acids, which are rapidly reduced to the corresponding hydroxy derivatives. In mammalian organisms, there are 4 main LOX isoforms, 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX, constituting hydroperoxides with positional and stereo specificity. In the subsequent metabolic processes they provide significant cell signaling molecules and secondary messengers taking part in the development of inflammatory, tumorous and other diseases.

Recent studies clarified the role of lipoxygenases in various diseases. The study of the structure and the active site of enzyme, preparation of recombinant forms with the targeted gene mutations have shown possibilities for better understanding the lipoxygenase role in various pathological processes. Searching for selective inhibitors of LOX isoenzymes is an active area of investigation. They can represent an important research tool or become a promising targeted therapy of a wide range of human diseases.

ANTINUTRIČNÉ LÁTKY V STRUKOVINÁCH

**JUDIT SÜLI, ANNA SOBEKOVÁ a ZUZANA
BUJDOŠOVÁ***Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
judit.suli@uvlf.sk*

Došlo 27.4.17, prijaté 2.6.17.

Kľúčové slová: strukoviny, technologická úprava, bezpečnosť, inaktivácia nebezpečných látok

Obsah

1. Úvod
2. Antinutričné proteíny
3. Antinutričné sacharidy
4. Glykozidy
5. Zlúčeniny viažuce minerálne látky
6. Fenolové zlúčeniny
7. Alkaloidy
8. Odstránenie antinutričných faktorov
9. Záver

1. Úvod

Strukoviny sú dôležitou súčasťou ľudskej stravy¹. Významná časť ľudskej populácie využíva strukoviny ako základnú potravinu, najmä v kombinácii s obilninami. Strukoviny sa vyznačujú vysokým množstvom proteínov, obsahujú sacharidy vo forme škrobu aj vlákniny, obsah

minerálnych látok, vitamínov a fytonutrientov je tiež vysoký^{2,3}. Pravidelný príjem strukovín prispieva k zníženiu hladiny cholesterolu⁴. Strukoviny však obsahujú aj široké spektrum antinutričných látok s negatívnym účinkom na ľudské zdravie⁵. Vysoký príjem neošetrených strukovín je nebezpečný pre ľudí aj zvieratá, dokonca môže spôsobiť aj smrť⁶. V dobe, keď sa rôzne diétne trendy⁷ tešia obrovskej popularity, je nevyhnutné poukázať na potenciálne nebezpečenstvo nesprávne upravených strukovín⁸.

2. Antinutričné proteíny

V strukovinách sa nachádzajú mnohé proteíny antinutričného charakteru. Niektoré pôsobia ako alergény, iné inhibujú činnosť tráviacich enzýmov. Ďalšiu skupinu antinutričných proteínov tvoria lektíny. Do tejto časti sú zaradené aj neproteinogénne aminokyseliny.

Alergény strukovín

Proteíny strukovín tvoria významnú skupinu rastlinných alergénov. Obzvlášť pozoruhodné sú sójové alergény (tab. I), pretože potravinársky priemysel využíva sóju na výrobu mnohých produktov. Zo sóje sa vyrába sójová múka, sójové koncentráty, izoláty sójových proteínov, sójové mlieko, sójový tvaroh (tofu), koreninové zmesi (sojová omáčka), texturované produkty zo sójových proteínov, sójový lecitín, sójový olej lisovaný za studena. Samotné sójové bôby sa využívajú ako pochúťka, alebo sa pridávajú do mnohých výrobkov. Až 90 % alergických reakcií v detskej populácii spôsobuje sója. Sójové proteíny sú často zosieťované disulfidickými väzbami, ktoré sa môžu štiepiť s využitím *N*-acetylcysteínu. Alergenicita sójových proteínov sa môže znížiť tepelnou denaturáciou alebo en-

Tabuľka I
Potravinové alergény v sóji a podzemnici olejnej¹¹

Strukovina	Alergén	Mol. hmotnosť [kDa]	Charakter	Stabilita
Sója	glycinín	350–360	glykoproteín	stredná
	β-konglycinín	156		stredná
	2S globulín	18		stredná
	trypsin KI ^a	21,5		stredná
Podzemnica olejná	Ara h1	63–66	7S globulín	vysoká
	Ara h2	17	glykoproteín	stredná

^a Trypsínový inhibítor Kunitzovho typu

zýmovou hydrolýzou proteínov⁹. Pre relatívne vysokú termostabilitu niektorých proteínov je vhodné pri výrobe hypoalergénnych hydrolyzátoz sójových proteínov kombinovať tepelný zákrok s enzýmovou hydrolýzou¹⁰. Sacharidy znižujú alergenicitu sójových proteínov pri zahrievaní. Reakčné produkty sójových proteínov s oxidovanými lipidmi alergenicitu zvyšujú, hoci samotný sójový olej alergickú reakciu nevyvoláva⁹.

Okrem sóje je významnou alergizujúcou strukovinou podzemnica olejná (tab. I), ktorá obsahuje niekoľko zatiaľ iba čiastočne identifikovaných alergénov¹¹. Tieto alergény sú veľmi odolné voči tepelnému ošetreniu, preto je podzemnica olejná pre mnohých alergikov nepožiteľná.

Inhibítory tráviacich enzýmov

Antinutričný účinok v strukovinách majú aj proteíny, ktoré pôsobia ako inhibítory proteáz a amyláz. Tieto potravinársky významné inhibítory majú zvyčajne nižšiu molekulovú hmotnosť 5–50 kDa (cit.²).

Inhibítory proteáz sa nachádzajú hlavne v semenách strukovín, ale v menšom množstve sa môžu vyskytovať aj v ostatných častiach rastliny, pričom majú rozdielnu špecifickú aktivitu, termostabilitu a rozdielnu špecifickú účinku. Inhibítory plnia v rastlinách rôzne funkcie. Slúžia zrejme ako ochrana cytosólu proti endogénnym proteázam uvoľneným pri porušení bunkových štruktúr¹¹. V období klíčenia plnia funkciu zásobných proteínov a podieľajú sa aj na ochrane rastlinných tkanív pred predátormi a mikroorganizmami³. Patria tu inhibítory trypsínu, ďalšie inhibujú trypsín aj chymotrypsín a niektoré pôsobia proti rastlinným aj mikrobiálnym proteázam (napr. subtilizínu a papainu). Obsah inhibítorov v rastlinách závisí od druhu rastliny, stupňa zrelosti a doby skladovania. Inhibítory proteáz je kvôli eliminácii ich nežiaducich účinkov (spomalenie rastu zvierat, poruchy funkcie pankreasu) nutné inaktivovať⁹. Inhibítory proteáz sú termolabilné, a preto sa tepelným pôsobením dajú viac-menej inaktivovať¹². Pri tepelnom ošetrení sú dôležité parametre technologického postupu: doba, teplota, tlak a tiež hydratácia. Napríklad inhibítory v sóji sa dajú na 87 % inaktivovať pôsobením vodnej pary pri 100 °C počas 9 min (cit.¹¹). Pri klíčení zrelých sójových bôbov dochádza k postupnému zníženiu aktivity Kunitzových inhibítorov, lebo proteolýzou a syntézou *de novo* vznikajú ich modifikované formy.

Štruktúra mnohých inhibítorov proteáz je v súčasnosti známa. Rozlišujeme inhibítory Kunitzovho typu s jedným väzbovým miestom pre trypsín a inhibítory Bowmanovho-Birkovho typu s dvoma nezávislými väzbovými miestami pre trypsín a chymotrypsín (tab. II)⁹. Aktívne centrum inhibítorov trypsínu obsahuje špecifické peptidové väzby Lys-X alebo Arg-X, kým pre inhibítory chymotrypsínu sú špecifické väzby Leu-X, Phe-X alebo Tyr-X (cit.¹¹). Sójové inhibítory Kunitzovho typu (STI – Soybean Trypsin Inhibitor) majú molekulovú hmotnosť 18–24 kDa. Hlavná zložka týchto inhibítorov obsahuje 181 aminokyselinových zvyškov a dva disulfidické mostíky. K väzbe s trypsinom dochádza na pozícií Arg 63 a Ile 64. S trypsinom reagujú v pomere 1 : 1. Inhibítory Bowmanovho-Birkovho typu majú hmotnosť okolo 6–10 kDa a viac disulfidických mostíkov. Sú to najbežnejšie inhibítory proteáz nielen v strukovinách, ale aj v iných rastlinách. Majú dvojakú väzbovú špecifickosť⁹.

Inhibítory amyláz sú relatívne termostabilné proteíny, ktoré sa v črevách odbúravajú iba čiastočne (obzvlášť u fazule, hlavne bielej). Semená strukovín v surovom stave obsahujú inhibítory hydrolázových enzýmov⁹. V procese technologickej alebo kuchynskej úpravy sú inhibítory viac-menej inaktivované, takže strácajú negatívny zdravotný účinok. Pri zavádzaní nových potravinárskych surovín alebo technologických postupov je potrebné inaktiváciu inhibítorov kontrolovať¹³.

Lektíny

Lektíny (predtým nazývané fytohemaglutiníny) sú veľkou skupinou neimunitných proteínov, ktoré dokážu s vysokou mierou špecifity rozpoznávať a viazať sacharidy voľné, aj viazané v glykoproteínoch alebo glykolipidoch. Lektíny majú okrem katalytického centra aspoň jedno ďalšie centrum, ktorým sa proteíny reverzibilne viažu na špecifické mono- a oligosacharidy. Zo všetkých rastlín sa v strukovinách nachádzajú v najväčšom množstve (tab. III)⁹. Keď sa dostanú do krvi, viažu sa k erytrocytom a spôsobujú ich aglutináciu. Lektíny sú väčšinou glykoproteíny pozostávajúce z podjednotiek, ktoré pri zmene pH alebo iónovej sily ľahko disociujú. Obsahujú vysoké množstvo kyseliny asparágovej, kyseliny glutámovej a hydroxyaminokyselín. Zároveň majú málo metionínu¹¹. Ich toxicita je podmienená hlavne čiastočnou rezistenciou na *in vivo* proteolýzu. Dlhodobá expozícia aj malým

Tabuľka II
Obsah inhibítorov proteáz v niektorých strukovinách⁹

Názov	Sója fazuľová		Hrach siaty		Cícer baraní	
Latinský názov	<i>Glycine max</i>		<i>Pisum sativum</i>		<i>Cicer arietinum</i>	
Typ inhib.	KI ^a	BBI ^b	KI	BBI	KI	BBI
Obsah, g kg ⁻¹	20	2–3	–	0,05–3	–	2,3

^a KI – inhibítory proteáz Kunitzovho typu, ^b BBI – inhibítory proteáz Bowmanovho-Birkovho typu

Tabuľka III
Obsah lektínov v niektorých strukovinách⁹

Strukovina	Latinský názov	Výskyt	Obsah [g kg ⁻¹]	Tepelná stabilita ^a	Toxicita v potravinách	
					surovej	spracov.
Podzemnica olejná	<i>Arachis hypogaea</i>	semená	0,2–2	nestála	áno	áno
Hrach siaty	<i>Pisum sativum</i>	semená	0,2–2	nestála	možná	nie
Fazuľa obyčajná	<i>Phaseolus vulgaris</i>	semená	1–10	stredná	áno	možná
Fazuľa mesiacovitá	<i>Phaseolus lunatus</i>	semená	1–10	stredná	áno	možná
Fazuľa ostrolistá	<i>Phaseolus acutifolius</i>	semená	1–10	stredná	áno	možná
Fazuľa šarlátová	<i>Phaseolus coccineus</i>	semená	1–10	stredná	áno	možná
Šošovica jedlá	<i>Lens culinaris</i>	semená	0,1–1	nestála	áno	nie
Sója fazuľová	<i>Glycine max</i>	semená	0,2–2	nízka	áno	nie
Bôb obyčajný	<i>Vicia faba</i>	semená	0,1–1	nestála	možná	nie

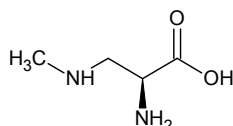
^a Tepelná stabilita lektínov: vysoká – lektín ne stráca aktivitu zahrevom pri 80 °C; stredná – pri 70 °C; nízka – pri 60 °C; nestála – lektín denaturuje pri 60 °C

množstvám lektínov môže byť škodlivá. Konzumácia surovej alebo nedostatočne uvarenej fazule spôsobuje napr. žalúdočné problémy, zvracanie a hnačky a u zvierat spomaľuje rast⁹.

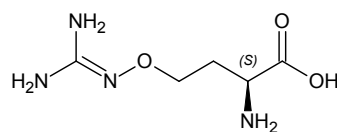
Neproteinogénne aminokyseliny

V bôbových strukovinách (podčeľaď *Fabeae*, *Phaseoleae*, *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae*) sa detegovalo viac ako 900 rôznych neproteinogénnych aminokyselín. Najznámejšie neproteinogénne aminokyseliny v strukovinách sú β -N-metylamino-L-alanín a kanavanín. Obsah neproteinogénnych aminokyselín v strukovinách môže dosiahnuť až 10 % hmotnosti sušiny. Vysokým obsahom tohto antinutričného faktora sa vyznačujú hlavne semená hrachora vonného (*Lathyrus odoratus*) a cíceru baranieho (*Cicer arietinum*)⁹.

Neproteinogénne aminokyseliny slúžia počas klíčenia ako zdroj dusíka a následne sú remobilizované¹⁰. Môžu inhibovať aminoacyl-tRNA syntetázy alebo iné stupne



beta-N-metylamino-L-alanín; BMAA



kanavanín

proteosyntézy, napr. tvorbu väzieb medzi kolagénovými vláknami¹⁴. U stavovcov môžu spôsobiť fetálne malformácie, neurotoxické poruchy, halucinácie, vypadávanie vlasov, hnačky, paralýzu, cirhózu pečene, hypoglykémiu alebo srdcovú arytmiu¹⁰.

3. Antinutričné sacharidy

Okrem hlavných oligosacharidov (sacharóza, rafinóza, stachyóza a verbaskóza) (tab. IV) sa v strukovinách nachádzajú predovšetkým α -galaktooligosacharidy (najvyšší oligosacharid je nonasacharid⁹), tiež cyklitol a galaktocyklitol (tab. V). Pankreatické sacharázy v tenkom čreve nie sú schopné tieto α -galaktooligosacharidy štiepiť, preto sa do hrubého čreva dostávajú v nezmenenej forme. V hrubom čreve sú usadené baktérie, ktoré produkujú α -galaktozidázu a metabolizujú α -galaktooligosacharidy za tvorby plynov (oxid uhličitý, metán, vodík a i.). Tento proces vedie pri konzumácii strukovín k nafukovaniu – flatulencii, preto sa α -galaktooligosacharidy považujú za antinutričný faktor^{11,15}.

Na druhej strane sú α -galaktooligosacharidy dôležitým zdrojom uhlíka pre populáciu bifidobaktérií hrubého čreva. Konzumácia strukovín teda napomáha selektívnemu rastu užitočnej črevnej mikróflóry a prispieva k zachovaniu zdravia^{3,16}.

4. Glykozidy

Saponíny

Z glykozidov sú v strukovinách zastúpené predovšetkým saponíny (tab. VI). Saponíny sú heteroglykozidy po-

Tabuľka IV

Prehľad významných vyšších oligosacharidov v strukovinách

Triviálny názov	Skrátený zápis	Charakter
Maninotrióza	α -D-Galp-(1→6)- α -D-Galp-(1→6)-D-Glcp	redukujúci
Rafinóza	α -D-Galp-(1→6)- α -D-Glcp-(1↔2)- β -D-Fruf	neredukujúci
Stachyóza	α -D-Galp-(1→6)- α -D-Galp-(1→6)-D-Glcp-(1↔2)- β -D-Fruf	neredukujúci
Verbaskóza	α -D-Galp-(1→6)-[α -D-Galp-(1→6)] ₂ - α -D-Glcp-(1↔2)- β -D-Fruf	neredukujúci
Ajugóza	α -D-Galp-(1→6)-[α -D-Galp-(1→6)] ₃ - α -D-Glcp-(1↔2)- β -D-Fruf	neredukujúci

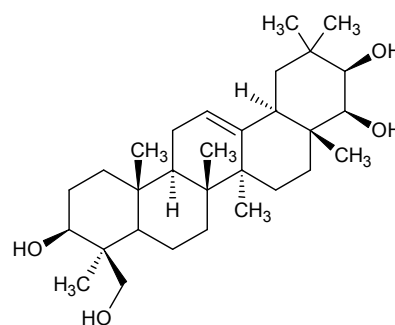
Tabuľka V

Obsah významných cyklitolov a ich galaktozidov v strukovinách [% sušiny]⁹

Strukovina	Myo-inozitol	D-pinitol	Galaktinol	Galaktopinitoly ^a	Ciceritol
Fazuľa obyčajná	0,02–0,06	0,08–0,20	0,04–0,05	0,00–0,04	stopy
Hrach siaty	0,10–0,17	0,05	0,07	0,00	0,00
Šošovica jedlá	0,07–0,11	1,11–0,40	0,10–0,12	0,36–0,39	1,60
Sója fazuľová	0,03–0,10	0,20–0,90	0,00	0,35–0,70	0,08
Cícer baraní	0,10–0,30	0,40–0,45	0,08–0,20	0,50–0,80	2,80

^a Súčet obsahu 2-*O*- α -D-Galp-1D-*chiro*-inozitolu (fagopyritolu B1) a derivátov D-pinitolu 2-*O*- α -D-Galp-4-*O*-metyl-1D-*chiro*-inozitolu a 5-*O*- α -D-Galp-4-*O*-metyl-1D-*chiro*-inozitolu

zostávajúce z aglykonu sapogenolu a z jedného alebo viacerých monosacharidových zvyškov. Sapogenoly sú zlúčeniny odvodené od C₃₀ triterpenoidov alebo od C₂₇ steroidov⁹. V strukovinách sa v porovnaní s inými rastlinami vyskytujú vo vyššom množstve. Saponíny zvyšujú hemolýzu erytrocytov, znižujú hladinu cholesterolu v krvi a pečeni, môžu inhibovať aktivitu hladkých svalov a modifikovať permeabilitu bunkovej membrány⁵. Ovpávajú aj resorpciu živín tým, že sa dokážu viazať na bunky tenkého čreva.



sójový sapogenol A

Tabuľka VI

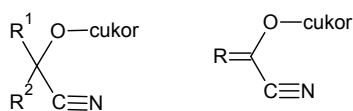
Obsah saponínov v niektorých strukovinách

Strukovina	Latinský názov	Obsah [%]
Sója fazuľová	<i>Glycine max</i>	0,22–5,6
Fazuľa obyčajná	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,35–1,6
Fazuľa zlatá	<i>Phaseolus aureus</i>	0,34
Fazuľa mesiacovitá	<i>Phaseolus lunatus</i>	0,10
Cícer baraní	<i>Cicer arietinum</i>	0,23–6,0
Hrach siaty	<i>Pisum sativum</i>	0,11–0,18
Šošovica jedlá	<i>Lens culinaris</i>	0,11–0,51
Podzemnica olejná	<i>Arachis hypogaea</i>	0,01–1,6

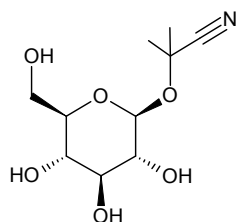
Kyanogénne glykozidy

Okrem saponínov obsahujú strukoviny aj kyanogénne glykozidy, t. j. glykozidy nitrilov 2-hydroxykarboxylových kyselín². Je známych asi 75 rôznych kyanogénnych glykozidov, najjednoduchším z nich je linamarín (predtým nazývaný fazeolunatín). Vo všeobecnosti sa určitý kyanogénny glykozid vyskytuje len v jednej alebo dvoch čeľadiach rastlín a v jednej rastline sa nachádzajú jeden alebo dva rôzne kyanogénne glykozidy. Pri hydrolýze kyanogénnych glykozidov vzniká aglykon, cukor a kyanovodík (tab. VII). Niektoré aglykony môžu byť toxické (napr. benzaldehyd vznikajúci z amygdalínu), avšak vznikajúci kyanovodík je u každej z týchto látok veľmi nebezpečnou zlúčeninou. Kvôli vznikajúcemu HCN sa odporúča strukoviny variť v otvorenej nádobe¹⁷.

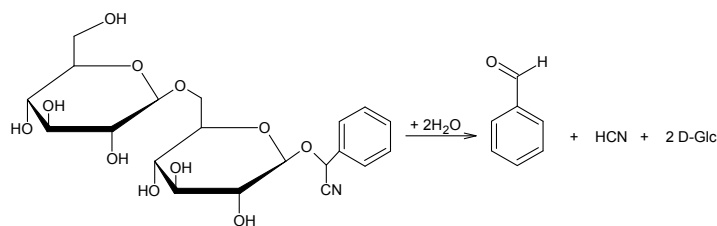
Je nepochopiteľné, že amygdalín sa v mnohých štátoch (aj na Slovensku) ešte stále predáva ako antikarcinogénny „vitamín B₁₇“ (laetrile), pričom v USA (kde táto teória vznikla) už dávno dokázali nebezpečenstvo jeho užívania a neúčinnosť v liečbe rakoviny¹⁸ a produkty boli stiahnuté z obehu.



všeobecná štruktúra
kyanogénnych glykozidov



linamarín

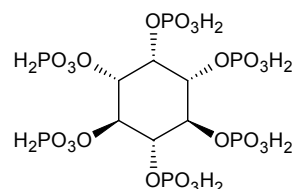


Hydrolýza amygdalínu

5. Zlúčeniny viažuce minerálne látky

Kyselina fytová, fytáty

Kyselina fytová je pre obilniny zásobárňou fosforu, 50–85 % fosforu je viazaného kyselinou fytovou. Kyselina fytová tvorí s Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} a inými kovovými iónmi stabilné zlúčeniny v pomere 1 : 1 až 1 : 6, tzv. fytáty. Vápenato-horečnatý komplex kyseliny fytovej sa nazýva fytín⁹. Pevná väzba prvkov v týchto zlúčeninách a ich malá rozpustnosť zhoršujú biologickú využiteľnosť prvkov zo stravy, ktorá obsahuje väčšie množstvo kyseliny fytovej a fytátov. Na druhej strane vďaka pevnej väzby s prechodnými kovmi má kyselina fytová istú antioxidačnú funkciu a boli preukázané aj jej antikarcinogénne účinky^{3,19}. Pre strukoviny je charakteristický vysoký obsah solí kyseliny fytovej (tab. VIII). Hoci sa fytáty považujú za hlavný zdroj fosforu v rastlinách, fytátový fosfor má nízku biologickú využiteľnosť a nižšia je aj využiteľnosť ďalších minerálnych látok viazaných kyselinou fytovou^{9,11}.



kyselina fytová

Tabuľka VII

Obsah HCN v kyanogénoch niektorých strukovín [mg kg⁻¹ čerstvého materiálu]

Strukovina	Latinský názov	Časť rastliny	Obsah HCN
Fazuľa mesiacovitá	<i>Phaseolus lunatus</i>	semená	1000–4000
Fazuľa obyčajná	<i>Phaseolus vulgaris</i>	semená	20
Hrach siaty	<i>Pisum sativum</i>	semená	23

Tabuľka VIII

Obsah kyseliny fytovej a podiel fytátového fosforu v niektorých strukovinách

Strukovina	Kyselina fytová [g kg ⁻¹]	Podiel fytátového fosforu [%]
Sójové bôby	10,0–22,2	50–70
Sójová múka odtučnená	15,2–25,2	87
Šošovica	2,7–10,5	27–87
Hrach	2,2–12,2	37
Podzemnica olejná	17,6	57

Oxaláty

Kyselina šťaveľová pôsobí podobne ako kyselina fytová. S minerálnymi látkami vytvára ťažko rozpustné soli oxaláty, čím sa zhoršuje ich využiteľnosť⁹. Oxaláty môžu prispievať k tvorbe obličkových kameňov. Kyselina šťaveľová môže byť príčinou hypokalcémie, má neurotoxické účinky a môže spôsobiť aj zástavu srdca. Počas tepelného ošetrovania sa kyselina šťaveľová rozkladá na kyselinu mravčiu a oxid uhličitý¹¹.

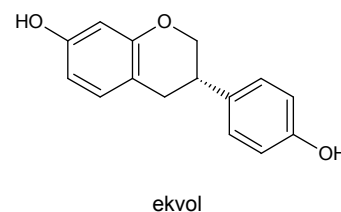
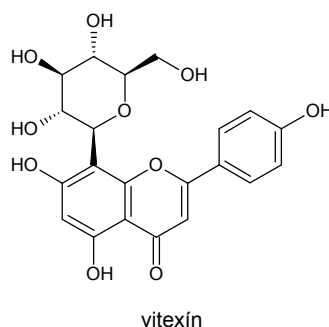
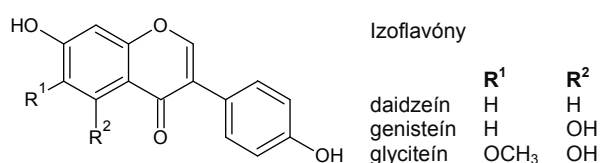
6. Fenolové zlúčeniny

Fenolové zlúčeniny z rastlín majú mnoho pozitívnych fyziologických účinkov^{19,20}, avšak významné sú aj antinutričné účinky fenolových zlúčenín prítomných v strukovinách. Triesloviny inhibujú hydrolýzu proteínov buď tým, že sa viažu k proteázam (k trypsínu alebo chymotrypsínu), alebo priamo na proteíny a tým znemožňujú ich štiepenie⁹. Ďalším dôležitým antinutričným faktorom je fytoestrogénny a antityreoidný účinok izoflavonových zlúčenín (hlavne daidzeínu, genisteínu, glyciteínu), ktoré sa nachádzajú predovšetkým v sóji^{21,22}. Tento vážny negatívny účinok izoflavonov je obzvlášť nebezpečný pre dojčatá vegetariánskych rodičov, ak sú namiesto materského mlieka kŕmené sójovým mliekom. Pri takej strave môže dosiahnuť denný príjem izoflavonov u 4-mesačných detí 5 až 8 mg kg⁻¹ hmotnosti, čo je po prepočte na telesnú hmotnosť 5 až 10-násobok dávky používanej na hormonálnu reguláciu menštruačného cyklu žien fytoestrogénmi^{20,23}. Predpokladá sa, že existuje súvislosť medzi skorým pohlavným dozrievaním a zvýšenou konzumáciou sóje²⁴. Pre minimalizáciu rizika sa konzumácia sójového mlieka v detskom veku odporúča iba pre deti trpiace neznášanlivosťou mlieka.

V Ázii, kde sója tvorí podstatne dôležitejšiu súčasť stravy ako v Európe, denný príjem fytoestrogénov dosahuje priemerne 3 mg kg⁻¹ hmotnosti²³. Organizmus ázijskej populácie je pravdepodobne geneticky viac prispôbostený odbúravať daidzeín za vzniku ekvolu (4',7-izoflavandiol), ktorý má ešte výraznejšie fytoestrogénne vlastnosti ako pôvodné izoflavóny^{25,26}.

Sójové izoflavóny môžu inhibovať aj tyreoidálne peroxidázy a zasahovať do biosyntézy hormónov štítnej žľazy, hlavne tým, že limitujú absorpciu jódu³. Peroxidá-

zovú aktivitu štítnej žľazy znižuje hlavne vitexín a genisteín zo sóje^{21,27}.



7. Alkaloidy

Rastliny syntetizujú celý rad alkaloidov a sekundárnych metabolitov ako ochranu proti bylinožravým živočíchom, hmyzu a rôznym patogénom, prípadne ako prostriedok na prežitie v nepriaznivých podmienkach pestovania³. Z alkaloidov sa v strukovinách nachádzajú hlavne komplexné zmesi chinolizidínových alkaloidov (lupinín, lupanín, sparteín a. i.), a to predovšetkým v semenách rôznych druhov rodu lupina (*Lupinus* spp.)²⁸. Je známych viac ako 100 rôznych alkaloidov v lupine (tab. IX), pričom obsah alkaloidov v rastline závisí od

Tabuľka IX

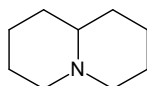
Obsah hlavných alkaloidov v semenách lupiny (rod *Lupinus*)⁹

Alkaloid	Podiel z celkového obsahu alkaloidov [%]			
	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i> ^a	<i>L. mutabilis</i>
Lupinín	–	–	60	–
Sparteín	< 1	< 1	30	16
Albín	15	–	–	–
Angustifolín	< 1	10–16	–	1
Lupanín	70	70	1	46
3-Hydroxylupanín	–	–	–	12
13-Hydroxylupanín	8	12–38	–	7
Multiflorín	3	–	–	–

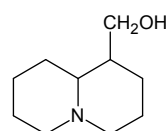
^a V semenách niektorých odrôd býva až 1,2 g kg⁻¹ protoalkaloidu gramínu

druhu rastliny a klimatických podmienok⁹. V semenách pôvodných horkých odrôd *L. angustifolius* môže obsah alkaloidov dosiahnuť až 5 %. V sladkých odrodách získaných šľachtením je hladina alkaloidov podstatne nižšia (môže klesnúť až na 0,001 %).

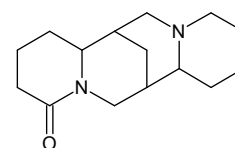
Lupina je dôležitá hospodárska rastlina. Je zložkou mnohých kŕmnych zmesí²⁸. Na Slovensku sa vyskytujú štyri druhy tohto rodu. V ostatnej dobe sa lupina začína využívať v potravinárstve aj ako aditívna látka. Múka vyrobená zo semien lupiny žltej sa pridáva do pekárenských výrobkov, cestovín, jogurtových analógov alebo do bezlaktózového mlieka. Z opražených semien sa vyrába náhrada kávy.



chinolizidín



lupinín



lupanín

8. Odstránenie antinutričných faktorov

Niektoré antinutričné látky v strukovinách ovplyvňujú stráviteľnosť potravín, iné majú toxický charakter. Postupy, ktorými sa antinutričné faktory dajú aspoň čiastočne odstrániť, sú známe (tab. X). Ide predovšetkým o tepelné ošetrenie, máčanie, fermentáciu a klíčenie^{30,31}. Mnohé antinutričné zložky strukovín sú termocitlivé. Obsah termostabilných antinutrientov sa môže znižovať máčaním³².

Tabuľka X

Najdôležitejšie antinutričné látky v semenách strukovín a možnosti zníženia ich obsahu²⁹

Strukovina	Latinský názov	Horšia stráviteľnosť ^a		Toxicita ^a	
		inhibítory trypsínu	triesloviny	lektíny	alkaloidy
Sója fazuľová	<i>Glycine max</i>	+++	–	+	–
Fazuľa obyčajná	<i>Phaseolus vulgaris</i>	–	–	+++	–
Hrach siaty	<i>Pisum sativum</i>	+	–	+	–
Hrach poľný	<i>Pisum sativum</i> var. <i>arvense</i>	+	+	+	–
Bôb obyčajný	<i>Vicia faba</i>	+	++	+	–
Vlčí bôb	<i>Lupinus</i> spp.	–	–	–	+++
Spôsob zníženia obsahu		tepelný proces, klíčenie	odstránenie osemenia	máčanie, tepelný proces	máčanie

^a + nízky obsah, ++ stredný obsah, +++ vysoký obsah, – veľmi nízky obsah alebo bez obsahu

Technologické postupy odstránenia antinutričných zložiek môžu viesť k strate minerálnych látok a vitamínov, alebo k vzniku nestráviteľných komplexov¹². Straty nutričov závisia aj od metódy tepelného zásahu (varenie, autoklavovanie, mikrovlna)³³. Pri tepelnej úprave sa pozitívne hodnotí súčasná želatinizácia škrobu, zmäkčenie textúry strukovín a tvorba aromatických zložiek³⁴. Pri tepelnej úprave sa znižuje aktivita inhibítorov proteáz, čím sa zvyšuje dostupnosť lyzínu a sírných aminokyselín^{35,36}. Lektíny sa v potravinárskych materiáloch detoxikujú kombináciou máčania a tepelnej úpravy, predovšetkým varenia^{29,30,32}. Účinnosť detoxikačných operácií závisí od doby máčania a tepelného zákroku, ako aj od teploty opracovania. Samotné máčanie k detoxikácii nestačí. Keďže sa lektíny vylúhujú do máčacej vody a vody k vareniu, tieto tekutiny sa neodporúča konzumovať⁹. Lektíny sóje sa inaktivujú pri pôsobení 100 °C počas 10 min, ale lektíny niektorých ďalších strukovín majú podstatne vyššiu termostabilitu¹¹. Nižšie teploty používané pre odstránenie antinutričných účinkov strukovín nemusia úplne eliminovať toxicitu lektínov³⁷. Prehnane vysoké teploty však zvyšujú rozsah Maillardových reakcií a vedú k zníženiu nutričnej hodnoty diétarných bielkovín alebo k racemizácii aminokyselín³⁸.

Máčanie, varenie a fermentácia strukových semien znižujú okrem obsahu inhibítorov proteáz a amyláz aj obsah kyseliny fytovej a fenolových zlúčenín³⁹. Obsah oligosacharidov sa varením 40 min dá znížiť približne o 25 %, kľčením úplne⁴⁰.

Žiadna metóda bez kombinácie s inými metódami nemôže odstrániť väčšinu antinutričných faktorov³⁰.

9. Záver

Prehľad antinutričných látok prítomných v strukovinách upozorňuje na nebezpečenstvo konzumácie strukovín bez inaktívácie týchto faktorov. Je dôležité si uvedomiť, že po odstránení antinutričných účinkov sú strukoviny na celom svete významnou súčasťou ľudskej stravy. Na odstránenie je nevyhnutné používať kombináciu viacerých metód inaktívácie, predovšetkým tepelnú úpravu, máčanie, fermentáciu a kľčenie. Celé generácie našich predkov intuitívne upravovali strukoviny takýmto spôsobom. Nové trendy stravovania v kombinácii s neinformovanosťou samozvaných odborníkov na stravovanie môže predstavovať vysoké zdravotné riziko pre bežných nadšencov „zdravého“ spôsobu stravovania.

LITERATÚRA

1. Lajolo F. M., Genovese M. I., Pryme I. F., Dale T. M., v knihe: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oil Seeds* (Muzquiz M., Hill G. D., Cuadrado C., Pedrosa M. M., Burbano C., ed.). EAAP publication No. 110, str. 123. Academic Publishers, Wageningen 2004.
2. Krupa U.: *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 48, 149 (2008).
3. Bora P.: *J. Acad. Ind. Res.* 3, 285 (2014).
4. Leterme P.: *Brit. J. Nutr.* 88, Suppl. 3, 239 (2002).
5. Gupta Y. P.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 37, 201 (1987).
6. Mikić A., Perić V., Đorđević V., Srebrić M., Mihailović V.: *Biotechnology in Animal Husbandry* 25, 1181 (2009).
7. Elmadfa I.: *Diet Diversification and Health Promotion*. Karger Medical and Scientific Publishers, Vienna 2005.
8. Bender A. E.: *Health or Hoax*. Time Warner Paperbacks, New York 1988.
9. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin 1, 2*. OSSIS, Tábor 2009.
10. Enneking D., Wink M.: *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 34, 671 (2000).
11. Hajós Gy.: *Élelmiszerkémia*. Akadémiai Kiadó, Budapest 2008.
12. Ohlsson T., v knihe: *Minimal Processing Technologies in the Food Industry* (Ohlsson T., Bengtsson N., ed.), str. 4. CRC Press, Cambridge 2002.
13. http://old.agroporadenstvo.sk/rv/strukoviny/strukoviny_uvod.htm?start, stiahnuté 28. februára 2017.
14. Bańkowski E., Sobolewski K., Jodczyk K. J.: *Zentralbl. Allg. Pathol.* 136, 247 (1990).
15. Laleg K., Cassan D., Barron C., Prabhasankar P., Micard V.: *PLoS One* 2016, 1. <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0160721&type=printable>, stiahnuté 18.3.2017.
16. Modrianský M., Valentová K., Příkrylová V., Walterová D.: *Chem. Listy* 97, 540 (2003).
17. Barrientos L., Vargas J., Navarro F., Ruiz M., López Dellamary F., Rodríguez A., Pineda J., v knihe: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oil Seeds* (Muzquiz M., Hill G. D., Cuadrado C., Pedrosa M. M., Burbano C., ed.). EAAP publication No. 110, str. 39. Academic Publishers, Wageningen 2004.
18. Kovács L., v knihe: *100 Chemical Myths* (Kovács L., Csupor D., Lente G., Gunda T. ed.), kap. 3.2. Springer, Cham 2014.
19. Usui T.: *Endocr. J.* 53, 7 (2006).
20. Moravcová J.: *Interní Med.* 11, 517 (2008).
21. Süli J., Homzová K., Sobeková A., Bujdošová Z., Hrušková T.: *DMEV* 17, 162 (2014).
22. Süli J., Homzová K., Sobeková A., Bujdošová Z., Hrušková T.: *Čsl. Fyziol.* 63, 92 (2014).
23. Manach C.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727 (2004).
24. Csupor D., v knihe: *100 Chemical Myths* (Kovács L., Csupor D., Lente G., Gunda T. ed.), kap. 3.24. Springer, Cham 2014.
25. Shutt D. A., Cox R. I.: *J. Endocrinol.* 52, 299 (1972).
26. Setchell K. D., Brown N. M., Lydeking-Olsen E.: *J. Nutr.* 132, 3577 (2002).
27. Chang H. C., Doerge D. R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 244 (2000).

28. Patočka J., Hon Z.: Prevence úrazů, otrav a násilí 2, 194 (2008).
29. http://old.agroporadenstvo.sk/rv/strukoviny/strukoviny_uvod.htm?start, stiahnuté 2. marca 2017.
30. Akande K. E., Fabiyi E. F.: Int. J. Poult. Sci. 9, 996 (2010).
31. Abu-Salem F. M., Mohamed R. K., Gibriel A. Y., Rasmy N. M. H.: International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 8, 100 (2014).
32. Shimelis E. A., Rakshit S. K.: Food Chem. 103, 161 (2007).
33. Hefnawy T. H.: Ann. Agric. Sci. 56, 57 (2001).
34. Matella N. J., Dolan K. D., Stoeckle A. W., Bennink M. R., Lee Y. S., Uebersax M. A.: J. Food Sci. 70, 203 (2005).
35. Ryan C. A.: Annu. Rev. Phytopathol. 28, 425 (1990).
36. Onder M., Kahraman A.: 1st International Symposium on Sustainable Development. Proc., str. 40. Sarajevo, 9-10 June 2009. http://eprints.ibu.edu.ba/467/1/ISSD2009-SCIENCE-3_p40-p44.pdf, stiahnuté 26. marca 2017.
37. Franz H., v knihe: *Advances in Lectin Research*. (Franz H., ed.). sv. 4, kap. 2. Springer-Verlag, Berlin 1991.
38. Garcia-Carreno F. L.: Trends Food Sci. Technol. 7, 197 (1996).
39. Abd El-Hady E. A., Habiba R. A.: Lebensm.-Wiss. Technol. 36, 285 (2003).
40. Reddy N. R., Salunke D. K.: Cereal Chem. 57, 356 (1980).

J. Süli, A. Sobeková, and Z. Bujdošová (*University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of chemistry, biochemistry and biophysics*): **Antinutritional Compounds in Legumes**

The article reports on the main antinutritional compounds in legumes which have a unique nutritive value, especially for vegetarians. Besides a high amount of proteins, saccharides, dietary fibres, minerals and vitamins, the legumes contain a wide range of negative bioactive compounds, such as allergens, protease inhibitors, lectins, non-proteinogenic amino acids, α -galactooligosaccharides, cyanogen glycosides, phytates, phenolic compounds and alkaloids. This review aims to show the adverse effect of antinutritional compounds in legumes on human health and call attention to the risk of consumption of legume seeds without an adequate inactivation of dangerous substances.

VÝZKUM FUNKČNÍCH SLOŽEK KUKUŘIČNÉHO HEDVÁBÍ

PENG LI a LUBOMÍR LAPČÍK

Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Vavrečkova 275, 760 01 Zlín
lapcik@ft.utb.cz

Došlo 13.6.17, přijato 31.7.17.

Klíčová slova: kukuřičné hedvábí, zdravotní účinky, bioaktivita, antioxidační aktivita, ionty kovů, trh, extrakce

Obsah

1. Úvod
2. Technologie extrakce bioaktivních složek kukuřičného hedvábí
 - 2.1. Extrakce polysacharidů kukuřičného hedvábí
 - 2.2. Extrakce flavonoidů kukuřičného hedvábí
 - 2.3. Extrakce fenolických látek kukuřičného hedvábí
3. Vztah mezi extrakcí bioaktivních složek a typem odrůdy a zralostí kukuřičného hedvábí
4. Antioxidační aktivita extraktů kukuřičného hedvábí
5. Extrakty kukuřičného hedvábí a jejich antidiabetický účinek
6. Protinádorové vlastnosti kukuřičného hedvábí
7. Toxicita kukuřičného hedvábí
8. Další zdraví prospěšné vlastnosti kukuřičného hedvábí
9. Účinky adsorpce iontů kovů kukuřičným hedvábím
10. Postavení kukuřičného hedvábí na trhu a budoucí vývoj

1. Úvod

Kukuřičným hedvábím (CS) jsou označována obalová pletiva rostliny *Zea mays* L. (kukuřice setá), jež jsou obvykle považována za levný a hojně dostupný vedlejší produkt, který je ponechán bez užitku, spálen nebo použit jako krmivo. Kukuřičné hedvábí však obsahuje mnoho druhů nutričních a bioaktivních látek, jako jsou polysacharidy, fenoly, flavonoidy a antokyany. Kukuřičné hedvábí má proto významný léčivý a zdravotní benefit¹. Funkce extraktů CS zahrnuje antioxidační, protinádorové, antiobezitní, antidiabetické a protizánětlivé účinky². Extrakty kukuřičného hedvábí mají též pozitivní účinky na srdeční a ledvinová onemocnění^{3,4}. Současně jsou důležitými vlastnostmi CS také netoxicity a biologická sorpce iontů

kovů^{5,6}. Aktuální studie a publikované články o kukuřičném hedvábí nejsou početné, na fytochemické a farmakologické aspekty CS se zaměřuje pouze jediná studie z r. 2012 (cit.⁷). Předkládané review představuje, spojuje, analyzuje a diskutuje nejen výše uvedené aspekty, ale také extrakci bioaktivních složek kukuřičného hedvábí, tržní status a budoucí uplatnění CS. Tato studie kromě toho uvádí dřívější i nejnovější výsledky publikované v rámci výzkumu kukuřičného hedvábí.

2. Technologie extrakce bioaktivních složek kukuřičného hedvábí

2.1. Extrakce polysacharidů kukuřičného hedvábí

Tradiční technologie extrakce polysacharidů kukuřičného hedvábí (CPS) zahrnuje extrakci horkou vodou, enzymatickou extrakci, extrakci za pomoci ultrazvuku a mikrovlnnou extrakci^{8–10}. Chen a spol.² aplikovali enzymolýzu spolu s technologií extrakce ultrazvukem, čímž dosáhli mírnějších extrakčních podmínek, nižších nákladů a menší spotřeby energie a zjednodušili samotný extrakční proces. Optimální podmínky enzymolyticko-ultrazvukové extrakce byly stanoveny jako následující: obsah celulosy 7,5 % pro 150 min extrakce při 55 °C a poměr kapalina-pevná látka 31,8 pro 34,2 min při 66,3 °C. Za těchto podmínek se výtěžek polysacharidů kukuřičného hedvábí zvýší ze 4,56 % na 7,10 % (ve srovnání s extrakcí teplou vodou) a extrahované CPS poskytují na základě své konformace lepší antioxidační a protinádorovou aktivitu. Chen a spol.² i Maran a spol.¹¹ využili Boxův-Benkenův design (BBD) metodologie povrchové odezvy pro statistickou analýzu extrakčního procesu a optimalizaci extrakčních podmínek. BBD je nezávislý, rotační kvadratický design bez vložených faktoriálních nebo zlomkových faktoriálních bodů, kde proměnné kombinace leží ve středních bodech mezi okraji variabilní řady a uprostřed této řady¹¹. BBD tak umožňuje efektivněji a jednodušeji uspořádat a interpretovat experimenty než optimalizovat extrakční podmínky¹². Kvadratická rovnice BBD je následující:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + e_i$$

kde Y je odezva; X_i a X_j jsou proměnné (i a j leží v rozmezí 1 až k); β_0 je modelový intercepční koeficient; β_j , β_{jj} a β_{ij} jsou interakční koeficienty lineárního, kvadratického a druhého řádu; k je počet nezávislých parametrů a e_i je chyba měření¹³.

2.2. Extrakce flavonoidů kukuřičného hedvábí

Celková technologie extrakce flavonoidů zahrnuje extrakci horkou vodou, alkalickou vodou nebo alkalickým zředěným alkoholem a extrakci organickými rozpouštědly. Dále je možné využít mikrovlnnou extrakci, ultrazvukovou extrakci, superkritickou kapalinovou extrakci, enzymatickou extrakci, vodnou dvoufázovou extrakci, semi-bionickou extrakci, membránovou separaci, extrakci horkou tekutinou a vysokotlakou kapalinovou extrakci^{14–21}. Peng a spol.¹ provedli extrakci 80 °C horkou vodou, výtěžek flavonoidů kukuřičného hedvábí (CSF) činil 10,45 %. Liu a spol.²² využili k extrakci flavonoidů 95% ethanol o teplotě 50 °C, nejvyšší celkový obsah CSF byl 69,4±5,1 µg RE g⁻¹ DCS (RE = ekvivalent rutinu, DCS = sušina kukuřičného hedvábí). Liu a spol.²³ aplikovali superkritickou kapalinovou extrakci flavonoidů a použili BBD metodologii povrchové odezvy pro analýzu a optimalizaci extrakčních podmínek. Maximální výtěžek CSF činil přibližně 4,24 mg g⁻¹, optimální podmínky extrakce byly 50,88 °C, 41,80 MPa, obsah vody v ethanolovém rozpouštědle 2,488 ml g⁻¹, doba trvání extrakce 120 min, velikost částic 0,4 mm a použití 20% vodného roztoku ethanolu jako rozpouštědla.

2.3. Extrakce fenolických látek kukuřičného hedvábí

Technologie extrakce rostlinných polyfenolů zahrnuje extrakci rozpouštědlem, extrakci ultrazvukem a mikrovlnnou technikou, superkritickou kapalinovou extrakci, extrakci iontovým vysrážením a separační adsorpcí^{24–27}. Liu a spol.²² extrahovali fenolické látky kukuřičného hedvábí (CSP) za pomoci 50% ethanolu; nejvyšší celkový obsah CSP činil 164,1±9,7 µg GAE g⁻¹ DCS (GAE = ekvivalent kyseliny gallové, DCS = sušina kukuřičného hedvábí).

3. Vztah mezi extrakcí bioaktivních složek a typem odrůdy a zralostí kukuřičného hedvábí

Obsah bioaktivních složek kukuřičného hedvábí závisí též na typu odrůdy a zralosti kukuřičného hedvábí. Sarepoua a spol.²⁸ zjišťovali celkový obsah fenolických látek (TPC), celkový obsah flavonoidů (TFC) a celkový obsah anthokyaninů (TAC) v 5 vzorcích purpurové voskové kukuřice, 3 vzorcích bílé voskové kukuřice a 2 vzorcích supersladké kukuřice v posklizňové fázi, ve fázi mléčné zralosti a ve fázi plné zralosti. Zkoumané vzorky vykazovaly nejvyšší obsah TAC a v případě purpurové kukuřice i TPC ve fázi mléčné zralosti, obsah flavonoidů (TFC) byl nejvyšší v posklizňové fázi; u supersladké a bílé voskové kukuřice byl nejvyšší obsah TPC stanoven v posklizňové fázi. Rahman a Wan Rosli²⁹ stanovili v nezralém kukuřičném hedvábí vyšší obsah polyfenolů a flavonoidů.

4. Antioxidační aktivita extraktů kukuřičného hedvábí

Mnohé bioaktivní složky kukuřičného hedvábí, zejména fenolické látky, polysacharidy, flavonoidy, taniny a anthokyaniny mají antioxidační vlastnosti, jsou tedy schopny zachytávat volné kyslíkové radikály a inhibovat peroxidaci³⁰. Liu a spol.²² zjistili, že uvedené vlastnosti vykazují dva druhy flavonoidních glykosidů kukuřičného hedvábí: glykosid isoorientin-2''-O-α-L-rhamnosid a 3'-methoxymayin, přičemž zvláště isoorientin-2''-O-α-L-rhamnosid vykazoval ve srovnání s dalšími flavonoidními glykosidy kukuřičného hedvábí významnou antioxidační aktivitu, schopnost zachytávat volné radikály prokázanou pomocí 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazinu (DPPH), redukční schopnost a schopnost chelatace kovů.

Žilić a spol.³¹ porovnávali antioxidační aktivitu extraktů ze 4 vzorků kukuřičného hedvábí (žlutě, zeleně, růžově a fialově zbarvených) a extraktů z listů 6 různých léčivých bylin: máty peprné (*Mentha piperita*), meduňky lékařské (*Melissa officinalis*), jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*), mateřídoušky úzkolisté (*Thymus serpyllum*), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a zeleného čaje (čajovníku čínského, *Camellia sinensis*). Výsledky prokázaly vyšší obsah fenolických a flavonoidních látek a větší antioxidační aktivitu u kukuřičného hedvábí.

Maksimović a spol.³² hodnotili 15 vzorků kukuřičného hedvábí extrahovaného ve vodném roztoku acetonu; výsledky prokázaly, že obsah polyfenolů je hlavním standardem pro určení antioxidační kapacity. Rahman a Wan Rosli²⁹ zjistili, že vodné, ethanolové a ethylacetátové extrakty z nezralého kukuřičného hedvábí mají větší antioxidační kapacitu než zralé CS. V rámci studie provedené Chen a spol.² bylo stanoveno, že extrakty polysacharidů kukuřičného hedvábí získané enzymolyticko-ultrazvukovou extrakcí vykazovaly vyšší antioxidační a protinádorovou aktivitu než polysacharidy extrahované horkou vodou. Vranješ a spol.³ studovali účinky extraktů medvědice, petržele a kukuřičného hedvábí na antioxidační kapacitu v ledvinách myši; obdržené výsledky prokázaly, že extrakty z petržele a kukuřičného hedvábí by mohly najít využití při léčbě onemocnění ledvin vyvolaných oxidanty.

Chen a spol.³³ zkoumali 3 různé chemicky modifikované polysacharidy kukuřičného hedvábí (sulfátované, acetylované a karboxymethylované deriváty) a zjistili, že karboxymethylované polysacharidy měly lepší rozpustnost, užší distribuci molekulové hmotnosti, nižší vnitřní viskozitu, velmi rozvětvenou konformaci a značně vyšší antioxidační schopnosti než přírodní polysacharidy a ostatní deriváty. Karboxymethylované deriváty kukuřičného hedvábí tak mohou představovat nový nutriční doplněk pro lidskou výživu.

5. Extrakty kukuřičného hedvábí a jejich antidiabetický účinek

Kukuřičné hedvábí bylo po dlouhou dobu používáno jako tradiční antidiabetikum v Číně a Americe⁷. Vodné extrakty CS zahrnují polysacharidy, flavonoidy a fenolické látky, které dokáží snížit hladinu glukosy v krvi³⁴. Chen a spol.³³ navíc zjistili, že některé chemicky modifikované CSP (karboxymethylované polysacharidy) vykazují lepší inhibici α -amylasy. Zhao a spol.³⁵ srovnávali antidiabetické účinky kukuřičných polysacharidů u zdravých kryš a kryš trpících hyperglykemií; jejich výsledky prokázaly, že CSP nevyvolaly žádnou nežádoucí hypoglykémii u zdravých kryš, měly však pozoruhodný hypoglykemický účinek u kryš s hyperglykemií.

6. Protinádorové vlastnosti kukuřičného hedvábí

Kukuřičné hedvábí je velmi vhodné k léčbě a prevenci nádorových onemocnění vyvolaných oxidanty a záněty, neboť extrakty CS mají mimořádnou antioxidační, antiradikálovou a protizánětlivou schopnost^{7,36}. Yang a spol.³⁷ zkoumali hepatoprotektivní aktivitu kukuřičných polysacharidů u myši majících nádor jater H22. Autoři studie prokázali, že CPS mohou inhibovat růst karcinomu jater, prodloužit délku života myši s nádorem H22, zvýšit tělesnou hmotnost a počet periferních bílých krvinek (WBC), a také bez toxikologických účinků zvýšit produkci cytokinů v krevním séru, jako jsou IL-2, IL-6 a TNF- α . Kukuřičné hedvábí by tak mohlo být využito jako podpůrné protinádorové léčivo omezující bolestivé účinky chemoterapie.

Choi a spol.³⁸ se zabývali výzkumem neuroprotektivních účinků flavonoidních glykosidů CS na apoptózu buněk SK-N-MC lidského neuroblastomu, jež byla vyvolána oxidačním stresem (působením H_2O_2). Výsledky ukázaly, že předběžná léčba nádoru extrakty CS redukovala cytotoxický účinek H_2O_2 na buňky SK-N-MC, snížila uvolňování laktátdehydrogenasy i hladinu vnitrobuněčných kyslíkových radikálů a inhibovala štěpení poly-ADP-ribosopolymerasy. Jinými slovy, poškození DNA a apoptóza buněk vyvolaná působením H_2O_2 byly významně redukovány. Kromě toho, předběžná léčba extrakty CS 5 až 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ po dobu 2 hodin význačně a v závislosti na dávce zvýšila hladinu mRNA antioxidačních enzymů (CAT, GPx-1, SOD-1, SOD-2 a HO-1) v buňkách vystavených působení 200 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$.

Lee a spol.³⁹ zkoumali protinádorové vlastnosti flavonoidů kukuřičného hedvábí na androgen-nezávislý karcinom prostaty (PC-3). Výsledky prokázaly, že extrakty CS v závislosti na dávce redukovaly životnost buněk PC-3, které při koncentraci dávky 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ byly redukovány o 87 %. Léčba kukuřičným hedvábím tedy významně indukovala apoptózu nádorových buněk, fragmentaci DNA, depolarizaci elektrického potenciálu mitochondriální membrány a snížení úrovně exprese genů *Bcl-2* a hladiny enzymu pro-kaspasy-3. Mimoto tato léčba rovněž výrazně

redukovala fosforylaci fluoroproteinů ART (proteinů vázajících se na arrestin) a estrogen-příbuzných receptorů (ERR). Účinek extraktů CS vedoucí ke smrti nádorových buněk PC-3 by také mohl být synergizován společnou aplikací těchto extraktů s 5-fluorouracil etoposidem, cisplatinou nebo kamptothecinem. Liu a spol.²³ popsali schopnost flavonoidů kukuřičného hedvábí zachytávat dusitany, čehož by mohlo být využito k prevenci nádorových a chronických onemocnění vyvolaných působením dusitanů.

7. Toxicita kukuřičného hedvábí

Saheed a spol.⁴ se zabývali toxickým účinkem vodných extraktů kukuřičného hedvábí v dávce 100, 200 a 400 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti laboratorní wistarské krysy; hematologické ukazatele byly průběžně hodnoceny po 24 hodinách a výsledky za 1, 7, 14, 21 a 28 dní prokázaly, že vodný extrakt CS není hematotoxický. Výzkum Yanga a spol.³⁷ dokázal, že polysacharidy kukuřičného hedvábí nemají žádné toxické účinky při léčbě myši s nádorem H22. Peng a spol.¹ ve své studii prokázali, že flavonoidový extrakt kukuřičného hedvábí nevykazoval u myši žádnou subchronickou toxicitu ani genotoxicitu při aplikaci maximální experimentální dávky 10 $\text{g kg}^{-1} \text{den}^{-1}$. Také ve studii Wanga a spol.⁶ nebyla zjištěna žádná subchronická toxicita nebo nepříznivé účinky u samečů a samic wistarské krysy při příjmu extraktů CS o dávce cca 10 $\text{g kg}^{-1} \text{den}^{-1}$ po dobu 90 dnů. Netoxicitu kukuřičného hedvábí a jeho výtažků rovněž potvrzují další studie⁷.

8. Další zdraví prospěšné vlastnosti kukuřičného hedvábí

Chaittitanan a spol.⁴⁰ zjistili, že flavonoidy a fenolické látky extrahované 50% ethanolem z hedvábí sladké a voskové kukuřice mají antiobezitní potenciál působící proti tvorbě tukových buněk (adipogenezi) a spouštějící lipolýzu. Rafsanjany a spol.³⁶ prokázali, že deriváty flavan-4-olu a derhamnosylamaysinu získané z kukuřičného hedvábí by mohly léčit nekomplikovanou infekci močových cest vzhledem ke své antiadhezivní aktivitě proti uropatogenní *E. coli*, namísto použití benzethoniumchloridu. Saheed a spol.⁴ při svém výzkumu zjistili, že vodné extrakty CS by mohly léčit koronární choroby srdce. Vranješ a spol.³ konstatovali, že 96% ethanolové extrakty z CS by mohly zmírňovat onemocnění ledvin a být využity k prevenci různých poruch ledvin.

9. Účinky adsorpce iontů kovů kukuřičným hedvábím

Vzhledem k rostoucímu znečištění vodních zdrojů získává kukuřičné hedvábí význam jako nový adsorbent iontů těžkých kovů. Yu a spol.⁵ zkoumali u kukuřičného hedvábí modifikovaného kyselinou dusičnou (HNO_3 -

MCS) biosorpci iontů Cu^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+} s ohledem na iontovou rovnováhu, kinetická a termodynamická hlediska. Výsledky potvrdily maximální adsorpci iontů Cu^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+} při pH 6,0 a teplotě 25 °C, přičemž maximální adsorpční kapacita iontů modifikovaným hedvábím činila 96,15 mg g⁻¹ (Cu^{2+}), 90,09 mg g⁻¹ (Co^{2+}) a 76,92 mg g⁻¹ (Ni^{2+}). HNO_3 -MCS by mohlo efektivně odstraňovat dané ionty z vodného roztoku a být znovu použito po více než 11 cyklů.

Petrović a spol.⁴¹ studovali na HNO_3 -MCS mechanismus adsorpce iontů kovů Cu^{2+} a Zn^{2+} , kdy maximální sorpční kapacita pro tyto ionty byla při teplotě cca 40 °C a pH 5,0 15,35 mg g⁻¹ (Cu^{2+}) a 13,98 mg g⁻¹ (Zn^{2+}). Mechanismus adsorpce iontů probíhal na základě povrchové morfologie modifikovaného hedvábí vhodné pro adsorpci kovů, přičemž toto hedvábí obsahovalo různé aktivní skupiny (–OH, C=O, C–O–C, C=C a tzv. amid II), které mohly reagovat s kovovými ionty. Petrović a spol.⁴² také zkoumali adsorpční účinek syrového (nemodifikovaného) kukuřičného hedvábí na ionty Pb^{2+} . Adsorpční kapacita hedvábí se pohybovala v rozmezí 82,5 do 90 mg g⁻¹ při teplotě od 20 do 40 °C, přičemž toto syrové hedvábí mohlo být opakovaně použito v pěti cyklech adsorpce a desorpce. Ukázalo se, že syrové CS je též ideálním adsorbentem iontů Pb^{2+} v podmínkách normálního vodného prostředí o pH 7,0.

10. Postavení kukuřičného hedvábí na trhu a budoucí vývoj

Kukuřičné hedvábí se dlouhodobě používá v Číně a Americe jako tradiční léčivý přípravek díky svým významným diuretickým, antioxidačním a protinádorovým vlastnostem, díky schopnosti zachytávat volné radikály i pro své protizánětlivé, hypoglykemické a antiobezitní účinky, jelikož je současně netoxické a bez nepříjemného zápachu⁷. Přesto je použití CS v jiných zemích jako léku či potravinářského aditiva omezené. Využití kukuřičného hedvábí ve farmacii a na trhu aditivních látek potravin má tedy značný potenciál a je velmi perspektivní. Navíc může toto hedvábí přispět ke zlepšení barvy a textury potravin. Aukkanit a spol.⁴³ zkoumali využití CS v nízkotučných masových kuličkách (karbanátech) a prokázali, že jejich barva i textura se po přidání CS zlepšily. Kukuřičné hedvábí tak může být prodáváno na trzích i jako koření.

Kromě toho mohou být extrakty CS dále využity jako přísada do pleťových krémů a kosmetiky. Mohsin a spol.⁴⁴ prováděli výzkum ethanolového extraktu kukuřičného hedvábí. Emulze voda v oleji, kterou připravili, byla stabilní a vhodná k nanesení na pokožku jako pleťový krém proti stárnutí s antioxidační funkcí.

Kukuřičné hedvábí a jeho extrakty mají díky svým jedinečným vlastnostem značný potenciál též v oblasti tabákového průmyslu, pivovarnictví, průmyslu nápojů i ochrany životního prostředí. Další výzkum této komodity je z uvedených důvodů žádoucí.

LITERATURA

- Peng K., Zhang S., Zhou H.: *J. Ethnopharmacol.* 192, 161 (2016).
- Chen S., Chen H., Tian J., Wang J., Wang Y., Xing L.: *Carbohydr. Polym.* 101, 332 (2014).
- Vranješ M., Popović B. M., Štajner D., Ivetić V., Mandić A., Vranješ D.: *J. Funct. Foods* 21, 272 (2016).
- Saheed S., Oladipipo A. E., Abdulazeez A. A., Olarewaju S. A., Ismaila N. O., Emmanuel I. A., Fatimah Q. D., Aisha A. Y.: *Toxicol. Rep.* 2, 638 (2015).
- Yu H., Pang J., Ai T., Liu L.: *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 62, 21 (2016).
- Wang C., Zhang T., Liu J., Lu S., Zhang C., Wang E., Wang Z., Zhang, Y., Liu J.: *J. Ethnopharmacol.* 137, 36 (2011).
- Hasanudin K., Hashim P., Mustafa S.: *Molecules* 17, 9697 (2012).
- Yin X., You Q., Jiang Z.: *Carbohydr. Polym.* 86, 1358 (2011).
- Zhang L., Wang M.: *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 675 (2017).
- Senthil Kumar C., Sivakumar M., Ruckmani K.: *Int. J. Biol. Macromol.* 92, 682 (2016).
- Prakash Maran J., Sivakumar V., Sridhar R., Prince Immanuel V.: *Ind. Crops Prod.* 42, 159 (2013).
- Zhao W., Yu Z., Liu J., Yu Y., Yin Y., Lin S., Chen F.: *J. Sci. Food Agric.* 91, 2201 (2011).
- Prakash Maran J., Manikandan S., Thirugnanasambandham K., Vigna Nivetha C., Dinesh R.: *Carbohydr. Polym.* 92, 604 (2013).
- Ko M., Kwon H., Chung M.: *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 38, 175 (2016).
- Yang R., Geng L., Lu H., Fan X.: *Ultrason. Sonochem.* 34, 571 (2017).
- Shan B., Xie J., Zhu J., Peng Y.: *Food Bioprod. Process.* 90, 579 (2012).
- Weiz G., Braun L., Lopez R., de María P. D., Breccia J. D.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 130, 70 (2016).
- Xie X., Zhu D., Zhang W., Huai W., Wang, K., Huang X., Zhou L., Fan H.: *Ind. Crops Prod.* 95, 632 (2017).
- Wang R., Wu G., Du L., Shao J., Liu F., Yang Z., Liu D., Wei Y.: *J. Ethnopharmacol.* 190, 288 (2016).
- Zhang Y., Shan X., Gao X.: *Sep. Purif. Technol.* 76, 337 (2011).
- Jing S., Wang S., Li Q., Zheng L., Yue L., Fan S., Tao G.: *Food Chem.* 192, 319 (2016).
- Liu J., Wang C., Wang Z., Zhang C., Lu S., Liu J.: *Food Chem.* 126, 261 (2011).
- Liu J., Lin S., Wang Z., Wang C., Wang E., Zhang Y., Liu J.: *Food Bioprod. Process.* 89, 333 (2011).
- Bakirtzi C., Triantafyllidou K., Makris D. P.: *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 3, 120 (2016).
- Périno S., Pierson J. T., Ruiz K., Cravotto G., Chemat F.: *Food Chem.* 204, 108 (2016).
- Bhattacharya M., Srivastav P. P., Mishra H. N.: *J. Supercrit. Fluids* 95, 51 (2014).

27. Firdaous L., Fertin B., Khelissa O., Dhainaut, M., Nedjar N., Chataigné G., Ouhoud L., Lutin F., Dhulster P.: *Sep. Purif. Technol.* **178**, 29 (2017).
28. Sarepoua E., Tangwongchai R., Suriharn B., Lertrat K.: *Food Chem.* **169**, 424 (2015).
29. Rahman N. A., Wan Rosli W. I.: *J. King Saud Univ., Sci.* **26**, 119 (2014).
30. Mohsen S. M., Ammar A. S. M.: *Food Chem.* **112**, 595 (2009).
31. Žilić S., Janković M., Basić Z., Vančetović J., Maksimović V.: *J. Cereal. Sci.* **69**, 363 (2016).
32. Maksimović Z., Malenčić Đ., Kovačević N.: *Biore-sour. Technol.* **8**, 873 (2005).
33. Chen S., Chen H., Tian J., Wang Y., Xing L., Wang J.: *Carbohydr. Polym.* **98**, 428 (2013).
34. Sabiu S., O'Neill F. H., Ashafa A. O. T.: *J. Eth-nopharmacol.* **183**, 1 (2016).
35. Zhao W., Yin Y., Yu Z., Liu J., Chen F.: *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 1133 (2012).
36. Rafsanjany N., Sendker J., Lechtenberg M., Petereit F., Scharf B., Hensel A.: *Fitoterapia* **105**, 246 (2015).
37. Yang J., Li X., Xue Y., Wang N., Liu W.: *Int. J. Biol. Macromol.* **64**, 276 (2014).
38. Choi D. J., Kim S., Choi J. W., Park Y. I.: *Life Sci.* **109**, 57 (2014).
39. Lee J., Lee S., Kim S., Choi J. W., Seo J. Y., Choi D. J., Park Y. I.: *Life Sci.* **119**, 47 (2014).
40. Chaiittianan R., Chayopas P., Rattanathongkom A., Tippayawat P., Sutthanut K.: *J. Funct. Foods* **23**, 497 (2016).
41. Petrović M., Šoštarić T., Stojanović M., Petrović J., Mihajlović M., Čosović A., Stanković S.: *Ecol. Eng.* **99**, 83 (2017).
42. Petrović M., Šoštarić T., Stojanović M., Milojković J., Mihajlović M., Stanojević M., Stanković S.: *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **58**, 407 (2016).
43. Aukkanit N., Kemngoen T., Ponharn N.: *Procedia - Soc. Behav. Sci.* **197**, 1403 (2015).
44. Mohsin S., Akhtar N., Mahmood T., Khan H., Mustafa R.: *Trop. J. Pharm. Res.* **15**, 1115 (2016).

Tato práce byla finančně podpořena národním rozpočtem České republiky v rámci výzkumného projektu Interní grantové agentury Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (číslo grantu: IGA/FT/2017/004).

P. Li and L. Lapčík (*Department of Food Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín*): **The Research of Functional Ingredients from Corn Silk**

Corn silk (*Stigma maydis*) contains many bioactive and functional ingredients and has many health benefit effects. This commodity is of a great value and has a good prospect in research and market. In addition, corn silk can also contribute to the development of environmental protection. This review deals with the research findings on the extraction technology of corn silk bioactive ingredients. It also covers anti-oxidative activity, anti-diabetic effects, antitumor capacity, and other health benefit effects of corn silk, as well as the issue of toxicity and metal ions adsorption effects. Last but not least, this review discusses market status and future prospect of corn silk.

KORTIKOTROPIN UVOLŇUJÍCÍ HORMON, OD CHEMIE K LIGANDŮM A JEJICH MOŽNÉMU TERAPEUTICKÉMU VYUŽITÍ

VĚRA KLENEROVÁ, IVANA KRAMÁRIKOVÁ,
PAVEL ŠÍDA, JANA ŠÍPKOVÁ a SIXTUS
HYNIE

Univerzita Karlova, 1. LF UK Ústav lékařské biochemie,
Albertov 4, 128 00 Praha 2
vera.klenerova@LF1.cuni.cz

Došlo 2.8.17, přijato 14.12.17.

Klíčová slova: neuropeptidy, kortikotropin uvolňující hormon, receptory, stres, agonisté, antagonisté, terapeutické využití

Obsah

1. Úvod
2. Kortikotropin uvolňující hormon (CRH)
3. CRH receptory
 - 3.1. Struktura CRH receptorů
 - 3.2. Lokalizace CRH receptorů v CNS
4. CRH vazebný protein
5. Ligandy CRH
 - 5.1. Agonisté CRH
 - 5.2. Antagonisté CRH
 - 5.2.1. Antagonisté peptidové povahy
 - 5.2.2. Antagonisté nepeptidové povahy
 - 5.3. Současný výzkum terapeutického využití CRH ligandů
6. Závěr

1. Úvod

Neuropeptidy tvoří velmi rozsáhlou skupinu biologicky aktivních látek, kterým je v současnosti věnována velká pozornost. Spolu s jejich receptory prezentují nejrozšířenější systém přenosu signálů v mozku. Jejich široká distribuce v CNS přitahuje pozornost nejen vědců, ale v poslední době také farmaceutických společností. Tyto látky působí buď jako neurotransmitery nebo jako samostatné molekuly zasahující do periferních a centrálních regulačních funkcí i odpovědi na působení vnějších podnětů včetně stresu^{1,2}. V souvislosti s účinky stresu byla popsána řada neuropeptidů, z nichž primární úlohu zastává kortikotropin uvolňující hormon (kortikoliberin, CRH)³.

Tento přehled vychází z dlouhodobého výzkumu laboratoře biochemické neurofarmakologie, který je zaměřen na studium úlohy neuropeptidů při stresu na molekulu-

ární, buněčné a behaviorální úrovni. Uvádíme nové poznatky o mechanismu působení CRH a jeho dvou receptorů⁴ s odkazy na významné přehledové články. Názvosloví CRH, jeho receptorů a ligandů odpovídá údajům mezinárodní farmakologické unie v přehledu „International Union of Pharmacology“ (cit.⁵).

Studium CRH je zaměřeno na stresovou adaptační odpověď a psychické poruchy související se stresem, s cílem možného terapeutického využití získaných poznatků³. Hlavní funkcí CRH je regulace sekrece adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a dalších hypofyzárních hormonů. Syntetizuje se v hypotalamu a i v řadě dalších oblastí mozku a zřejmě se podílí i na průběhu psychických poruch, jako jsou deprese, demence a Alzheimerova choroba^{1,6}.

Objev CRH, dvou podtypů receptorů pro CRH a nerekceptorového vazebného proteinu, znamenal pro biochemii, farmakologii a další medicínské obory převratnou událost, která umožnila objev nových agonistů a antagonistů CRH vhodných pro možné terapeutické využití.

2. Kortikotropin uvolňující hormon (CRH)

Kortikotropin uvolňující hormon (CRH), tzv. kortikoliberin, je nazývaný také faktor, neboť byl původně objeven jako hypothalamický faktor (CRF) kontrolující sekreci hypofyzárních proopiomelanokortinových peptidů. CRF byl poprvé izolován v roce 1981 Valem⁷, jako peptid tvořený 41 aminokyselinami se sekvencí H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Glu-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂. Po odhalení struktury CRF se dává přednost označení hormon stimuluji sekreci kortikotropinu. Někteří autoři doporučují používat i nadále označení faktor s tím, že lépe vystihuje funkci tohoto peptidu⁸. Následovalo intenzivní studium purifikovaných hypothalamických extraktů u různých živočišných druhů a hledání mechanismu funkce těchto peptidů.

CRH je syntetizován podle *Crh* genu se zakódovanou oblastí pro translaci prekurzoru CRH. Rozštěpením propeptidu vznikne plně funkční CRH peptid. Pre-pro-CRH peptidem nejsou kódovány další bioaktivní peptidy, na rozdíl od prekurzorů ostatních neuropeptidů. Promotor CRH obsahuje místo pro signalizační elementy odpovědi, jakými jsou glukokortikoidy a cyklický AMP. Jak již bylo uvedeno, hlavní funkcí CRH v CNS je aktivace sekrece některých mediátorů a hormonů, především glukokortikoidů kůry nadledvin s následnou produkcí stresových hormonů, hlavně kortisolu, u hlodavců kortikosteronu, na principu negativní zpětné vazby⁹ řízené aktivitou hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy (HPA osa).

Tyto regulační mechanismy jsou v organismu řízeny aktivitou hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy (HPA osa) nejen za fyziologických podmínek, ale i za působení stresu a dalších patologických stavů. Tato aktivace HPA osy má prostresové účinky. Po syntéze CRH v hypothalamu putuje tento peptid do hypofýzy, kde stimuluje CRH-R1 receptory a vyvolá rychlou akutní stresovou odpověď. Následuje uvolnění ACTH do krevního řečiště a stimulace kůry nadledvin k vyplavení glukokortikoidů, které připraví organismus na akutní stresovou reakci a inhibují tak další aktivitu HPA osy. Druhý podtyp CRH receptoru CRH-R2 má protistresovou funkci, je aktivován po skončení akutní stresové odpovědi, a vrací HPA osu do rovnováhy. CRH-R2 receptory primárně ovlivňují procesy nezbytné pro přežití, jako jsou příjem potravy, reprodukce a obranná reakce⁴.

3. CRH receptory

W. Vale se spolupracovníky ze Salk Institutu Kalifornské Univerzity v San Diegu pokračovali v intenzivním studiu CRH a dalších hormonů a do výzkumu se zapojily rovněž pracovní skupiny z NIH (National Institute of Health) v Bethesda. Následoval objev CRH receptoru a jeho identifikace v hypofýze potkanů v r. 1983, pomocí vazebných studií s radioligandy^{10,11}. Další pokrok v poznání struktury a fyziologie CRH receptoru se naskytl až po rekombinantní expresi lidského CRH receptoru¹² s následným objasněním jeho molekulární struktury. Tento výzkum vedl k identifikaci druhého typu CRH receptoru (CRH-R2). CRH receptory jsou kódovány dvěma různými geny lokalizovanými na 17. chromosomu. Bližší údaje o CRH genech jsou mimo rámec tohoto přehledu, v literatuře je však řada publikací, z nich doporučujeme přehled pracovní skupiny Z. Liu z r. 2013 (cit.¹³).

CRH receptory jsou proteiny, kde je peptidový řetězec lidského CRH-R1 tvořen 415 rezidui aminokyselin a u různých živočišných druhů je homologní z 98 %. CRH-R2 se vyskytuje u savců ve třech isoformách, a to α , β , γ (přejmenované na 2a, 2b a 2c, a také označované jako 2₁, 2₂, 2₃), které se liší lokalizací, funkcí a strukturou. α -Forma se vyskytuje centrálně v nervovém systému, β -forma v periférii a γ -forma byla charakterizována zatím jen částečně. CRH-R2 α -forma je tvořena 411 aminokyselinami a má 71% homologii s receptorem CRH-R1 (cit.¹⁴).

3.1. Struktura CRH receptorů

Struktura lidského CRH receptoru je zobrazena na obr. 1. Patří do rodiny transmembránových receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR, G-protein coupled receptor), jejichž strukturálním znakem, společným pro všechny GPCR receptory, je přítomnost sedmi transmembránových α -šroubovicových segmentů (helixů). Tyto úseky peptidového řetězce zaujímající strukturu α -helixů v plazmatické

membráně jsou označovány jako transmembránové domény (TM) a jsou číslovány TM 1–7 od N-konce. Na mimobuněčné (extracelulární) straně receptoru je N-konec peptidu spolu se třemi extracelulárními (EC) smyčkami peptidového řetězce, které slouží jako vazebná místa pro ligandy. C-konec je umístěn na vnitrobuněčné (intracelulární) straně spolu se třemi intracelulárními (IC) smyčkami, které umožňují spolu s C-koncem vazbu α -podjednotky G-proteinu¹⁴ (viz obr. 1).

Receptory spřažené s G-proteiny se vyskytují jak v mozku, tak ve střevě, tzv. „brain-gut receptors“. Při interakci CRH s receptorem dojde k aktivaci adenylátcykasy, která katalyzuje tvorbu druhého posla cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP). Aktivovaný cAMP může mít také dlouhodobé účinky přestupem z cytosolu do jádra, kde aktivuje transkripci s tvorbou transkripčního faktoru označovaného jako CREB (cAMP responsibilní element / CRE/ binding protein). Následnou translaci vznikne nový protein vedoucí k buněčné odpovědi¹⁵.

Tento typ přenosu signálu je dnes uváděn v klasických učebnicích chemie, biochemie, molekulární biologie nebo farmakologie^{16,17,18}. Současné poznatky o CRH-R signalizaci sumarizuje přehled D. K. Grammatopoulou¹⁹.

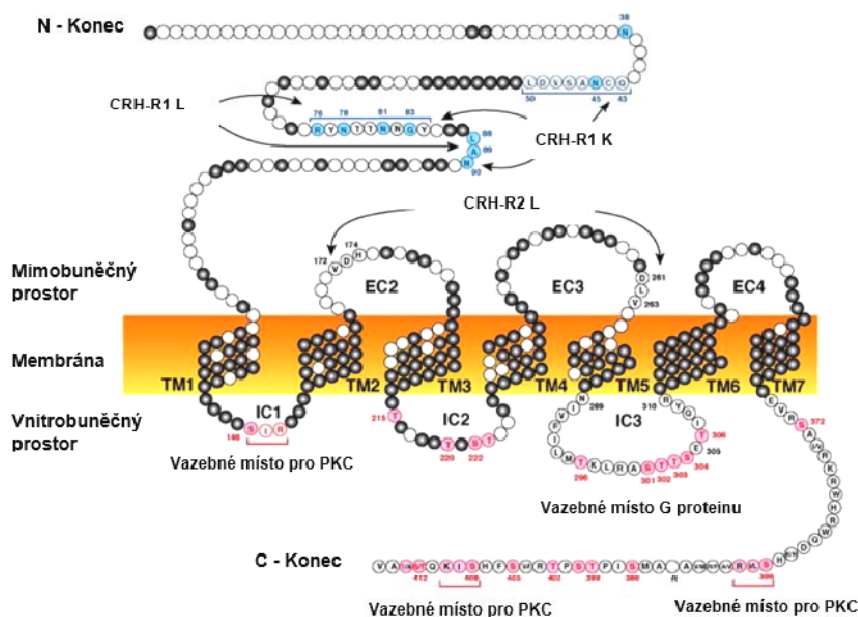
3.2. Lokalizace CRH receptorů v CNS

Řada studií ukázala odlišnou lokalizaci a odlišnou genovou expresi obou podtypů CRH receptorů²⁰. Nejvyšší denzita CRH-R1 je v hypofýze, kde tyto receptory působí uvolnění ACTH. V naší výzkumné práci jsme určili expresi mRNA obou receptorů CRH-R1 a CRH-R2 v hypofýze za fyziologických podmínek a po působení různých typů stresů²¹ a expresi obou CRH receptorů u zvířat s vyřazeným genem pro CRH u kontrol a po aplikaci stresu²². Dále jsou CRH-R1 lokalizovány v cerebrálních kortikálních oblastech, amygdale, hipokampu a také v septu a mozečku. Modulují kognitivní funkce jako pozornost, výkonnost, anxieta, učení a paměť. Receptory CRH-R2 mají v mozku odlišnou distribuci než je výše uvedená distribuce u CRH-R1 a jsou nejvíce lokalizovány v subkortikálních oblastech, včetně laterální septální oblasti. Septum hraje významnou úlohu v klasickém limbickém okruhu, který je důležitý pro emoce, strach i agresi.

Vzhledem k tomu, že se oba receptory liší i afinitou k ligandům, má tato rozdílná afinita a distribuce receptorů fyziologický význam. Znalost lokalizace CRH receptorů je především velmi důležitá pro syntézu ligandů k selektivnímu ovlivnění funkce dané oblasti CNS a tím pro terapeutické využití. Na obr. 2 je znázorněna lokalizace CRH receptorů v jednotlivých oblastech mozku primátů.

4. CRH vazebný protein

Biologická funkce CRH je také dána jeho interakcí s nerekceptorovým vazebným proteinem (CRH binding protein, CRH-BP), který je v mozku a hypofýze přítomen



Obr. 1. **Struktura CRH receptoru.** CRH receptorový peptid prochází 7krát plazmatickou membránou (žlutá barva), která peptid rozděluje na tři části. Mimobuněčná (extracelulární, EC) část je tvořena N-koncem a třemi EC smyčkami peptidu (EC2, EC3, EC4). Tyto EC smyčky jsou spojeny s C-koncem pomocí tří intracelulárních IC smyček (IC1, IC2, IC3). Barevně (modře) jsou označeny aminokyseliny, na které se můžou vázat ligandy, tzv. vazebná místa (CRH-R1 L a CRH-R2 L) a vazebná místa (CRH-R1 K) v kapsovitě prohlubni, tzv. vazebné kapse. Druhou částí peptidového řetězce jsou úseky procházející plazmatickou membránou, tzv. α -helixy (šroubovice) označené jako transmembránové TM a číslované TM1–TM7. Třetí část receptoru je ve vnitrobuněčném (intracytoplazmatickém, IC) prostoru a je tvořena C-koncem a třemi intracelulárními smyčkami peptidového řetězce (IC1, IC2 a IC3). Označené sekvence aminokyselin (červeně) zahrnují vazebná místa pro vazbu G-proteinu, pro fosforylaci proteinkinas (PKC) (upraveno podle cit.¹⁴)

ve velkém množství. CRH-BP je rozpustný protein o velikosti 37 kDa a skládá se ze 322 aminokyselin. Má odlišnou strukturu od CRH receptoru, s mnohonásobně vyšší afinitou k CRH. Vazbou na CRH ovlivňuje hladinu CRH v oběhu a působí tak jako CRH antagonist²⁴.

CRH-BP se nachází v CNS mezi oblastmi exprimujícími CRH a CRH-receptor, jako je neokortex, hipokampus, hypofýza, amygdala a mozkový kmen. Různé stresory mohou ovlivňovat různé oblasti tohoto složitěho systému a tím vyvolat rozdílnou odpověď na stres. Vazba CRH-BP na CRH blokuje jeho primární funkci sekrece ACTH z hypofýzy a působí tedy jako negativní regulátor CRH aktivity. CRH-BP také moduluje funkci CRH během těhotenství. Testování na zvířecích modelech prokázalo, že velká exprese CRH-BP nebo naopak jeho deficit vede ke změně aktivity HPA osy a energetické rovnováhy. Nodostatek CRH-BP vede ke zvýšení volného CRH a toto zvýšení způsobí změny v CNS vedoucí k aktivaci HPA osy a tím zvýšení účinku stresu (viz²⁴). Modulace funkce CRH pomocí CRH-BP nepůsobí anxiogenní efekt, který je typický pro účinky agonistů CRH receptorů. CRH-BP je tak vhodný pro léčbu kognitivních deficitů s neurodegenerativní demencí. V současném výzkumu je sledována přítomnost CRH-BP v neuronálních propojeních s dalšími neuropeptidy²⁵.

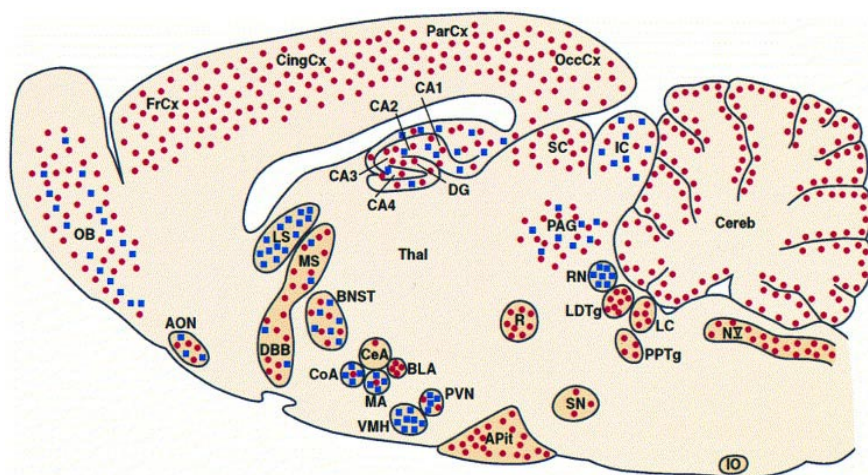
5. Ligandy CRH receptorů

Po objasnění struktury CRH receptorů a získání nových poznatků o regulaci signalizace G-proteinu a s nimi spřaženými receptory²⁶, pracoviště W. Valeho pokračovalo v syntéze nových CRH ligandů²⁷. Náš přehled z r. 2016 uvádí mechanismus vazby různých typů ligandů na GPCR receptory a přehled metod zabývajících se interakcí receptoru s ligandy, molekulárním dokováním a virtuálním screeningem¹⁵.

Agonisté i antagonisté hrají důležitou roli v řadě fyziologických funkcí a v koordinaci stresových odpovědí organismu, jak bude uvedeno dále. Syntéza nových ligandů pro CRH-R receptory je vysoce aktuální, neboť doposud existuje pouze velmi malé množství látek specifických pro terapii stresu a poruch spojených se stresem. Po této fázi výzkumu se v současnosti věnuje řada pracovišť ověřování preklinických a klinických účinků jednotlivých CRH ligandů.

5.1. Agonisté CRH

Wylie Vale se spolupracovníky popsal i další peptidy vázající se na CRH receptor. Na prvním místě je nutné jmenovat urokortin označený Valem urokortin 1 (zkratka



Obr. 2. **Lokalizace CRH-R1 a CRH-R2 receptorů v CNS.** CRH receptory se vyskytují v mozku odděleně, menší část receptorových subtypů je přítomná společně v olfaktorním bulbu (OB), hipokampu (CA1-CA4, DG) a části amygdaly (CoA). Receptory CRH-R1 (červené kroužky) se vyskytují výhradně ve frontálním kortexu (Cx), v přední hypofýze (APit), v mozečku (Cereb) a v řadě mozkových jader (R a další R viz schéma). Výskyt CRH-R2 (modré čtverečky) je nejvíce lokalizován v subkortikální oblasti a v septu (LS, MS), které hraje významnou úlohu v klasickém limbickém okruhu důležitém pro emoce, strach i agresi. U primátů jsou CRH-R2 rozmístěny disperzně a vyskytují se s větší densitou v kortikálních oblastech²⁰. Popis jednotlivých oblastí mozku (včetně vysvětlení dalších zkratk) lze nalézt v učebnici neuroanatomie CNS²³

UCN 1)²⁸. Urokortin 1 je peptid složený ze 40 aminokyselin a má 5–20krát větší afinitu k CRH receptorům ve srovnání s CRH. Kromě agonistů CRH a UCN byly popsány další dva ligandy CRH receptoru, se sekvencí obou peptidů vysoce homologní s UCN 1, a proto byly označeny jako urokortin UCN 2 (také známý jako peptid přibuzný streskopinu) a urokortin UCN 3 (označovaný jako streskopin)⁸. Urokortin 2 je tvořen 43 aminokyselinami a urokortin 3 se skládá z 38 aminokyselin. Geny pro UCN 2 a UCN 3 mají obdobnou strukturu jako gen pro UCN 1.

Agonisté CRH a UCN 1 jsou vysoce důležité peptidy u většiny druhů savců a během evoluce prokazují 45% homologii také s nesavčími neselektivními agonisty CRH receptorů, sauvaginem a urotensinem I (cit. ^{8,29}). Oba peptidy vedou in vitro i in vivo k sekreci ACTH a účinek urotensinu I je výraznější. Řada laboratoří sledovala fyziologický účinek a význam obou peptidů u patologických stavů s cílem využití těchto poznatků k syntéze selektivních antagonistů. Urotensin ovlivňuje řadu periférních funkcí, ale údaje o syntéze nového antagonisty nebyly doposud publikovány. U sauvaginu byly syntetizovány nové analogy, např. [¹²⁵I]-PD-sauvagin (PD-Svg), umožňující daleko přesnější určení exprese CRH receptorů v mozku myši, než doposud používané imunohistochemické metody³⁰. Po změně v peptidovém řetězci sauvaginu byly syntetizovány analogy s antagonistickými účinky, jak bude uvedeno dále. Řada výsledků o účinku nových ligandů čeká na zveřejnění.

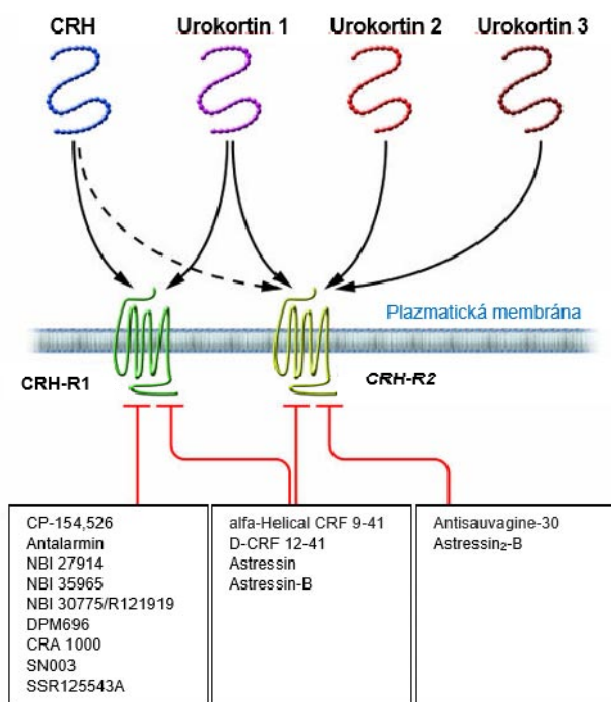
5.2. Antagonisté CRH

Antagonisté jsou látky, které po vazbě na CRH receptor blokují navázání agonistů. Tím dochází k zabránění aktivace signalizační cesty, která by vedla expresí genů ke konečné buněčné odpovědi. Při interakci antagonisty s CRH receptorem se tak neindukuje žádný vlastní účinek. Tuto inhibici lze překonat vysokými dávkami agonistů¹⁶. Kromě interakce s receptory mohou antagonisté reagovat s efektorovým systémem. Podle mechanismu účinku lze antagonisty rozdělit na látky peptidové a nepeptidové povahy.

5.2.1. Antagonisté peptidové povahy

Antagonisté peptidové povahy jsou látky odvozené od fyziologicky se vyskytujících ligandů, které hrají roli ve studiu GPCR. Toto studium přispělo především k objasnění mechanismu účinků CRH a k objasnění stresových odpovědí. Vývoj kompetitivních CRH-R antagonistů byl důležitý pro určení funkcí CRH receptorů za bazálních a stresových podmínek s předpokladem, že C-terminální oblast ligandu není zapojena do signální transdukce, ale vazbou na receptor blokuje vazbu agonisty a následnou signální transdukci.

Prvním syntetizovaným kompetitivním antagonistou byl α -helikální CRH9-41, analog CRH vzniklý po odebrání 8 aminokyselin na C-konci CRH³¹. Tento peptid byl použit k účinné inhibici CRH systému v odpovědi na různé stresové podněty. Ke zvýšení účinnosti CRH antagonistů byly syntetizovány analogy se změněnou sekundární strukturou CRH: skupina analogů odvozená od vysoce účinného D-Phe-CRH12-41 ([D-Phe¹², Nle^{21,38}, CaMe Leu³⁷



Obr. 3. Přehled CRH receptorových agonistů a antagonistů. Na schématu jsou uvedeny CRH receptory R1 a R2 lokalizované v plazmatické membráně, jejich agonisté (CRH a urokortiny) a vybraní antagonisté obou CRH receptorů. Přehled CRH-R1 selektivních nepeptidových antagonistů je uveden v levém sloupci. Neselektivní CRH-R1 antagonisté (prostřední sloupec) a CRH-R2 antagonisté (prostřední a pravý sloupec) jsou peptidy. Upraveno podle Taché⁸

CRF12-41) a skupina odvozená od astresinu (cyklo(30-33) [D-Phe12,Nle21,38,Glu30,Lys33] Ac-CRF9-41) (cit.⁸). Tito antagonisté se váží na oba CRH-R1 a CRH-R2 receptory a neposkytují údaje o účasti CRH-R2 receptorů.

Průlomem byla syntéza selektivních antagonistů CRH-R2 receptorů s malou nebo žádnou afinitou pro CRH-R1 receptory. Prvně byl syntetizován specifický peptidový CRH-R2 antagonist a antisauvagin-30 [D-Phe11,His12] sauvagin 1140, K41498 [D-Phe11, His12, Nle17] sauvagin 1140 a pro další neurochemické, funkční a radiografické studie CRH-R2 receptorů analog antisauvaginu-30 K 41498 značený radiojodem³².

Další analog je dlouhodobě působící antagonist s dalšími konformačními změnami, astressin-2-B cyklo(31-34)[D-Phe11,His12,Nle12,CaMeLeu13,39,Nle17, Glu31, Lys34] Ac-sauvagin8-40 (cit.³³). Byla syntetizována i řada dalších látek (viz přehledy níže).

5.2.2. Antagonisté nepeptidové povahy

Řada laboratoří se zaměřila na syntézu selektivních antagonistů pro receptor CRH-R1, jejichž průnik membránami je ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi,

zejména jejich lipofilním charakterem, a procházejí mozkomíšní bariérou. Tyto požadavky splňují antagonisté nepeptidové povahy o malé molekulové hmotnosti. K jejich identifikaci došlo v roce 1995 a jsou od té doby nejčastěji užívanými syntetickými látkami při studiu psychických poruch.

Mezi nejznámější a nejčastěji používané selektivní nepeptidové CRH-R1 antagonisty patří látka NBI 27914, látka CP-154,526 a antalarmin³⁴. Antalarmin inhibuje chování a emoce spojené se strachem a úzkostí, vyvolané vnějšími sociálními stresory, a může tak sloužit v léčbě úzkosti. Řada dalších syntetických antagonistů, např. DPM696, NBI30775 (známý jako R121919) a NBI35965, je charakterizována v řadě přehledů^{35–37}.

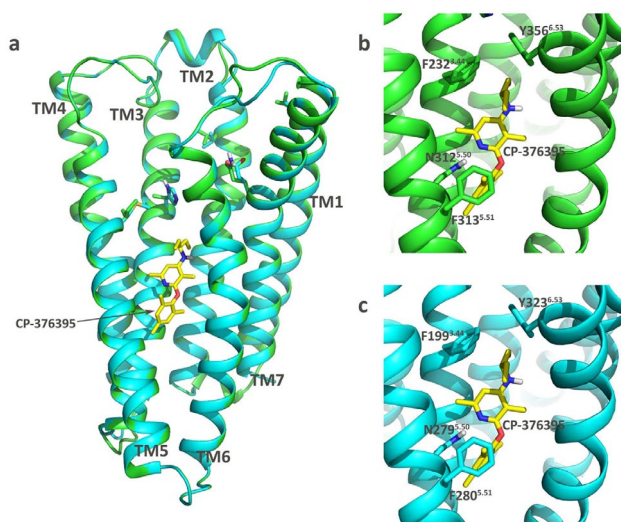
Pokrok v syntéze antagonistů nepeptidové povahy umožnilo využití nových technik pro zobrazení krystalové struktury. Na obr. 4 uvádíme příklad krystalové struktury lidského CRH-R1 receptoru v komplexu s antagonistou CP-376395, se zobrazením aminokyselinových zbytků klíčových pro vazbu resp. disociaci ligandu. To poskytuje informace o původu selektivity daného antagonisty. Tato generace antagonistů byla syntetizována především na základě analýzy struktury aminokyselin podílejících se na vazbě s ligandem, což však není postačující k objasnění účinků syntetizovaných látek³⁸. Tyto látky bylo nutné v pokusech aplikovat do mozku ve vysokých dávkách, které neměly na sekreci ACTH předpokládaný a dlouhodobý účinek, a rovněž účinek *in vitro* a *in vivo* se značně lišil, stejně tak jako výsledky z různých pracovišť.

5.3. Současný výzkum terapeutického využití CRH ligandů

Následovala další etapa vývoje antagonistů, zasahující do současnosti, sledující prostorové struktury CRH receptoru s navázaným antagonistou. Cílem bylo a je nalezení takových antagonistů, kteří mají terapeutický potenciál v léčbě psychiatrických poruch spojených se stresem.

Antagonisté nepeptidové povahy CRH-R1 receptorů mají řadu i dalších terapeutických účinků¹. Mezi indikace patří především již výše zmíněné poruchy CNS, deprese, ankxieta, migréna, cévní mozkové příhody, ale také některé projevy látkové závislosti. Je nutné zdůraznit, že ligandy CRH jsou zapojeny nejen v CNS a hypofýze, ale také na periférii, kde se váží na periferní CRH receptory. U terapie řady nemocí, např. dráždivého tračníku, zánětu, se dnes již využívají jak agonisté, tak antagonisté CRH-R, jak je podrobněji uvedeno v přehledu laboratoře G. P. Chrousos a v dalších přehledech^{44,45}.

V literatuře je velké množství preklinických a klinických studií podporujících hypotézu, že CRH byl nejenom klíčový fyziologický mediátor neuroendokrinních odpovědí, ale také behaviorálních odpovědí na psychosociální stres – etiologický faktor v depresi, anxiety a látkové závislosti^{39,40}. Bohužel tyto studie nepřinesly jednoznačné výsledky. Preklinické a klinické studie opakovaně nepotvrdily terapeutické účinky antagonistů, výsledky jsou často protichůdné nebo žádné. Průkopníci v preklinickém vý-



Obr. 4. Krystalová struktura CRH-R receptoru s navázaným antagonistou CP-376395. Na schématu (a) na levé straně je zobrazena krystalová struktura vazebné štěrbiny tvořené transmembránovými helixy (TM1–TM7) u receptoru CRH-R1 s navázaným antagonistou CP-376395. Tato vazba je detailněji znázorněna v další části schématu, v zelené barvě (b) pro receptor CRH-R1 a v azurové barvě (c) pro receptor CRH-R2 s označením polohy klíčových aminokyselin této interakce. Tento postup umožňuje určit vazbu resp. disociaci ligandu a tím i původ selektivity antagonisty³⁸

zkumu byla dr. Athina Markou (†2016), pracovnice The Scripps Research Institute a profesorka University of California, San Diego (UCSD). Je nutné uvést její Mezinárodní program spolupráce akademických a firemních laboratoří umožňující zavést vědecké výsledky do klinické praxe. Publikovala práce o účinku selektivních CRH-R1 antagonistů u emočních poruch v závislosti na jejich struktuře⁴¹. Popsala anxiolytickou aktivitu antalarminu a látek R121919, BMS-562,086 (dnes známý pod názvem Pexacerfont), GSK-561,679 (dnes známý pod názvem Verucerfont). Významné jsou i její práce o vztahu stresu a návykových látek a publikace o využití zvířecích modelů u mentálních poruch⁴².

Výzkumná práce v laboratořích „Scripps Research Institute“ a na UCSD je v současnosti pod vedením Erica Zorrilly zaměřena na studium příčin „selhání CRH-R1 antagonistů“ a na vyhodnocení nedávných zjištění týkajících se CRH a CRH-R1 systému v psychopatologii. Ve vynikající přehledové práci⁴³ „Nebojte se o CRF: posouzení selhání translace antagonistů CRF1“ Zorrilla se spolupracovníky vyhodnotili 174 publikací, kde podání CRH-R1 antagonisty nevyvolalo předpokládanou odpověď. Hodnocení výsledků studií nových ligandů v průběhu cca 15 let se zaměřilo také na přezkoumání studií (od 2014 k dnešnímu dni), které nejsou dosud dokončeny. Tyto publikace navazují na předchozí studie účinků CRH systému a analýzu nových ligandů *in vitro* a u laboratorních zvířat (viz blíže citace uvedené v publikaci⁴³). V navazující etapě byly testovány účinky CRH ligandů u zdravých osob

a u pacientů. Jedná se o klinický výzkum, tzv. „klinické hodnocení“, které probíhá ve 4 fázích. Cílem tohoto výzkumu je určit, prokázat a ověřit léčivé účinky daného ligandu, zjištění jeho nežádoucích a dalších účinků.

Zorrilla uzavírá hodnocení dosavadního výzkumu tím, že je třeba pokračovat ve studiu sdílené molekulární úlohy CRH receptorů u neurobiologie stresu, dysforie a návykového chování u lidí. S rozšířením těchto poznatků bude dostupnější najít nové ligandy se specifickou individuální úlohou s cílem terapeutického využití.

6. Závěr

Nové pokroky ve znalostech mechanismů účinků CRH a jeho receptorů a nové poznatky o účasti CRH u stresu a dalších psychických a fyzických poruch, otevírají nové možnosti klinického využití těchto poznatků. Cílem současného výzkumu je nalezení ligandů nepeptidové povahy, které pronikají mozkomíšní bariérou, a vazbou na příslušný CRH receptor budou mít cílený protistresový a antidepresivní účinek. Díky lokalizaci CRH receptorů nejen v CNS, ale i na periférii, lze očekávat použití antagonistů CRH u řady celkových onemocnění.

Práce byla realizována za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy PROGRES Q25/LF1/2 a SVV 266 377/2017.

LITERATURA

1. Klenerová V., Hynie S.: Čs. Fyziol. 56, 55 (2007).
2. Klenerová V., Hynie S.: Psychiatrie 10, 17 (2006).
3. Klenerová V., Hynie S.: Psychiatrie 6, 21 (2002).
4. Aguilera G., Nikodemova M., Wynn P. C., Catt K. J.: Peptides 25, 319 (2004).
5. Hauger R. L., Grigoriadis D. E., Dallman M. F., Plotzky P. M., Vale W. W., Dautzenberg F. M.: Pharmacol. Rev. 55, 21 (2003).
6. Inda C., Armando N. G., Dos Santos Claro P. A., Silberstein S.: Endocr. Connect. 6, R99 (2017).
7. Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J.: Science 213, 1394 (1981).
8. Taché Y., Bonaz B. J.: Clin. Invest. 117, 33 (2007).
9. Aguilera G., Rabadan-Diehl C., Nikodemova M.: Peptides 22, 769 (2001).
10. Wynn P. C., Aguilera G., Morell J., Catt K. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 602 (1983).
11. De Souza E. B., Perrin M. H., Insel T. R., Rivier J., Vale W. W., Kuhar M. J.: Nature 224, 1449 (1983).
12. Chen R., Lewis K. A., Perrin M. H., Vale W. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 8967 (1993).
13. Liu Z., Liu W., Yao L., Yang C., Xiao L., Wang Q., Gao K., Wang H., Zhu F., Wang G., Xiao Z.: Sci. Rep. 3, 1548 (2013).
14. Hauger R. L., Risbrough V., Brauns O., Dautzenberg F. M.: CNS Neurol. Disord. Drug Targets 5, 453 (2006).

15. Klenerová V., Hynie S.: Chem. Listy 110, 900 (2016).
16. Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Triton, Praha 2008.
17. Matouš a kolektiv: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha 2010.
18. Kodíček M., Valentová O., Hynek R.: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. VŠCHT, Praha 2015.
19. Grammatopoulos D. K.: Brit. J. Pharmacol. 166, 85 (2012).
20. Steckler T., Holsboer F.: Biol. Psychiatry 46, 1480 (1999).
21. Klenerová V., Sery O., Hynie S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1148, 415 (2008).
22. Klenerová V., Kvetnansky R., Hynie S.: Cell. Mol. Neurobiol. 10.1007/s10571-017-0556-3 (2017).
23. Petrovický P.: *Klinická neuroanatomie CNS*. Triton, Praha 2008.
24. Ketchesin K. D., Stinnett G. S., Seasholtz A. F.: Stress 10.1080/10253890.2017 (2017).
25. Ketchesin K. D., Huang N. S., Seasholtz A. F.: Front. Neuroanat. org/10.3389/fnana.2017.00090 (2017).
26. Zhang D., Zhao Q., Wu B.: Mol. Cells 38, 836 (2015).
27. Perrin M. H., Vale W. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 885, 312 (1999).
28. Martínez V., Wang L., Rivier J. E., Vale W., Taché Y.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 301, 611 (2002).
29. Lovejoy D. A., de Lannoy L.: J. Chem. Neuroanat. 54, 50 (2013).
30. Tan L. A., Vaughan J. M., Perrin M. H., Rivier J. E., Sawchenko P. E.: J. Comp. Neurol. 525, 3840 (2017).
31. Rivier J., Rivier C., Vale W.: Science 224, 889 (1984).
32. Lawrence A. J., Krstew E. W., Dautzenberg F. M., Ruhmann A.: Brit. J. Pharmacol. 136, 896 (2002).
33. Contoreggi C., Lee M. R., Chrousos G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1282, 107 (2013).
34. Zaretsky D. V., Zaretskaia M. V., Sarkar S., Rusyniak D. E., DiMicco J. A.: Neurosci. Lett. 653, 1 (2017).
35. Chen C., Grigoriadis D. E.: Drug Dev. Res. 65, 216 (2005).
36. Schreiber A. L., Lu Y. L., Baynes B. B., Richardson H. N., Gilpin N. W.: Neuropharmacol. 113, 323 (2017).
37. Zorrilla E. P., Koob G. F.: Drug Discov. Today 15, 371 (2010).
38. Bai Q., Shi D., Zhang Y., Liu H., Yao X.: Mol. Biosyst. 10, 1958 (2014).
39. Dedic N., Chen A., Deussing J. M.: Curr. Mol. Pharmacol. 10.2174/1874467210666170302104053 (2017).
40. Grimm S., Wirth K., Fan Y., Weigand A., Gärtner M., Feeser M., Dziobek I., Bajbouj M., Aust S.: Behav. Brain Res. 329, 180 (2017).
41. Winsky L., Brady L.: Psychopharmacol. 234, 1645 (2017).
42. Markou A., Chiamulera C., Geyer M. A., Tricklebank M., Steckler T.: Neuropsychopharmacol. 34, 74 (2009).
43. Spierling S. R., Zorrilla E. P.: Psychopharmacol. 234, 1467 (2017).
44. Zoumakis E., Rice K. C., Gold P. W., Chrousos G. P.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1083, 239 (2006).
45. Koob G. F., Zorrilla E. P.: Neuropsychopharmacol. 37, 308 (2012).

V. Klenerová, I. Kramáriková, P. Šída, J. Šípková, and S. Hynie (*Department of Medical Biochemistry, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha*): **Corticotropin-Releasing Hormone – from Chemistry to Ligands and its Possible Use in Therapy**

This review summarizes past and recent findings related to corticotropin releasing hormone (CRH, CRF) regulation and its involvement in the neuroendocrine, autonomic and behavioral stress reaction. CRH belongs to a larger family of neuropeptides that also includes urocortins with different affinity toward the two types of CRH receptors, CRH-R1 and CRH-R2. The new advances in the knowledge of mechanisms of CRH and its receptor subtypes effects show an involvement of CRH in stress and stress-related disorders, such as depression, anxiety and other psychiatric and physic diseases. This review lists some ligands and new drugs that act as agonists and antagonists on CRH receptor subtypes. Recent studies open up new possibilities for finding antidepressants that would also influence defensive stress mechanisms. Because CRH receptors are also located in the periphery, the use of CRH antagonists can have therapeutic potential in the treatment and prevention of organic diseases. Mainly non-peptide antagonists that have a potential for the therapeutic use in psychiatric, behavioral and other disorders are prospective in this respect. The aim of the current research is to find non-peptide ligands that penetrate the cerebrospinal barrier and, by binding to the respective CRH receptor, will have an anti-stress effect.

NAJVÝZNAMNEJŠIE MYKOTOXÍNY RODU *FUSARIUM*

MICHAELA HARČÁROVÁ^a, EVA ČONKOVÁ^a,
ZUZANA SIHELSKÁ^a, EMA BÖHMOVÁ^a
a KATARÍNA GOLDÍROVÁ^b

^a Katedra farmakológie a toxikológie, ^b Klinika malých zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
michaela.harcarova@student.uvlf.sk

Došlo 16.6.17, prijaté 16.8.17.

Kľúčové slová: *Fusarium*, deoxynivalenol, zearalenón, fumonizíny

Obsah

1. Úvod
2. Mykotoxíny rodu *Fusarium*
 - 2.1. Trichotecény
 - 2.2. Zearalenón
 - 2.3. Fumonizíny
3. Záver

1. Úvod

Mikroskopické vlákňité huby oddelenia *Ascomycota* sú dôležitou skupinou v ríši *Fungi*. Predstavujú potenciálne riziko najmä z hľadiska znehodnotenia poľnohospodárskych plodín, na ktorých sa môžu vyskytovať ako patogény v priebehu ich rastu, tzv. poľné huby. Mikromycéty, ktoré ako saprofyty kontaminujú neživý organický materiál počas skladovania, sa nazývajú skladové huby¹. Typickými zástupcami poľných húb sú druhy rodov *Fusarium* a *Alternaria*, medzi skladové huby patria rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Rozdelenie húb na poľné a skladové nie je striktné a poľné huby môžu byť detegované aj pri zbere či skladovaní obilnín². Mikroskopické vlákňité huby oboch typov sú schopné za vhodných environmentálnych podmienok (teplota, relatívna vlhkosť, prítomnosť kyslíka) produkovať sekundárne metabolity – mykotoxíny³. Problematika mykotoxínov je vysoko aktuálna, nakoľko sa odhaduje, že až 25 % z celosvetovej produkcie plodín je kontaminovaných⁴. Prítomnosť toxinogénnych húb v krmných obilninách, resp. v krmive predstavuje aj potenciálnu kontamináciu mykotoxínmi. Riziko ich výskytu sa môže stanoviť až po identifikácii špecifického mykotoxínu, pričom:

- prítomnosť samotnej mikroskopickej vlákňitej huby neznamená, že je producentom mykotoxínu,

- mykotoxín môže byť prítomný v substráte aj bez aktuálnej prezencie mikroskopickej vlákňitej huby,
- mikroskopické vlákňité huby môžu produkovať viac ako jeden mykotoxín,
- jeden mykotoxín môže byť produkovaný viacerými zástupcami mikroskopických vlákňitých húb⁵.

Tvorbu mykotoxínov ovplyvňujú tiež klimatické podmienky ako sucho a mráz, ale aj teplotné poškodenie, mechanické narušenie celistvosti zrna počas zberu plodín, poškodenie celistvosti zrna hmyzom, rastlinná varieta, hustota rastlinného porastu, štruktúra pôdy, kvalita hubového inokula a vegetačné štádium^{6,7}. Steyn popisuje, že existuje viac ako 300 chemicky odlišných mykotoxínov⁸. Úplná eliminácia mikroskopických vlákňitých húb a mykotoxínov nie je možná. Avšak kombinácia správnej poľnohospodárskej praxe, používanie adsorbentov (bentonit, zeolit, aktívne uhlie), antioxidantov (etoxyquín, butylhydroxytoulén, butylhydroxyanizol, propylgalát, vitamín E, vitamín C, karotenoidy, L-karnitín a melatonín) a biologicky účinných látok (baktérie, kvasinky, humínové kyseliny) predstavuje možnosti preventívnych opatrení^{9–13}.

2. Mykotoxíny rodu *Fusarium*

Mykotoxíny majú rôznu chemickú štruktúru, od ktorej závisí ich metabolizmus a stupeň toxicity v živom organizme. Rod *Fusarium* sa zaraďuje medzi toxinogénne huby s vysokou produkciou rôznych mykotoxínov (tab. I). Optimálnymi podmienkami pre rast a tvorbu mykotoxínov mikroskopickými vlákňitými hubami rodu *Fusarium* sú: teplota 15–25 °C, relatívna vlhkosť 20–25 %, vodná aktivita 0,98–0,99 a slabo kyslé pH prostredia. Tri najvýznamnejšie skupiny mykotoxínov syntetizované rodom *Fusarium* sú: trichotecény, zearalenón a fumonizíny¹⁴. Ochorenia (mykotoxikózy) spôsobené týmito mykotoxínmi sú rozmanité a zahŕňajú širokú škálu vnímavých druhov zvierat, vrátane človeka¹⁵. Mykotoxikózy sa môžu prejavovať rôznymi klinickými príznakmi, ktoré závisia od faktorov, ako sú typ a koncentrácia mykotoxínu, doba expozície, druh, rod, vek a zdravotný stav zvierat. Dlhodobá expozícia zvierat voči účinkom mykotoxínov vyúsťuje do stavu zvýšenej vnímavosti k sekundárnym ochoreniam vírusového, bakteriálneho a hubového pôvodu¹⁶.

2.1. Trichotecény

Trichotecény predstavujú početnú skupinu sekundárnych metabolitov mikroskopických vlákňitých húb rodu *Fusarium* a podľa charakteristickej funkčnej chemickej skupiny (rôzne substituenty na C – 3, 4, 7, 8 a 15) sa rozdeľujú do štyroch základných skupín (A–D)¹⁷. Základom

Tabuľka I

Najvýznamnejšie druhy rodu *Fusarium* a ich mykotoxíny³

Druh <i>Fusarium</i>	Mykotoxín
<i>F. acuminatum</i>	akuminatum, aurofuzarín, beauvericín, trichotecény, moniliformín, fuzaríny a iné
<i>F. avenaceum</i>	aurofuzarín, beauvericín, chlamydosporol, fuzaríny, moniliformín
<i>F. chlamydosporum</i>	chlamydosporol, moniliformín
<i>F. crookwellense</i>	aurofuzarín, kulmorín, fuzaríny, trichotecény, zearalenón
<i>F. culmorum</i>	aurofuzarín, chlamydosporol, kulmorín, trichotecény, zearalenón
<i>F. equiseti</i>	equisetin, moniliformín, trichotecény, zearalenón
<i>F. graminearum</i>	aurofuzarín, chlamydosporol, kulmorín, fuzaríny, trichotecény, zearalenón
<i>F. napiforme</i>	fumonizíny, moniliformín
<i>F. oxysporum</i>	fumonizíny, moniliformín
<i>F. poae</i>	aurofuzarín, kulmorín, fuzaríny, trichotecény
<i>F. proliferatum</i>	fumonizíny, moniliformín
<i>F. pseudograminearum</i>	trichotecény, zearalenón
<i>F. sambucinum</i>	aurofuzarín, beauvericín, trichotecény
<i>F. semitectum</i>	moniliformín, trichotecény, zearalenón
<i>F. solani</i>	trichotecény
<i>F. sporotrichioides</i>	aurofuzarín, kulmorín, fuzaríny, moniliformín, trichotecény

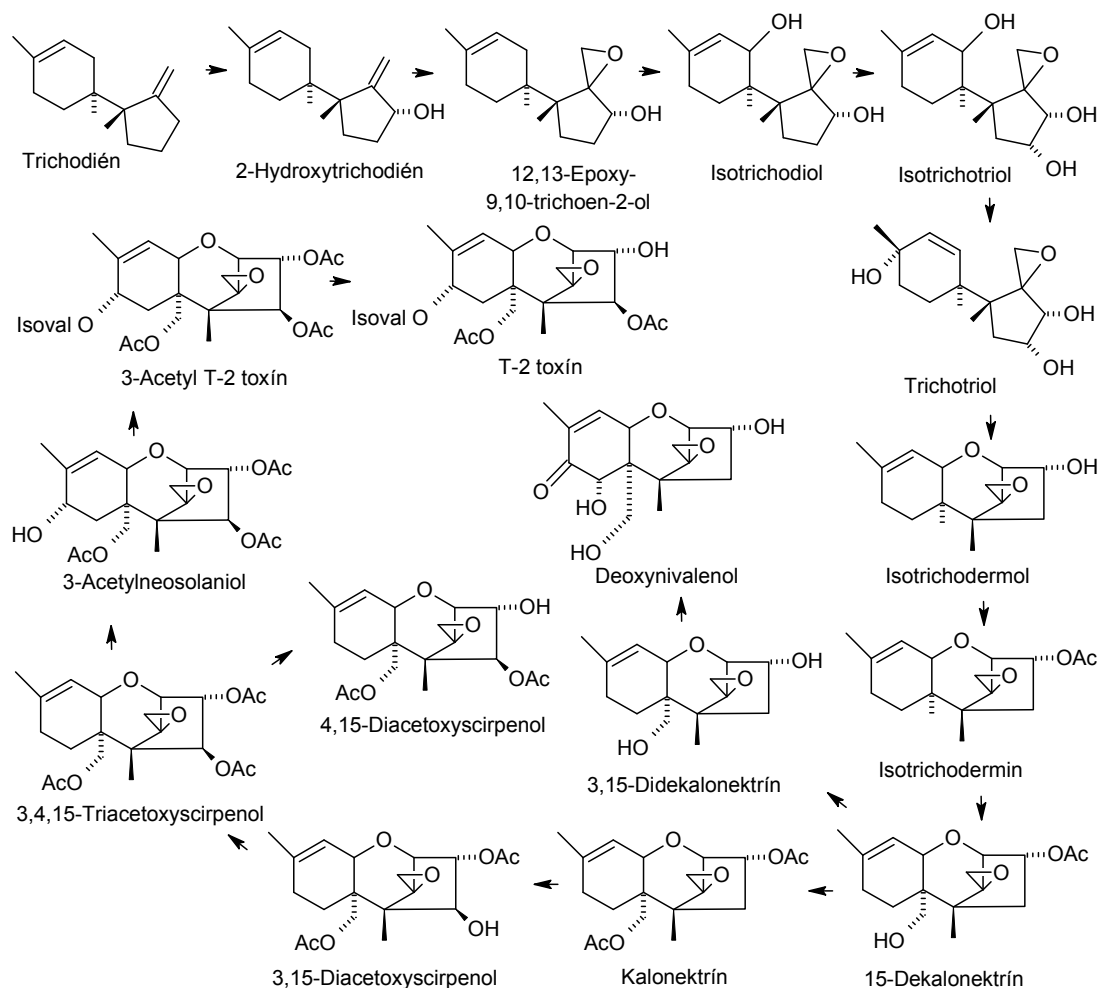
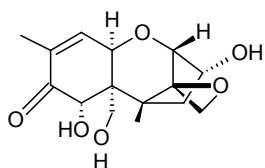
molekuly trichotecénov je tricyklický seskviterpénový kruh s dvojitou väzbou medzi uhlíkom C9, C10 a epoxidový kruh v polohe uhlíka C12, C13, ktorý je zodpovedný a nevyhnutný pre ich toxicitu. Trichotecény sú označované ako 12,13-epoxytrichotecény¹⁸. Chemická štruktúra trichotecénov je variabilná a závisí od počtu a pozície hydroxylových skupín a tiež od počtu a pozície esterifikačných skupín. Trichotecény rodu *Fusarium* sú relatívne jednoduché alkoholy s krátkymi reťazcami esterov. Biosyntéza trichotecénov prebieha z trichodiénu (obr. 1)¹⁹. V obilí sú dominantnými typmi najmä trichotecény typu A (T-2 toxín, HT-2 toxín, diacetoxyscirpenol, neosolaniol a verucol) a trichotecény typu B (deoxynivalenol, acetylované formy deoxynivalenolu 3-ADON a 15-ADON, nivalenol a fusarenon-X), ktoré sa najčastejšie vyskytujú v obilninách. Rozdelenie trichotecénov do skupiny A alebo B je na základe prítomnosti ketonickej skupiny na C8. Trichotecény typu A sú látky, ktoré nemajú na C8 ketonickú skupinu a trichotecény typu B sú látky s ketoskupinou na C8. Makrocyclické trichotecény typu C majú na C7, C8 iný epoxid a trichotecény typu D majú makrocyclický kruh spojený dvoma esterami od C4 po C15 (cit.⁸). Trichotecény typu C a D sú menej významné a najčastejšie sú izolované z potravín a krmív²⁰. Z hľadiska toxicity sú trichotecény klasifikované ako gastrointestinálne toxíny, dermatotoxíny, imunotoxíny, hematotoxíny a genotoxíny²¹.

Deoxynivalenol (DON), celosvetovo rozšírený fuzáriotoxín bol prvýkrát izolovaný v Japonsku v roku 1972 Moorokoom a spol.^{22,23}. DON (C₁₅H₂₀O₆) je produkovaný druhmi ako *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crook-*

wellense, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* a *F. acuminatum*. V Európe je často detegovaný v obilninách, ako sú pšenica, jačmeň a ovos, ale vyskytuje sa aj v kukurici²⁴. Inhibuje syntézu DNA a RNA na úrovni ribozómov. Poškodzuje expresiu cytokínov a zvyšuje hladinu intracelulárneho vápnika, čo vedie k aktivácii kaspázy, k zlomu DNA a proteínov s následnou apoptózou buniek. Makrofágy ako hlavný zdroj cytokínov sú veľmi kľúčové pri stimulácii produkcie imunoglobulínov IgA (pravdepodobne prostredníctvom cytokín-interleukínu-6)²⁵. Štruktúrne je DON polárna organická zlúčenina, ktorá patrí do skupiny B-trichotecénov a jeho chemický názov je 12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichotec-9-en-8-on (obr. 2)^{26,27}. Vo svojej molekule má 3 voľné hydroxyskupiny, ktoré sú zodpovedné za jeho toxicitu. Jeho najdôležitejšou fyzikálno-chemickou vlastnosťou je odolnosť voči vysokým teplotám, čo zvyšuje riziko jeho výskytu v potravinách²⁸. Deoxynivalenol je biela kryštalická látka, chemicky a tepelne veľmi stabilná s bodom topenia 151–153 °C. Jeho molekulová hmotnosť je 296,32 g mol⁻¹, je rozpustný vo vode a polárnych rozpúšťadlách (metanol, acetonitril, chloroform) a v zmesiach octan etylnatý : acetonitril (4 : 1) alebo chloform : metanol (9 : 1)²⁹. Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (IARC) pre nedostatočné dôkazy nezaradila deoxynivalenol medzi karcinogény³⁰.

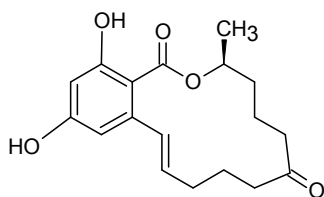
2.2. Zearalenón

Po prvýkrát bol zearalenón (ZEA) izolovaný z huby *Gibberella zeae* a je jedným z najvýznamnejších mykoto-

Obr. 1. Syntéza trichotecénov produkovaných rodem *Fusarium*¹⁹Obr. 2. Štruktúrny vzorec deoxynivalenolu²⁷

xínov. Zearalenón ($C_{18}H_{22}O_5$) je produkovaný tým istým druhom ako deoxynivalenol, a to *F. graminearum* a ďalšími druhmi ako *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. roseum*, *F. nivale*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. lateritium*, *F. sacchari*, *F. sambucinum*,

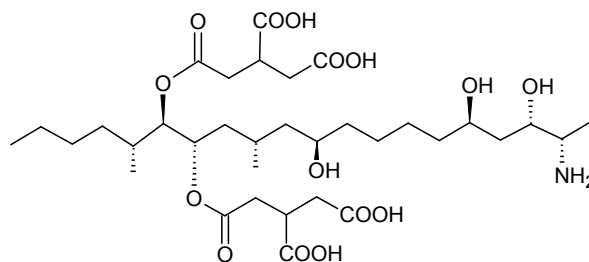
F. equiseti, *F. gibbosum*, *F. solani*^{14,31}. Zearalenón (obr. 3) je nesteroidný estrogenický mykotoxín, ktorý má štruktúru podobnú so steroidnými hormónmi, čo zvyšuje jeho schopnosť viazať sa na intracelulárne estrogenne receptory uteru, hypotalamu a hypofýzy. Pôsobí ako agonista a čiastočne ako antagonist estradiolu. Inhibuje sekréciu folikulo stimulujúceho hormónu (FSH) a potláča dozrievanie ovariálnych folikulov v preovulačnej fáze³². Z hľadiska toxicity je zearalenón zodpovedný za funkčné zmeny v reprodukčnom systéme s následným celkovým rozvratom hormonálnej regulácie. Ošipané sú v porovnaní s inými druhmi zvierat mimoriadne citlivé, pretože v ich pečeni dochádza k biotransformácii zearalenónu na α -zearalenol, ktorý je toxický ako samotný zearalenón. V porovnaní so zearalenónom a β -zearalenolom má α -zearalenol vyššiu schopnosť väzby na estrogenne receptory^{33,34}. Okrem estrogenných účinkov môže pôsobiť hepatotoxicky, hematotoxicky, imunotoxicky a genotoxicky³⁵. Po chemickej

Obr. 3. Štruktúrny vzorec zearalenónu⁴⁷

stránke je zearalenón makrocyclický laktón kyseliny β -resorcylovej a má úzky štruktúrny vzťah s inými antibiatickými metabolitmi, ktoré sú produkované množstvom mikroskopických vlákňitých húb³⁶. Zearalenón je biela kryštalická látka s bodom topenia 159–163 °C. Jeho chemický názov je 3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-metyl-1*H*-2-benzoxacyklotetradecin-1,7(8*H*)-dión. Jeho molekulová hmotnosť je 318,36 g mol⁻¹. ZEA je pomerne stabilnou látkou, ktorá nepodlieha degradácii v procese spracovania obilnín, ani pri jeho tepelnom spracovaní. Je rozpustný v benzéne, acetonitrile, metanole, etanole a acetóne³⁷. Často sa vyskytuje v skladovanom obilí, hlavne v kukurici, ovse, raži, ryži, ciroku a pšenici. Zearalenón kontaminuje približne 32 % obilnín a potravín z nich vyrobených (sušienky, raňajkové cereálie, pečivo, zákusky)^{18,24}. Podľa IARC patrí zearalenón do 3. skupiny, kde sú zaradené mykotoxíny, ktoré nie sú klasifikované ako karcinogénne pre človeka³⁰.

2.3. Fumonizíny

Fumonizíny predstavujú skupinu mykotoxínov, ktoré sú produkované hubami *F. verticillioidea*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, ale aj *Alternaria alternata*. Do tejto skupiny mykotoxínov sa zaraďujú fumonizín A₁, A₂, B₁, B₂, B₃, B₄. Po chemickej stránke sú to zložité alifatické zlúčeniny, diestery propán-1,2,3-trikarboxylovej kyseliny. Svojou štruktúrou sú podobné celulárnym sfingolipidom – sfingoidom, sfinganínu a sfingozínu, na ktoré pôsobia prostredníctvom inhibície sfingozín-acyl-transferázy³⁸. Aj napriek ich relatívne jednoduchšej chemickej štruktúre ovplyvňujú metabolizmus sfingolipidov u zvierat, čo môže spôsobiť komplexy zmien v nervovom tkanive³. Inhibujú ceramid-syntetázu (sfinganín a sfingozín *N*-acetyltransferázu) s následným hromadením sfinganínu a sfingozínu. Zvýšené koncentrácie týchto dvoch látok majú inhibičný účinok na vápnikové kanáliky (L-ty), čo vedie k akútnemu zlyhaniu ľavej časti srdca s následkom pľúcneho edému (u prasiat)³⁹. Najviac citlivými na fumonizíny sú kone a ošápané¹⁴. Podľa IARC sa fumonizíny zaraďujú do skupiny 2B – možné karcinogény človeka a sú označované ako promotory karcinogénneho procesu³⁰. Rheeder a spol. uvádzajú, že fumonizín B₁ je promotorom vzniku ezofageálneho nádoru⁴⁰. Fumonizín B₁ stimuluje proliferáciu epiteliálnych buniek pažeráka prostredníctvom zvýšenej expresie proteínu cyk-

Obr. 4. Štruktúrny vzorec fumonizínu B₁ (cit.¹⁵)

línu D₁ a znížením cyklinu E, p21 a p27 (cit.⁴¹). Fumonizín B₁ (C₃₄H₅₉NO₁₅) je dominantným toxínom (obr. 4), ktorý je produkovaný druhom *F. verticillioidea*⁴². Prvýkrát bol izolovaný až v roku 1988 v južnej Afrike z kultúry *F. moniliforme*⁴³. Fumonizín B₁ sa podieľa na ochoreniach ako leukoencefalomalácia u koní a pulmonálny edém u prasiat. Má karcinogénny účinok u myši a potkanov a u potkanov pôsobí aj hepatotoxicky⁴⁴. Chemický názov fumonizínu je 1,1'-[(12-amino-4,9,11-trihydroxy-2-metyl-tridecyl)-2-(metyl-pentyl)-1,2-etandiy]-ester s molekulovou hmotnosťou 721,84 g mol⁻¹. Fumonizín B₁ je amorfna látka s bodom topenia 103–105 °C, rozpúšťa sa vo vode a v metanole, ale nie v polárnych rozpúšťadlách. Pri technologickom spracovaní je stabilný⁴⁵.

3. Záver

Výskyt mikroskopických vlákňitých húb a následne ich sekundárnych metabolitov – mykotoxínov v potravinách a krmivách predstavuje vysoko aktuálny problém. Jednou z možností ako predchádzať výskytu mikroskopických vlákňitých húb a mykotoxínov je eliminácia pomocou adsorbentov, antioxidantov a biologicky účinných látok. Je potrebné poznamenať, že tieto látky nemajú terapeutický efekt pri mykotoxikózach s prebiehajúcimi klinickými prejavmi, ale pridávajú sa do krmív za účelom eliminácie mykotoxínov. Dekontaminačný postup má vo všeobecnosti splniť nasledujúce požiadavky:

- mykotoxín musí byť zničený, inaktívovaný alebo odstránený,
- nesmie viesť k novej tvorbe toxínov alebo produktov toxikkej degradácie,
- krmná hodnota by nemala byť ohrozená a mali by sa zachovať dôležité technologické vlastnosti,
- spóry húb by mali byť zničené, aby sa zabránilo následnej tvorbe mykotoxínov,
- dekontaminačný postup by mal byť nákladovo efektívny a šetrný k životnému prostrediu⁴⁶.

Poznatky o fyzikálno-chemických vlastnostiach jednotlivých mykotoxínov môžu byť jedným z dôležitých aspektov pri voľbe správneho dekontaminačného postupu v procese eliminácie mikroskopických vlákňitých húb.

Táto práca bola podporená Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky prostredníctvom grantu VEGA č. 1/0408/17.

Zoznam skratiek

DON	deoxynivalenol
FSH	folikulostimulačný hormón
IARC	Medzinárodná organizácia pre výskum rakoviny
ZEA	zearalenón

LITERATÚRA

- Glenn A. E.: Anim. Feed Sci. Technol. 137, 213 (2007).
- Veldman B.: *Deskstudie naar de aanwezigheid en detectie van mycotoxinen in diervoedergrondstoffen*. Rapport van De Schothorst. Stichting Instituut voor de Veevoeding, str. 95, Haag 2003.
- Desjardin A. E.: *Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology*, str. 259. APS PRESS, Minnesota (2006).
- Lawlor P. G., Lynch P. B.: Afr. Farming Food Process. 46, 12 (2005).
- Fink-Gremmels J.: Vet. Q. 21, 115 (1999).
- Magan N., Olsen M.: *Mycotoxins in food: detection and control*, str. 488. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Abington 2004.
- Opletal L., Skřivanová V., v knihe: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita, Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat*, Svazek 2, str. 479. Karolinum, Praha 2010.
- Steyn P. S.: Rev. Med. Vet. 149, 469 (1998).
- Huwing A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H.: Toxicol. Lett. 2, 179 (2001).
- Cheeke P. R., v knihe: *Applied Animal Nutrition: Feeds and Feeding*. 3. vyd., str. 238. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey 2005.
- Dvorska J. E., Pappas A. C., Karadas F., Speake B. K., Surai P. F.: Comp. Biochem. Physiol. 4, 582 (2007).
- Mézes M., Balogh K., Tóth K.: Acta Vet. Hung. 58, 1 (2010).
- Gomah N. H., Zohri A. N. A.: J. Microb. Biochem. Technol. 7, 001 (2014).
- Hocking A. D., Pitt J. I., v knihe: *Fungi and Food Spoilage*, str. 593. Springer, Berlín 2009.
- Richard J. L.: Int. J. Food Microbiol. 119, 3 (2007).
- Morgavi D. P., Riley R. T.: Anim. Feed Sci. Technol. 137, 201 (2007).
- Sabater Vilar M.: *Dissertation*. University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology 2003.
- Čonková E., v knihe: *Mikroskopické vláknité huby a mykotoxíny v potravinách a krmivách* (Laciaková A. a spol.), kap. 13.3. Viena s. r. o., Košice 2011.
- Desjardins A. E., Hohn T. M., McCormick S. P.: Microbiol. Rev. 595, 1993.
- Placinta C. M., D'Mello J. P. F., Macdonald A. M. C.: Anim. Feed Sci. Technol. 78, 21 (1999).
- Santin E., v knihe: *The Mycotoxin Blue Book* (Diaz D. E., ed.), str. 93. Nottingham University Press, Nottingham 2005.
- Breitenbach M., Cramer R., Lehrer S. B., v knihe: *Fungal Allergy and Pathogenicity*, str. 310. Karger A. G., Basel 2002.
- Riley R. T., Pestka J., v knihe: *The Mycotoxin Blue Book* (Diaz D. E., ed.), str. 283. Nottingham University Press, Nottingham 2005.
- CAST: *Mycotoxins – risks in plant, animal and human systems*, Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, 139, 191 (2003).
- Ostrý V., v knihe: *Mikroskopické vláknité huby a mykotoxíny v potravinách a krmivách* (Laciaková A. a spol.), kap. 16.7., str. 260. Viena s. r. o., Košice 2011.
- Nagy C. M., Fejer S. N., Berek L., Molnar J., Viszokolcz B.: J. Mol. Struct. 726, 55 (2005).
- Sobrova P., Adam V., Vasatkova A., Belkova M., Zeman L., Kizek R.: Interdisc. Toxicol. 3, 94 (2010).
- Hughes D. M., Gahl M. J., Graham C. H., Grieb S. L.: J. Anim. Sci. 77, 693 (1999).
- Josephs R. D., Schuhmacher R., Krska R.: Food Addit. Contam. 18, 417 (2001).
- IACR: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, IARS Press, Lyon 82, 169 (2002).
- Betina V., v knihe: *Mykotoxíny (chémia – biológia – ekológia)*, str. 284. Alfa, Bratislava 1990.
- Malekinejad H., Schoevers E. J., Daemen I. J. J. M., Zijstra C., Colenbrander B., Fink-Gremmels J., Roelen B. A.: J. Biol. Reprod. 77, 840 (2007).
- Olsen M., Pettersson H., Kiessling K. H.: Acta Pharmacol. Toxicol. 48, 157 (1981).
- Malekinejad H., Maas Bakker R., Fink-Gremmels J.: Vet. J. 172, 96 (2006).
- Zinedine A., Soriano J. M., Molto J. C., Manès J.: Food Chem. Toxicol. 45, 1 (2007).
- Desjardin A. E., Proctor R. H.: Int. J. Food Microbiol. 119, 47 (2007).
- EFSA: EFSA J. 89, 1 (2004), <http://www.efsa.eu.int/>, stiahnuté 10.6.2017.
- Wang E., Norred W. P., Bacon C. W., Riley R. T., Merrill Jr., A. H.: J. Biol. Chem. 266, 14486 (1991).
- Malíř F., v knihe: *Mikroskopické vláknité huby a mykotoxíny v potravinách a krmivách* (Laciaková A. a spol.), kap. 14. Viena s. r. o., Košice 2011.
- Rheeder J. P., Marassas S. F. O., Thiel P. G., Sydenham E. W., Spephard G. S., Vanschalkwyk D. J.: Phytopathology 82, 353 (1992).
- Wang S. K., Wang T. T., Huang G. L., Shi R. F., Yang L. G., Sun G. J.: Exp. Ther. Med. 7, 55 (2014).

42. Gilbert J., Senyuva H., v knihe: *Bioactive Compounds in Foods*, str. 432. Wiley Blackwell Publishing, Oxford 2008.
43. Leslie J. F., Bandyopadhyay R., Viskonty A., v knihe: *Mycotoxins detection Methods, Managment, Public Health and Agicultural trade*, str. 423. CAB international head office, Wallingford 2008.
44. NTP (National Toxicology Program): *Toxicology and carcinogenesis studies on fumonisin B1 in F344IN rats and B6CF1 mice* (feed studies). Technical Report Series, n 496. NIH Publication No. 99-3955. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health Research Triangle Park, NC (1999).
45. Wilkes J. G., Sutherland J. B.: *J. Chromatogr.* 717, 135 (1998).
46. Scott P. M.: *Rev. Med. Vet.* 149, 543 (1998).
47. Krska R., Welzig E., Boudra H.: *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 241 (2007).

M. Harčárová^a, E. Čonková^a, Z. Sihelská^a, E. Böhmová^a, and K. Goldírová^b (^a *Department of Pharmacology and Toxicology*, ^b *Small animals clinic, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice*): **The Most Important *Fusarium* Mycotoxins**

The incidence of microscopic filamentous fungi and consequently their secondary metabolites – mycotoxins – in foods and feeds is a highly actual problem. One way to prevent the occurrence of microscopic filamentous fungi and mycotoxins is their elimination by adsorbents, antioxidants and biologically active substances. It should be noted that these substances do not have therapeutic effects in acute mycotoxicoses with clinical manifestations but they are added to the feed to eliminate mycotoxins. Knowledge of the physicochemical properties of individual mycotoxins may be one of the important aspects in choosing the right decontamination process in the process of eliminating microscopic filamentous fungi.

POLYSACHARIDY JAKO STAVEBNÍ BLOKY HYBRIDNÍCH KOPOLYMERŮ

LENKA LOUKOTOVÁ a MARTIN HRUBÝ

*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6
mhruby@centrum.cz*

Došlo 11.4.18, přijato 21.5.18.

Klíčová slova: polysacharidy, hybridní polymery, glykokonjugáty, cílený transport léčiv

Obsah

1. Úvod
2. Příprava polymerních glykokonjugátů
 - 2.1. Zdroje polysacharidů
 - 2.2. Příprava roubovaných kopolymerů
 - 2.3. Příprava blokových kopolymerů
3. Využití polymerních glykokonjugátů v praxi
 - 3.1. Kopolymery polysacharidů vyskytujících se v rostlinách
 - 3.2. Kopolymery polysacharidů živočišného původu a vyskytujících se v houbách
4. Závěr

1. Úvod

Syntetické polymery a polymery vyskytující se v přírodě byly dříve zkoumány v poměrně oddělených oblastech výzkumu. Takové rozlišení je opodstatněné, protože obě skupiny polymerů se liší v mnoha základních aspektech. Biopolymery (proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy) mají velmi často dobře definovanou strukturu, optimalizovanou miliardami let evoluce. Jedná se především o jejich přesné chemické složení, pořadí jednotlivých sekvencí, nadmolekulární strukturu a také o přesně daný počet zabudovaných monomerních jednotek v jednom řetězci, v důsledku čehož je většina biopolymerů uniformní. Naproti tomu většina syntetických polymerů má mnohem jednodušší a náhodnější strukturu, avšak chemicky mnohem pestřejší. Před několika desetiletími se však tyto oblasti výzkumu částečně protly a vytvořily nové výzkumné odvětví hybridních makromolekul složených jak z přírodních, tak ze syntetických polymerů. Tyto kopolymery, označované v literatuře nejčastěji jako polymerní biokonjugáty, byly nejprve hojně studovány a posléze využívány ve farmacii^{1,2}. Nicméně rychlý rozvoj v oblasti

nanotechnologií a biotechnologií v nedávné době přispěl k tomu, že využití polymerních biokonjugátů výrazně překračuje farmaceutické pole a zahrnuje různorodá odvětví jako např. biosenzory, umělé enzymy, biometrii, fotoniku či nanoelektroniku^{3–6}. Díky tomuto širokému využití se studium hybridních polymerů stalo důležitou oblastí polymerní chemie.

Cílem tohoto přehledu je poskytnout komplexní popis jedné specifické skupiny polymerních biokonjugátů – glykokonjugátů, tedy hybridních polymerů na bázi polysacharidů, které jsou nejčastěji využívány pro cílený transport léčiv či v tkáňovém inženýrství⁷. Tento úkol není jednoduchý, neboť obě kategorie (polysacharidy i syntetické polymery) mají extrémně různorodé vlastnosti. Polysacharidy se liší od ostatních biopolymerů tím, že mohou být vysoce rozvětvené a jejich monomerní jednotky mohou být navzájem spojeny mnoha různými typy vazeb. Typ spojující glykosidové vazby má přitom zásadní vliv na vlastnosti výsledného polysacharidu i na jeho nadmolekulární strukturu. Úlohou polysacharidů v organismech je především skladovat a transportovat energii (např. škrob, glykogen) či chránit proti mechanickému poškození (chitin), avšak mohou zastávat i poměrně složité biologické funkce⁸. Tento přehled nejprve ukazuje možné postupy příprav těchto polymerních glykokonjugátů a dále se věnuje jednotlivým příkladům, které jsou uspořádány dle jednotlivých druhů polysacharidů.

2. Příprava polymerních glykokonjugátů

2.1. Zdroje polysacharidů

Je s podivem, že i když je studium polymerních glykokonjugátů důležitou oblastí současného výzkumu, tak syntéza/příprava samotných polysacharidů je poměrně složitá. Tento fakt je dán především tím, že zatím, narozdíl od proteinů a nukleových kyselin, neexistuje jednoduchý automatizovaný systém pro syntézu oligosacharidů, a to i přesto, že se výzkumu této tematiky věnovalo nemalé úsilí (viz tab. I). Vysvětlení prozatímního neúspěchu tkví ve struktuře samotných polysacharidů. Zatímco chemická syntéza oligopeptidu zahrnuje opakující se tvorbu peptidové vazby např. mezi jednou aktivovanou karboxylovou skupinou a volným aminem, chemická syntéza oligosacharidů vyžaduje několik hydroxylových skupin podobné reaktivity vhodně diferencovaných tak, aby se získal požadovaný produkt s příslušnou regio- a stereoselektivitou, odpovídající požadované trojdimenzionální struktuře. Tato syntéza tedy často zahrnuje namáhavé manipulace s chránícími skupinami a extrémně dlouhé syntetické cesty. V živých organismech existuje centrální dogma mole-

Tabulka I
Obecné metody využívané k získání biopolymerů

Biopolymery	Metody k získání
Proteiny	extrakce z biologického materiálu, automatizovaná peptidová syntéza, nativní ligace peptidů, nadměrná exprese genů vložených do produkčního organismu, katalýza proteasou
Nukleové kyseliny	extrakce z biologického materiálu, automatizovaná syntéza nukleových kyselin, polymerasová řetězová reakce
Oligo/polysacharidy	extrakce z biologického materiálu, chemická syntéza, enzymatická syntéza

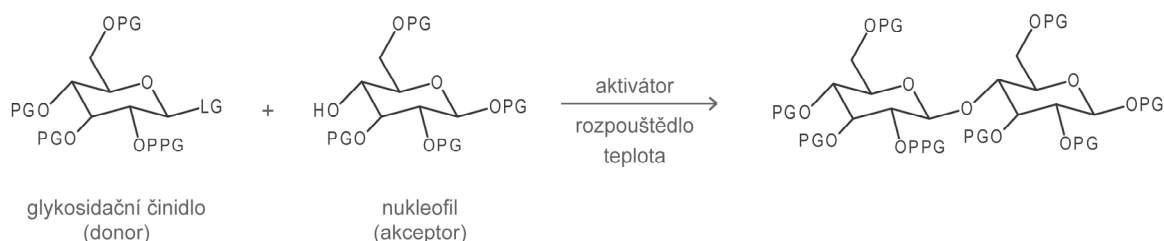
kulární biologie (DNA → RNA → proteiny), které bohužel neplatí pro glykokonjugáty. Ty totiž nejsou syntetizovány templátovou reakcí, ale spíše posttranslačním procesem, přičemž jejich výsledná struktura je ovlivněna mnoha faktory – kompeticí enzymů pro jeden substrát, substrátovou specifitou enzymu a také dostupností substrátu. Z tohoto důvodu jsou glykokonjugáty včetně glykoproteinů typicky polydisperzní¹⁰.

Polysacharidy používané k přípravě polymerních glykokonjugátů jsou dostupné pomocí extrakce z biomateriálu, chemickou syntézou či enzymatickou syntézou (viz tab. I).

Relativně nejjednodušší a nejvíce prostudovaný způsob je zmiňovaná extrakce polysacharidů, avšak tyto metody často neprodukují dostatečné množství materiálu v potřebné kvalitě. Polysacharidy, získávané extrakcí, jsou obsaženy nejčastěji jako strukturní komponenty v buněčných stěnách, především hub, bakterií a řas. Výběr extrakčních metod je závislý na struktuře dané buněčné stěny, např. buněčné stěny hub obsahují dva typy polysacharidů: fibrilární chitin (nebo celulosu) a vodorozpustné β-glukany, α-glukany a glykoproteiny¹¹. Většina extrakčních metod zahrnuje nejprve odstranění nízkomolekulárních látek pomocí 80% ethanolu. Dále mohou následovat 3 postupné extrakce: vodou (100 °C, 3 h), 2% roztokem

štelanu amonného (100 °C, 6 h) a 5% roztokem hydroxidu sodného (80 °C, 6 h)¹². Extrakce horkou vodou vedou obecně k polysacharidům rozpustným ve vodě, které se vyskytují na vnější vrstvě buněčné stěny (exopolysacharidy) a chrání ji před externím mechanickým poškozením. Extrakce alkalickými roztoky vedou naproti tomu spíše k polysacharidům ve vodě nerozpustným, které tvoří vnitřní vrstvu buněčné stěny (endopolysacharidy). Přesná metoda extrakce daného polysacharidu se může lišit od výše popsaného obecného postupu v závislosti na jeho struktuře a rozpustnosti ve vodě, avšak vždy je nutné narušit strukturu buněčné stěny pomocí vhodně zvolených extrakčních podmínek (pH a teplota). Nakonec mohou být extrahované polysacharidy přechistěny přesrážením v ethanolu. Často se také využívá iontová chromatografie na diethylaminoethyl (DEAE) celulosové koloně, separující neutrální a nabitý polysacharidy, přičemž nejprve jsou eluovány neutrální polysacharidy vhodným pufrům a poté je eluován nabitý polysacharid pufrům o vysoké iontové síle¹¹. Neutrální polysacharidy mohou být dále separovány na α- a β-glukany pomocí afinitní chromatografie, která využívá specifické reakce α-glukanů s imobilizovaným ligandem uvnitř kolony. Po přidání směsi α- a β-glukanů k takovému ligandu se na něj vážou jen α-glukany, které s ním tvoří silné vazby, a zbytek směsi protéká kolonou beze změny. Navázaný α-glukan se následně eluuje pomocí vysoce koncentrovaného roztoku solí (např. chloridu vápenatého, chloridu sodného či chloridu draselného). Jako ligandy se specifickou reakcí na α-glukany se většinou využívají lektiny.

Jak již bylo diskutováno výše, další způsobem získávání oligo/polysacharidů je chemická syntéza, která je však velmi náročná, což vyplývá ze struktury těchto látek. Vznik glykosidové vazby chemickou syntézou je uskutečněn nukleofilem („glykosidový akceptor“), který napadá aktivované anomerní centrum („glykosidový donor“), přičemž všechny hydroxylové a aminové skupiny musí být maskovány chránicími skupinami tak, aby pouze požadovaná hydroxylová skupina či skupiny byly glykosidovány (obr. 1). Velikost, elektronické vlastnosti a konformace chránicích skupin mají obrovský vliv na finální reaktivitu a stereoselektivitu glykosidace, stejně jako použité rozpouštědlo, teplota a aktivátor. Vzhledem ke komplexitě

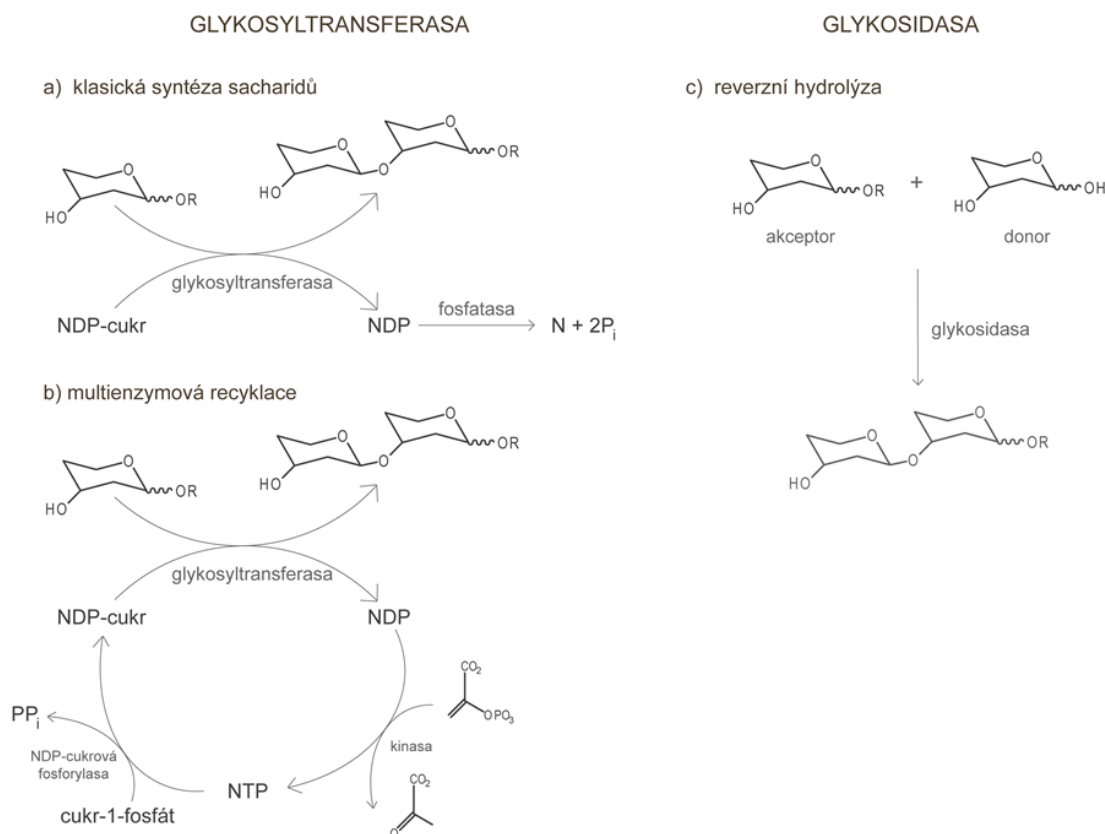


Obr. 1. Obecné schéma vzniku glykosidové vazby pomocí chemické syntézy (PG – chránicí skupina, LG – odstupující skupina, PPG – „účastníci se“ chránicí skupina). Stereochemie výsledného produktu závisí na povaze chránicí skupiny, odstupující skupiny, aktivátoru, rozpouštědla a teplotě. Zde uvedeno pro přípravu PG-chráněného disacharidu D-glukosa-β(1→4)-D-glukosa

těchto reakcí vznikl specializovaný obor organické syntézy, pro nějž je charakteristická strategická jednoduchost, provozní složitost a nepředvídatelnost glykosidačních reakcí. V průběhu mnoha let byla vyvinuta řada odstupujících anomerních skupin, např. glykosylhalogenidy, avšak v poslední době byly nahrazeny především glykosylimidáty¹³, thioglykosidy¹⁴ nebo glykosylfosfáty¹⁵. K tomu navíc nové znalosti reaktivit glykosidačních činidel přinesly pokrok v sekvenční „one-pot“ syntéze, kdy je nutná správná kombinace jednotlivých stavebních bloků, které mohou sloužit jednak jako glykosidační činidla stejně jako nukleofily¹⁶. Touto metodou byly připraveny až hexasacharidy¹⁷. Rozdíly reaktivit jednotlivých glykosidačních činidel obecně komplikují syntézu glykanů, protože různé stavební bloky vyžadují různé reakční teploty a čas. Vcelku spolehlivá stereoselektivita je v případě vzniku *trans*-glykosidické vazby, kdy se chránící skupina (nejčastěji estery nebo amidy) v místě C-2 účastní vzniku oxoniového meziproductu a blokuje tak jednu jeho stranu, a tudíž nukleofil má možnost přistoupit pouze z druhé strany. Přítomnost chránících skupin v jakékoliv jiné poloze glykosidačního činidla může potenciálně ovlivnit stereochemický výsledek glykosidace¹⁸. Opačná situace je v případě vzniku *cis*-glykosidické vazby, kdy nelze využít tyto „účastníci

se“ chránící skupiny (estery, amidy), ale využívají se tzv. „neúčastníci se“ skupiny v pozici C-2, např. benzyl ethery či azidy. Zde se bez vlivu „účastníci se“ skupiny vytváří termodynamicky stabilnější produkt – α -glykosid díky anomernímu efektu. Tento fakt naznačuje, že reakce vedoucí k *cis*- β -glykosidické vazbě, přítomné např. v β -mannosidech, jsou vcelku náročné, neboť nelze použít „účastníci se“ chránící skupiny a musí se zároveň eliminovat anomerní efekt pomocí tzv. „konformačního uzamknutí“¹⁹. Nejnovější výzkum pak přinesl koncept automatického oligosacharidového syntetizátoru na pevné fázi, Glyconeer 2.1, se kterým je možné syntetizovat různé oligosacharidy obsahující až 30 jednotek v řetězci²⁰.

Další možností přípravy oligosacharidů je enzymatická syntéza, která využívá glykosyltransferasy a glykosidas jako cenné regio- a stereoselektivní katalyzátory vzniku glykosidové vazby. Glykosyltransferasy jsou zodpovědné za syntézu většiny glykanů na povrchu savčích buněk, kde přenášejí daný sacharid od odpovídajícího donorového substrátu (nukleotid sacharidu) ke specifické hydroxylové skupině akceptujícího sacharidu (obr. 2a)²¹. Velké množství eukaryotických glykosyltransferas bylo již úspěšně klonováno, přičemž bylo zjištěno, že vykazují obecně vynikající vazebnou a substrátovou specifitu



Obr. 2. Obecné schéma enzymatické syntézy sacharidů pomocí a) klasické glykosyltransferasy; b) multienzymové recyklace s glykosyltransferasou²² a c) reverzní hydrolýzy glykosidasou (N – nukleosid, NDP – nukleosid-difosfát, NTP – nukleosid-trifosfát)

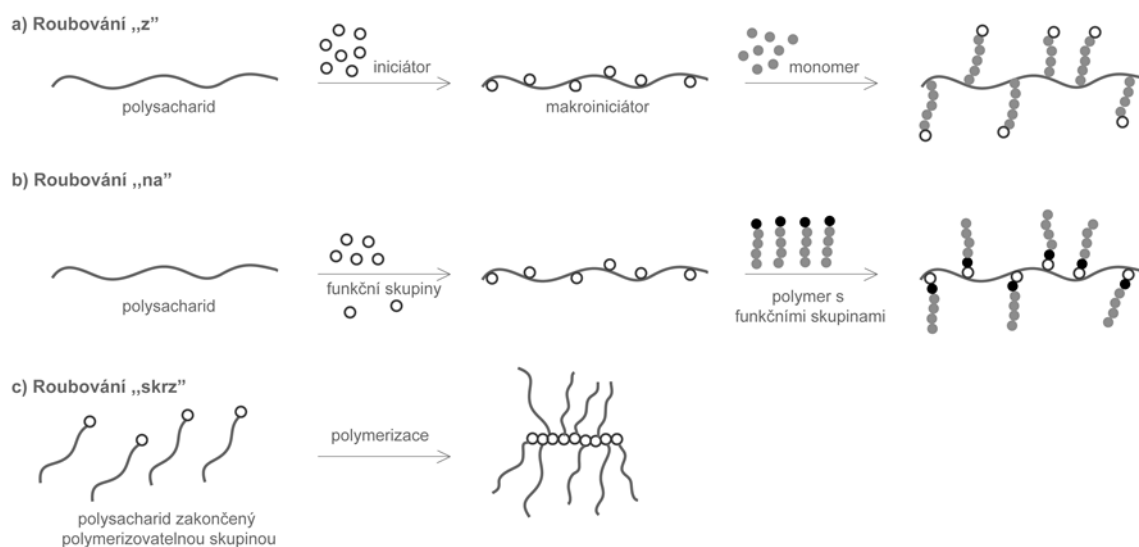
a zároveň velmi dobré výtěžky. Bohužel však i tyto syntézy mají i určité nevýhody. Mezi ně patří např. fakt, že nukleosid-difosfáty (NDP) generované během reakce jsou vcelku účinné inhibitory glykosyltransferasy a navíc při syntéze ve velkém měřítku se finanční náklady na výrobu nukleotidu cukru mohou stát velkou přítěží. A tak byla vyvinuta metoda multienzymové recyklace²², při které je NDP-cukru vyžadován pouze v katalytickém množství, protože se generuje *in situ* z levných výchozích materiálů (obr. 2b). Kromě toho se vznikající NDP recykluje na NDP-cukry, čímž se zabráňuje inhibici produktem. Poslední nevýhodou využití glykosyltransferasy pro syntézu oligosacharidů je její špatná dostupnost. I když v dnešní době je na trhu dostupných mnoho komerčních glykosyltransferas, přesto lze najít chybějící specifické enzymy pro vznik určitých požadovaných glykosidových vazeb. Jak bylo výše uvedeno, vedle glykosyltransferas bývají využívány také exo-glykosidasy a endo-glykosidasy. V živých organismech jsou glykosidasy zodpovědné nejčastěji za štěpení glykosidických vazeb, ovšem za kontrolovaných podmínek mohou být použity spíše pro syntézu glykosidických vazeb než pro jejich štěpení (obr. 2c), přičemž jako katalyzátory při syntéze oligosacharidů již byly úspěšně použity^{23,24}. Ve srovnání s glykosyltransferasami jsou glykosidasy nenákladné, stabilní a snadno dostupné a navíc vyžadují levné donorové substráty oproti neekonomickým nukleotidům sacharidu. Jediná jejich nevýhoda je obecně slabá regiospecifita, která může bohužel vést ke tvorbě více produktů.

2.2. Příprava roubovaných kopolymerů

Nejčastějším typem studovaných modifikovaných polysacharidů jsou jejich roubované kopolyмеры, které se

mohou připravit pomocí tří syntetických strategií (obr. 3): roubováním „z“ (a), roubováním „na“ (b) nebo roubováním „skrz“ (c), přičemž první dva přístupy jsou nejčastěji používané²⁵. Technika roubování „z“ je obecně používána v případech, kdy je potřeba vyšší hustota roubování. Při této technice jsou nejprve zavedeny skupiny iniciátoru na hlavní řetězec polysacharidu, přičemž vzniká tzv. makroiniciátor, a následně je zahájen růst roubovaných řetězců z povrchu polysacharidu za přítomnosti požadovaného monomeru. Naproti tomu při technice roubování „na“ jsou nejprve samostatně vytvořeny živé polymerní řetězce, které jsou následně terminovány funkčními skupinami nesenými hlavním polymerním řetězcem. Tato technika je výhodná zvláště díky tomu, že polymerizace vedlejšího řetězce probíhá odděleně od polysacharidu, a tudíž na něj nemá žádný degradační vliv. Další výhodou roubování „na“ je možnost snadno a detailně charakterizovat rouby, např. jejich molekulovou hmotnost (pro charakterizaci se část polymerizační směsi terminuje nízkomolekulárním činidlem). Avšak při roubování „na“ je obecně dosahováno nižší roubovací hustoty, především kvůli sterickému efektu²⁶. Nejméně používanou technikou přípravy roubovaných polysacharidů je roubování „skrz“, při kterém je na jeden konec oligo/polysacharidového řetězce zavedena polymerizovatelná skupina (nejčastěji dvojná vazba), přičemž při polymerizaci vytváří monomerní jednotky této skupiny hlavní řetězec nesoucí oligo/polysacharidové rouby.

Technika roubování „z“ bývá často zkoumána ve spojení s radikálovou polymerizací, kdy jsou nejprve radikály generovány podél hlavního polysacharidového řetězce pomocí chemického iniciátoru nebo záření. Takto vytvořený makroiniciátor je následně možné radikálově polymerizovat v přítomnosti monomeru za vzniku požadované



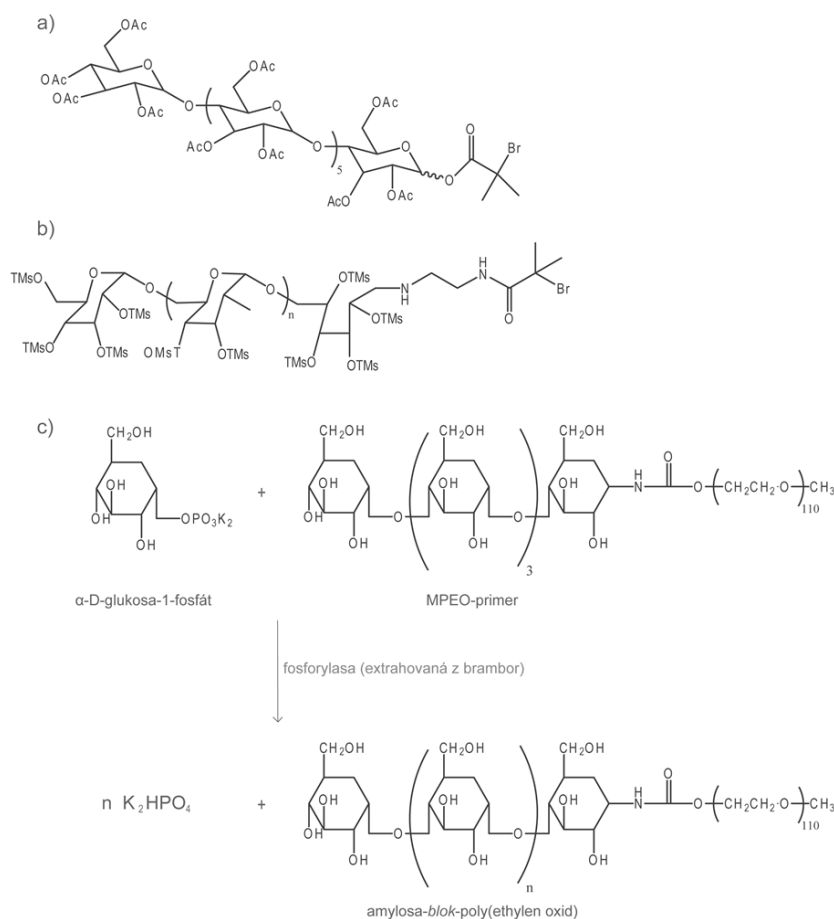
Obr. 3. Syntetické strategie přípravy roubovaných polysacharidů: a) metodou roubování „z“; b) metodou roubování „na“ a c) metodou roubování „skrz“

ho roubovaného glykokonjugátu. Nevýhodou této metody je však možná degradace polysacharidového řetězce a velmi omezená kontrola molekulové hmotnosti roubov stejně jako disperzity. Nové možnosti v kontrole délky syntetického roubu přinášejí speciální techniky řízené radikálové polymerizace – nitroxidem zprostředkovaná polymerizace (NMP)²⁷, radikálová polymerizace s přenosem atomu (ATRP)²⁸ a polymerizace s reverzibilním adičně-fragmentačním přenosem (RAFT)²⁹. Tyto řízené polymerizace jsou více tolerantní vůči běžným nečistotám a vlhkosti a zároveň jsou kompatibilní s velkým množstvím funkčních skupin, a tak umožňují přesné přizpůsobení požadovaných vlastností polysacharidových hybridů. Principem této techniky je významné snížení koncentrace propagačních radikálových konců řetězce, čímž se výrazně minimalizuje také koncentrace ireverzibilních terminačních center, a jelikož rychlost rekombinace radikálových center je úměrná druhé mocnině koncentrace radikálů, zatímco rychlost propagace je pouze přímo úměrná této koncentraci radikálů, tak lze v systémech s velmi nízkou koncentrací radikálových center dosáhnout polymerů s úzkou distribucí molárních hmotností. Pro snížení koncentrace propaga-

jících radikálových center se do systému přidávají látky, které zajišťují reverzibilní zachycení „aktivního“ radikálového centra a jeho přeměnu na „spící“ centrum. Například řízení techniky NMP spočívá v přidavku nitroxidu, vytvářející v reakční směsi relativně stabilní radikály, zatímco při ATRP se přidává komplex přechodného kovu jako katalyzátor a alkylhalogenid jako iniciátor. Při procesu RAFT je reverzibilní zachycení radikálu zajištěno přenosovými reakcemi pomocí např. dithioesterových sloučenin.

2.3. Příprava blokových kopolymerů

Naše literární rešerše překvapivě ukázala, že oproti roubovaným polysacharidovým kopolymerům se jen velmi málo publikací věnuje syntéze blokových kopolymerů oligosacharidů či polysacharidů. Jako první takovýto blokový kopolymer byl koncem 80. let připraven polyethylenoxid-*blok*-oligosacharid pomocí tzv. „couplingu“ koncových skupin³⁰. Od té doby byly připraveny kopolymery obsahující syntetický blok spojený s polysacharidovým také pomocí radikálové³¹ a enzymatické polymerizace³². V případě radikálové polymerizace je na konec polysacha-



Obr. 4. a), b) oligosacharidové prekurzory schopné iniciovat polymerizaci typu ATRP; c) schéma enzymatické syntézy amylosa-*blok*-polyethylenoxid

řetězce zavedena skupina, která se následně účastní řízené polymerizace syntetického bloku. Například glykokonjugované adukty 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu (TEMPO) byly připraveny z glukosy, malto-oligosacharidů a β -cyklodextrinu³³, přičemž jejich následnou řízenou polymerizací typu NMP byly vytvořeny polymeru typu β -cyklodextrin-blok-polystyren ($M_n = 5$ až 37 kDa, $\bar{D} < 1,5$). Z komerčně dostupného β -cyklodextrinu byl také syntetizován acetylovaný oligosacharid schopný iniciovat polymerizaci typu ATRP (obr. 4a)³⁴, přičemž tento iniciátor umožnil řízenou polymerizaci řady monomerů, např. styrenu, methyl-methakrylátu a dalších funkčních hydrofilních methakrylátů. Získané oligosacharidové bloky byly následně kvantitativně deacetylovány methoxidem sodným ve směsi methanolu a chloroformu za získání blokových oligosacharidových polymerů. Navíc ATRP iniciátorová skupina byla také úspěšně zavedena na redukční konec dextranu ($M_n = 6,6$ kDa) pomocí redukční aminace s α -terciárním bromidem, přičemž následně byly –OH skupiny dextranu chráněny silylací (obr. 4b). Poté byly řízenou polymerizací získány kopolymery dextran-blok-polystyren s nastavitelným složením jednotlivých bloků³⁵. Jak již bylo výše zmíněno, blokové polysacharidové kopolymery byly také připraveny enzymatickou syntézou, přičemž nejdříve byl nasyntetizován první blok methoxypolyethylenoxid-*p*-nitrofenylkarbonát ($M_w = 5,0$ kDa), který následně reagoval s maltopentaozylaminem. Tento meziprodukt (MPEO-primer, obr. 4c) byl následně úspěšně enzymaticky polymerizován fosforylázou extrahovanou z brambor využívající α -D-glukosa-1-fosfát jako substrát³⁶.

3. Využití polymerních glykokonjugátů v praxi

3.1. Kopolymery polysacharidů vyskytujících se v rostlinách

Celulosa je lineární ve vodě nerozpustný polysacharid obsahující jednotky 1,4- β -D-glukosy. Je hlavní stavební složkou rostlinných buněčných stěn, což ji staví do role nejrozšířenějšího biopolymeru na zemském povrchu (bylo odhadnuto, že ročně vzniká cca $1,5 \cdot 10^9$ tun celulosy³⁷). Modifikovaná celulosa je již dlouhou dobu průmyslově využívána a tato historie sahá až do roku 1870, kdy byl poprvé vyroben polymerní materiál „celuloid“ (nitrát celulosy změkčený káfrém) ve firmě Hyatt Manufacturing Company³⁸, přičemž výroba nitrátu celulosy zahrnuje její esterifikaci kyselinou dusičnou v přítomnosti kyseliny sírové, fosforečné nebo octové. V současné době jsou dalšími obecně používanými estery celulosy acetát celulosy, propionát celulosy a butyrát celulosy. Dalším možným způsobem chemické modifikace celulosy jsou etherifikační reakce, kterými se dají získat důležité produkty, např. methylcelulosa, karboxymethylcelulosa a hydroxyalkylcelulosa. Tyto estery a ethery celulosy se využívají při výrobě nejrůznějších nátěrů, optických fólií, sorpčních medií, léčiv, potravin či kosmetiky. V roce 1943 se Ushakov po-

koušel polymerizovat některé allyl estery a vinyl estery celulosy s estery kyseliny maleinové, přičemž získal nerozpustné produkty, což byly pravděpodobně první roubované kopolymery celulosy³⁹. Od té doby bylo syntetizováno nepřehledné množství roubovaných kopolymerů celulosy. Například bylo provedeno kationtově iniciované roubování celulosového substrátu pomocí isobutylenu a α -methyl styrenu, přičemž iniciátor byl vytvořen reakcí fluoridu boritého (Lewisova kyselina) a hydroxylových skupin celulosy (Lewisova báze). Roubovaná celulosa polyakrylonitrilem, polymethakrylonitrilem a polymethylmethakrylátem byla připravena aniontovou polymerizací, využívající alkoholáty celulosy jako iniciátory. Velmi dobře řízené molekulové hmotnosti a úzké distribuce bylo dosaženo také při roubování celulosy pomocí poly(2-methyl-2-oxazolinu) a poly(isobutylvinyletheru)⁴⁰.

β -Glukany jsou polysacharidy obsahující β -D-glukosové jednotky, spojené většinou 1,3- β - nebo 1,6- β -glykosidovými vazbami. β -Glukany se v přírodě vyskytují v buněčných stěnách obilovin, bakterií a hub, přičemž vlastnosti jednotlivých β -glukanů se signifikantně liší v závislosti na jeho původu. β -Glukany se používají jako ztužovací činidla v nejrůznějších potravinářských a kosmetických výrobcích. Obecně je známo, že β -glukany mají velmi prospěšný vliv na lidské zdraví. Bylo prokázáno, že příjem nejméně 3 g ovesného β -glukanu denně sníží hladinu LDL cholesterolu a přispívá tak ke snížení rizika kardiovaskulárních chorob⁴¹. Velmi zajímavou skupinou β -glukanů, již v tradiční orientální medicíně využívaných, jsou β -glukany pocházející z buněčných stěn hub. V nedávných studiích byly popsány jejich imunoterapeutické vlastnosti, včetně zesílení protinádorové imunitní odpovědi⁴², což je spojeno se stimulací imunitních receptorů (především Dektin-1 a Toll-like receptory), a tak se modifikované β -glukany v poslední době studují jako potenciální protinádorová imunoterapeutika. Kurdlan (β -1,3-glukan), vyrábějící se fermentací bakterií *Agrobacterium biobar*, byl roubován polyethylenglykolem, přičemž vzniklý kopolymer byl použit pro přípravu nanočástic nesoucích chemoterapeutickou látku doxorubicin. Připravené nanočástice tudíž kombinovaly dvě léčebné metody – chemoterapii a imunoterapii⁴³. Na podobném konceptu byla také založena léčba imunoradioterapií, pro kterou byl β -glukan (pocházející z *Auricularia auricula-judae*) roubován poly(2-methyl-2-oxazolin-co-2-butyl-2-oxazolinem), který byl dále označen radioaktivním ⁹⁰Y. Takto označený polymer spojoval vhodné termoresponzivní vlastnosti pro tvorbu polymerního depa, terapeutickou lokální radioaktivitu a imunoterapeutické působení, což bylo úspěšně prokázáno při *in vivo* testech na myších s lymfomem⁴⁴.

κ -Karagenan je polysacharid skládající se ze střídavě vázaných galaktosových a 3,6-anhydrogalaktosových jednotek, sulfátovaných i nesulfátovaných, přičemž tyto jednotky jsou propojeny α -1,3 a β -1,4 glykosidickými vazbami. κ -Karagenan se získává extrakcí z červených mořských řas, nejčastěji z *Chondrus crispus*. Graftováním κ -karagenanu pomocí polyvinylpyrrolidonu ($M_n = 10$ kDa)

vzniká materiál vytvářející ve vodném prostředí při pH ~ 7 hydrogely vykazující zvýšenou schopnost udržovat vodu i přes slabší gelovou pevnost než příslušné kontrolní polysacharidy⁴⁵. Zajímavé pH-responzivní hydrogely κ -karagenan-*graft*-polymethakrylamid byly připraveny jako potenciální kandidáti pro řízený transport bioaktivních látek, přičemž fázový přechod byl pozorován při pH ~ 3 (cit.⁴⁶). Později byla vytvořena interpenetrační pH-responzivní polymerní síť κ -karagenan-*graft*-polyakrylamidu a alginátu sodného, přičemž tento materiál byl úspěšně využit pro cílený transport ketoprofenu (nesteroidní protizánětlivé léčivo s analgetickými a antipyretickými účinky) do střev⁴⁷. Podobné hydrogely, vykazující velmi výhodnou pH-responzivitu, byly připraveny roubováním polyakrylové kyseliny-*co*-poly-2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonové kyseliny na κ -karagenan⁴⁸. Pro použití k hojení ran, vyžadující od materiálu schopnost zadržovat vodu, absorbovat vlhkost a antimikrobiální aktivitu, byl κ -karagenan modifikován kyselinou chloroctovou. Vzniklý karboxymethyl-karagenan vykazoval všechny tyto potřebné vlastnosti, které byly silně závislé na jeho stupni substituce – čím byl větší stupeň substituce, tím lepší výsledky byly prokázány⁴⁹. Tenké filmy pocházející z mořských porostů na bázi κ -karagenanu byly roubovány polymethylmethakrylátem s využitím peroxodisíranu draselného jako iniciátoru. Výsledné materiály vykazovaly vhodnou velikost pórů využitelnou pro membrány na separace plynů⁵⁰.

3.2. Kopolymery polysacharidů živočišného původu a vyskytujících se v houbách

Chitin je relativně hydrofobní lineární polysacharid tvořící primární komponentu buněčných stěn většiny hub a také se vyskytující v kutikule členovců, přičemž u některých z nich (např. u hmyzu, korýšů apod.) je kutikula zpevněna pomocí minerálních látek a přeměněna v pevný exoskelet. Chitin je složen z molekul *N*-acetyl-D-glukosaminu vzájemně propojených pomocí 1,4- β -glykosidické vazby. Je nerozpustný ve vodě při neutrálním pH, ale jeho modifikace pomocí *N*-deacetylace ($\rightarrow$ chitosan obsahující jednotky *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu) zvyšuje rozpustnost ve vodě a zároveň poskytuje podél řetězce reaktivní primární aminoskupiny, které je možné dále modifikovat. Chitosan rozpuštěný za kyselých podmínek společně v kombinaci s polyolovými solemi (např. glycerol- nebo glukosa-fosfátová sůl) vytváří termoresponzivní gel, který je při laboratorní teplotě v kapalném stavu a při 37 °C se přemění na gel, což je velmi užitečné pro enkapsulaci živých buněk či terapeutických proteinů. Tento systém byl úspěšně využit *in vivo* pro transport biologicky aktivních růstových faktorů a také pro enkapsulaci matric živých chondrocytů pro tkáňové inženýrství⁵¹. Dalším zajímavým příkladem využití chitosanu pro responzivní systémy je chitosan-*graft*-poly(2-dimethylamino)ethyl methakrylát, který je citlivý na změnu pH. Při pH ~ 4 vytváří polymer molekulární roztok, zatímco při pH 5–6 se začínají vytvářet „core-shell“ nanočástice, při pH ~ 7 se tyto nanočástice dále spojují a vytváří nanočástice typu

dvouvrstvé koule a při pH ~ 8 nakonec dochází k jejich agregaci a vysrážení⁵². Dokonce byl připraven systém kombinující obojí výše zmíněné responzivní chování, chitosan-*graft*-poly-2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl-methakrylát, který vykazuje jak pH- tak termoresponzivní chování⁵³. Modifikovaný chitosan může být také využit pro selektivní adsorpci rtuťových iontů, přičemž za tímto účelem byl pomocí ATRP syntetizován chitosan-*graft*-polyakrylamid, který při následné studii vykazoval velmi dobrou maximální adsorpční kapacitu rtuti (až 322,6 mg Hg iontů/g polymeru)⁵⁴.

Kyselina hyaluronová (KH) je hydrofilní lineární glykosaminoglykan, obsahující kyselinu 1,4- β -D-glukuronovou a 1,3- β -*N*-acetylglukosamin. KH byla prvně objevena v dobytčím oku v roce 1934 (cit.⁵⁵), avšak později bylo zjištěno, že KH je distribuováno v celém těle, zejména v extracelulární matici a synoviálních tekutinách⁵⁶. Přestože samotná KH může být pro aplikace izolována extrakcí z živých tkání, nejčastěji je produkována mikrobiální fermentací kvůli sníženému riziku infekcí, kontaminací a virů⁵⁷. Bylo prokázáno, že KH podporuje angiogenezi a pomáhá při hojení ran⁵⁸, přičemž tato zjištění motivovala k masivnímu využití KH pro regeneraci poškozených hlasivek a léčbu jejich nedostatečné funkčnosti, pro výrobu protizánětlivých látek a také v kosmetickém a potravinářském průmyslu^{59–64}. Dále také bylo zvažováno použití KH jako biomateriálu pro dlouhodobé implantáty, avšak využití nemodifikované KH bylo problematické kvůli její velmi rychlé enzymatické degradaci v těle (u lidí se syntetizuje a degraduje až 5 g KH denně, přičemž v průměrném člověku je celkem obsaženo přibližně 15 g KH)⁶⁵. Pro snížení rychlosti degradace a také její kontrolu byla KH konjugována se syntetickými polymery, které navíc často i zvyšovaly mechanickou pevnost těchto materiálů. Prestwich a spol. studovali tvorbu hydrogelů tak, že nejříve KH převedli na derivát dihydrazidu adipové kyseliny, který potom zesítňovali s polyethylenglykol propiondialdehydem⁶⁶, ale nakonec se ukázalo, že pro polymerní síť KH budou využitelnější spíše chemicky šetrnější postupy. Jako eventualita se ukázala možnost funkcionalizace KH volnými thiohy a následné zesítňování pomocí Michaelovy adice s polyethylenglykol diakrylátem⁶⁷. Takto připravené materiály mohou být použity pro kontrolované uvolňování protizánětlivých léků, zvýšení reepitelizace při hojení ran⁶⁸, stimulaci růstu vlasečnic pomocí uvolňování cytokinů⁶² nebo jako náhražka tukové tkáně⁶⁹. Na KH byla také roubována poly(mléčná-*co*-glykolová kyselina), přičemž výsledný kopolymer vytvářel nanočástice využitelné k cílenému transportu protinádorových léčiv⁷⁰. Rovněž byla zkoumána konjugace methakrylátu KH s diakrylátem blokového kopolymery Pluronic® F127 pomocí fotozesítňovacího efektu. Takto vzniklé hydrogely vykazovaly termoresponzivitu⁷¹, tedy rychle ztrácely obsah vody ve své struktuře (odbotnaly) s rostoucí teplotou, což bylo následně využito v aplikaci kontrolovaného uvolňování lidských růstových faktorů a plazmidů DNA, indukujících transfekci *in vitro*. Podobné hydrogely byly vytvořeny roubováním methakrylátu KH

amino-funkcionalizovaným produktem Pluronic® F127 s následným fotozesíťováním s akrylátovými buněčně-adhezními doménami. Enkapsulace chondrocytů těmito hydrogelovými strukturami poté způsobila *in vitro* zvýšenou produkci proteinů extracelulární matrice, především kolagenu II (cit.⁷⁰).

Chondroitin sulfát (CS) je lineární polysacharid obsahující 1,3- β -N-acetylglaktosamin a 1,4- β -glukuronovou kyselinu. N-Acetylglaktosamin je v řetězci sulfátován v poloze 4 nebo 6 (chondroitin-4-sulfát resp. chondroitin-6-sulfát). CS byl poprvé objeven v roce 1861 Fischerem⁷², avšak jeho struktura byla objasněna až na začátku 20. století⁷³. CS se nejvíce vyskytuje jako součást proteoglykanů v matricích pojivových tkání, plnicí zde především strukturní úlohu, nebo na povrchu buněk a membrán, plnicí úlohu receptorů⁷⁴. Komerčně dostupný CS se získává extrakcí z mnoha přírodních zdrojů, např. chrupavky skotu, prasat či žraloka⁷⁵. Důležitou roli hraje CS v kloubní chrupavce, kde mnoho řetězců CS je konjugováno na jeden řetězec proteinu, a vytváří tak gradient náboje, který zpevňuje chrupavku a zvyšuje tak její schopnost absorbovat zátěž⁷⁶. Tato přirozená role CS nasměrovala jeho použití v tkáňovém inženýrství pro léčbu chrupavek⁷⁷. Konkrétně pro tuto aplikaci byl CS nejdříve modifikován pomocí glycidyl-methakrylátu a následně fotozesíťován pomocí polyethylen glykol-diakrylátu. Modifikací CS aldehydem nebo sukcinimidyl-sukcinátem a následným zesíťováním poly(vinylalkohol-co-vinylaminem) vzniká materiál využitelný jako adhezivum při operacích rohovky, neboť tento materiál vykazuje minimální zánětlivé reakce a zároveň je odolný vůči poškození při velkých tlacích⁷⁸. Tento materiál byl také studován při hojení ran, kdy hydrogelový film byl nanesen na povrchové zranění myším a také na vnitřní zranění čelistní sliznice králíků, přičemž v obou případech ukázala léčba pomocí těchto hydrogelů značné urychlení hojení oproti kontrolní skupině⁷⁸. Dalším využívaným glykokonjugátem CS je CS-graft-polylaktid vytvářející ve vodných roztocích micely, které jsou vhodné pro enkapsulaci chondrocytů a pro cílený transport léčiv⁷⁹.

Heparin je lineární glukosamin s vysokým stupněm sulfatace a jeho struktura je složena z 1,4- α a také β -kyseliny uronové a α -D-glukosaminových zbytků, obsahujících směs funkčních skupin. Heparin byl poprvé objeven v roce 1916, přičemž od roku 1935 je klinicky používán jako antikoagulant⁸⁰. Heparin je syntetizován jako proteoglykan obsažený v žírných buňkách (60–100 kDa) a poté je štěpen na menší fragmenty pomocí endoglykasy (5 až 25 kDa)⁸¹. Komerčně se heparin vyrábí extrakcí z nejrůznějších tkání (např. prasečí či hovězí stěvní sliznice) následovanou složitými purifikačními procesy. Vysoký negativní náboj heparinu vyvolává vznik mnoha iontových interakcí s řadou proteinů (růstové faktory, proteasy, chemokiny), což je předmětem intenzivního studia. Bylo např. prokázáno, že taková interakce může mít za následek stabilizaci, zejména proti denaturaci, řady růstových faktorů, např. bazálního fibroblastového růstového faktoru (bFGF) nebo vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), a zároveň způsobuje zvýšení afinity tohoto kom-

plexu na buněčné receptory⁸². Pro zlepšení mechanických a chemických vlastností byl heparin konjugován nejprve s polystyrenem za vzniku specifických desek, jejichž povrch vykazoval zvýšenou aktivitu růstových faktorů VEGF a FGF-2. Heparin konjugovaný na hydrogely polyethylen glykolu byl také použit k prozkoumání diferenciaci a fenotypové odpovědi mezenchymálních kmenových buněk a valvulárních intersticiálních buněk (VIC) tím, že zachytí růstové faktory a další proteiny vázající se na heparin⁸³. V tomto případě bylo později zjištěno, že kovalentní konjugace heparinu s hydrogelovou sítí polyethylenoxidu k zachycení růstového faktoru FGF2 vyvolala expresi myofibroblastových fenotypových markerů, což naznačuje, že imobilizovaný heparin může modulovat buněčný osud přes vazbu růstových faktorů na rozhraní gel/buňky⁸⁴.

4. Závěr

Mnoho výše diskutovaných příkladů ukazuje širokou škálu využití polymerních glykokonjugátů, dostupných kombinací polysacharidů a syntetických polymerů. Tyto materiály jsou připravovány a používány z důvodu zlepšení vlastností samotných polysacharidů, neboť syntetické polymery mohou mít vliv na hydrofilitu, teplotní rezpozivitu a pH rezpozivitu, samouspořádání, citlivost k hydrolyze a také na umístění funkčních skupin ve výsledném hybridním materiálu. Pro jejich přípravu bývají obecně používány spíše šetrné konjugací techniky. Požadovaných vlastností syntetických polymerů se dá snadno docílit výběrem jejich struktury, a tudíž se dají snadno modifikovat i vlastnosti výsledného hybridního kopolymeru. Rozsáhlé využití polymerních glykokonjugátů je způsobeno kombinací jejich jedinečných vlastností a relativně nízké výrobní ceny. Polymerní glykokonjugáty využívající zvířecí polysacharidy se často používají k výrobě systémů vyžadujících nízkou imunogenicitu, zatímco glykokonjugáty z polysacharidů pocházejících z hub jsou potřebné pro imunologické aplikace, neboť jsou schopné vyvolávat specifické reakce receptorů. Nevýhodou všech polysacharidů pocházejících z přírodních zdrojů je jejich nečistota a obsah patogenů. Avšak tento problém odpadá při použití nových postupů výroby polysacharidů, tedy jejich chemickou nebo enzymatickou syntézou. Takto vytvořené polysacharidy mají dobře definovanou strukturu, ale ještě bohužel nebyly plně využity pro přípravu polymerních glykokonjugátů. Vývoj polymerních glykokonjugátů umožnil výrobu velmi různorodých a funkčních materiálů s takovými biologickými odezvami a takovými chemickými a mechanickými vlastnostmi, aby lépe napodobovaly vlastnosti přirozených matic. Budoucnost konjugace polysacharidů a syntetických polymerů je především v pokračujícím trendu „přizpůsobování“ polysacharidů a jejich vlastností dle požadovaných potřeb.

Vypracováno s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci Národního programu udržitelnosti I (NPU I), Projekt POLY-MAT LO1507.

LITERATURA

1. Langer R., Tirrell D. A.: *Nature* **428**, 487 (2004).
2. Cobo I., Li M., Sumerlin B. S., Perrier S.: *Nat. Mater.* **14**, 143 (2015).
3. Niemeyer C. M., Mirkin C. A.: *Nanobiotechnology: concepts, applications and perspectives I* (2004).
4. Tu R. S., Tirrell M.: *Adv. Drug. Del. Rev.* **56**, 1537 (2004).
5. Canalle L. A., Löwik D., van Hest J.: *Chem. Soc. Rev.* **39**, 329 (2010).
6. Lutz J. F., Börner H. G.: *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1 (2008).
7. Reis R. L., Neves N. M., Mano J. F., Gomes M. E., Marques A. P., Azevedo H. S.: *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications I*, 1 (2008).
8. Dwek R. A.: *Chem. Rev.* **96**, 683 (1996).
9. Koeller K. M., Wong C. H.: *Chem. Rev.* **100**, 4465 (2000).
10. Jenkins R. A., Parekh R. B., James D. C.: *Nat. Biotechnol.* **14**, 975 (1996).
11. Zhang M., Cui P. S. W., Cheung C. K., Wang Q., *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 4 (2007).
12. Mizuno T.: *Int. J. Med. Mushrooms* **1**, 9 (1999).
13. Schmidt R. R., Kinzy W.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **50**, 21 (1994).
14. Shiao T. C., Roy R.: *Top. Curr. Chem.* **301**, 69 (2011).
15. Palmacci E. R., Plante O. J., Seeberger P.: *Eur. J. Org. Chem.* **4**, 595 (2002).
16. Wu C. Y., Wong C. H.: *Top. Curr. Chem.* **301**, 223 (2011).
17. Miermont A., Zeng Y., Jing Y., Ye X. S., Huang X.: *J. Org. Chem.* **72**, 8958 (2007).
18. Baek J. Y., Lee B. Y., Jo M. G., Kim K.: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17705 (2009).
19. Crich D., Sun S.: *J. Org. Chem.* **61**, 4506 (1996).
20. Hahm H. S., Schlegel M. K., Hurevich M., Eller S., Schuhmacher F., Hofmann J., Pagel K., Seeberger P. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 3385 (2017).
21. Leloir L. F.: *Science* **172**, 1299 (1971).
22. Ichikawa Y., Wang R., Wong C. H.: *Methods Enzymol.* **107**, 247 (1994).
23. Palcic M. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 616 (1999).
24. Watt G. M., Lowden P. A. S., Flitsch S. L.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 652 (1997).
25. Singh V., Kumar P., Sanghi R.: *Prog. Polym. Sci.* **37**, 340 (2012).
26. Tizzotti M., Charlot A., Fleury E., Stenzel M., Bernard J.: *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 1751 (2010).
27. Hawker C. J., Bosman A. W., Harth E.: *Chem. Rev.* **101**, 3661 (2001).
28. Matyjaszewski K., Xia J.: *Chem. Rev.* **101**, 2921 (2001).
29. Chiefari J., Chong Y. K., Ercole F., Krstina J., Jeffery J., Le T. P., Mayadunne R. T. A., Meijs G. F., Moad C. L., Moad G., Rizzardo E., Thang S. H.: *Macromolecules* **31**, 5559 (1998).
30. Ziegast G., Pfannemüller B.: *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **5**, 373 (1984).
31. Schatz C., Louguet S., Le Meins J. F., Lecommandoux S.: *Angew. Chem.* **48**, 2572 (2009).
32. Akiyoshi K., Kohara M., Ito K., Kitamura S., Sunamoto J.: *Macromol. Rapid Commun.* **20**, 112 (1999).
33. Narumi A., Miura Y., Otsuka I., Yamane S., Kitajyo Y., Satoh T., Hirao A., Kaneko N., Kaga H., Kakuchi T.: *J. Polym. Sci., Part A* **44**, 4864 (2006).
34. Haddleton D. M., Ohno K.: *Biomacromolecules* **1**, 152 (2000).
35. Houga C., Le Mans J. F., Borsali R., Taton D., Gnannou Y.: *Chem. Commun.* **29**, 3063 (2007).
36. Akiyoshi K., Kohara M., Ito K., Kitamura S., Sunamoto J.: *Macromol. Rapid Commun.* **20**, 112 (1999).
37. Kim J., Yun S.: *Macromolecules* **39**, 4202 (2006).
38. Klemm D., Heublein B., Fink H. P., Bohn A.: *Angew. Chem.* **44**, 3358 (2005).
39. Tsubokawa N., Iida T., Takayama T.: *J. Appl. Polym. Sci.* **75**, 515 (2000).
40. Prasad K., Mehta G., Meena R., Siddhanta A. K.: *J. Appl. Polym. Sci.* **102**, 3654 (2006).
41. Ho H. V., Sievenpiper J. L., Zurbau A., Blanco Mejia S., Jovanovski E., Au-Yeung F., Jenkins A. L., Vuksan V.: *Br. J. Nutr.* **8**, 1369 (2016).
42. Zong A., Cao H., Wang F.: *Carbohydr. Polym.* **90**, 1395 (2012).
43. Lehtovaara B. C., Mohit S. V., Frank X. G.: *J. Bioact. Compat. Polym.* **27**, 3 (2012).
44. Loukotová L., Kučka J., Rabyk M., Höcherl A., Venclíková K., Janoušková O., Páral P., Kolářová V., Šefc L., Štěpánek P., Hrubý M.: *J. Controlled Release* **45**, 78 (2017).
45. Krassig H. A.: *Cellulose-Structure, Accessibility and Reactivity*. Gordon and Breach Science Publishing, Philadelphia 1993.
46. Pourjavadi A., Sadeghi M., Hosseinzadeh H.: *Polym. Adv. Technol.* **15**, 645 (2004).
47. Kulkarni R. V., Boppana R., Mohan G. K., Mutalik S., Kalyane N. V.: *J. Colloid Interface Sci.* **367**, 509 (2012).
48. Pourjavadi A., Barzegar S., Zeidabadi F.: *React. Funct. Polym.* **67**, 644 (2007).
49. Fan L., Wang L., Gao S., Wu P., Li M., Xie W.: *Carbohydr. Polym.* **86**, 1167 (2011).
50. Prasad K., Meena R., Siddhanta A. K.: *J. Polym. Mater.* **25**, 373 (2008).
51. Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M. D., Hoemann C. D., Leroux J. C., Atkinson B. L., Binette F., Selmani A.: *Biomaterials* **21**, 2155 (2000).
52. Bao H., Hu J., Gan L. H., Li L.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **47**, 6682 (2009).
53. Yuan W., Zhao Z., Yuan J., Gu S., Zhang F., Xie X., Ren J.: *Polym. Int.* **60**, 194 (2011).
54. Li N., Bai R., Liu C.: *Langmuir* **21**, 11780 (2005).
55. Meyer K., Palmer J. W.: *J. Biol. Chem.* **107**, 629 (1934).
56. Lapcik L., De Smedt S., Demeester J., Chabreck P.:

- Chem. Rev. 98, 2663 (1998).
57. Chong B. F., Blank L. M., McLaughlin R., Nielsen L. K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 341 (2005).
 58. Chen W. Y. J., Abatangelo G.: Wound Repair and Regeneration 7, 79 (1999).
 59. Prestwich G. D., Marecak D. M., Marecek J. F., Ver-cruysse K. P., Ziebell M. R.: J. Controlled Release 53, 93 (1998).
 60. Sahiner N., Jha A. K., Nguyen D., Jia X.: J. Biomater. Sci. 19, 223 (2008).
 61. Luo Y., Kirker K. R., Prestwich G. D.: J. Controlled Release 69, 169 (2000).
 62. Peattie R. A., Nayate A. P., Firpo M. A., Shelby J., Fisher R. J., Prestwich G. D.: Biomaterials 25, 2789 (2004).
 63. Shu X. Z., Liu Y., Palumbo F. S., Luo Y., Prestwich G. D.: Biomaterials 25, 1339 (2004).
 64. Chun K. W., Lee J. B., Kim S. H., Park T. G.: Biomaterials 26, 3319 (2005).
 65. Stern R.: Eur. J. Cell Biol. 83, 317 (2004).
 66. Luo, Y., Kirker K. R., Prestwich G. D.: J. Controlled Release 69, 169 (2000).
 67. Zhang J., Skardal A., Prestwich G. D.: Biomaterials 29, 4521 (2008).
 68. Kirker K. R., Luo Y., Nielson J. H., Shelby J., Prestwich G. D.: Biomaterials 23, 3661 (2002).
 69. Flynn L., Prestwich G. D., Semple J. L., Woodhouse K. A.: Biomaterials 28, 3834 (2007).
 70. Lee H., Ahn C. H., Park T. G.: Macromol. Biosci. 9, 336 (2009).
 71. Kim M. R., Park T. G.: J. Controlled Release 80, 69 (2002).
 72. Fischer G., Boedeker C.: Ann. Chem. Pharm. 117, 111 (1861).
 73. Bray H. G., Gregory J. E., Stacey M.: Biochem. J. 38, 142 (1944).
 74. Silbert J. E., Sugumaran G.: IUBMB Life 54, 177 (2002).
 75. Volpi N.: *Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity*. Elsevier, San Diego 2006.
 76. Chahine N. O., Chen F. H., Hung C. T., Ateshian G. A.: Biophys. J. 89, 1543 (2005).
 77. Strehin I., Ambrose W. M., Schein O., Salahuddin A., Elisseeff J.: J. Cataract. Refract. Surg. 35, 567 (2009).
 78. Strehin I., Nahas Z., Arora K., Nguyen T., Elisseeff J.: Biomaterials 31, 2788 (2010).
 79. Lee C. T., Huang C. P., Lee Y. D.: Biomol. Eng. 24, 131 (2007).
 80. Capila I., Linhardt R. J.: Angew. Chem. 41, 390 (2002).
 81. Tipson R. S., Horton D.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, San Diego 1985.
 82. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.: FASEB J. 13, 9 (1999).
 83. Benoit D. S., Collins S. D., Anseth K. S.: Adv. Funct. Mater. 17, 2085 (2007).
 84. Cushing M. C., Liao J. T., Jaeggli M. P., Anseth K. S.: Biomaterials 28, 3378 (2007).

L. Loukotová and M. Hrubý (*Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Prague*):
Polysaccharides as Building Blocks of Hybrid Copolymers

Hybrid copolymers combine the biopolymer properties (biodegradability, biocompatibility, specific interactions) with the tunable properties of the synthetic polymers (hydrophilicity vs. hydrophobicity, external stimulus responsiveness, ionic character). Therefore, these polymers can be used for the preparation of material with desired properties, while it is necessary to take into account the synthetic, physical, physico-chemical, economic and application aspects of the materials used. This review article shows the preparation procedures of polymeric glycoconjugates and also their use in technical and biomedical applications.

Keywords: polysaccharides, hybrid polymers, glycoconjugates, drug delivery

TERMOPLASTIFIKOVANÝ ŠKROB A JEHO APLIKACE

SABINA KREJČÍKOVÁ, ALEKSANDRA
OSTAFINSKA a MIROSLAV ŠLOUFÚstav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského
nám. 2, 162 06 Praha 6
slouf@imc.cas.cz

Došlo 9.4.18, přijato 28.5.2018.

Klíčová slova: škrob, termoplastifikace, želatinizace,
aplikace, řízené uvolňování léčiv

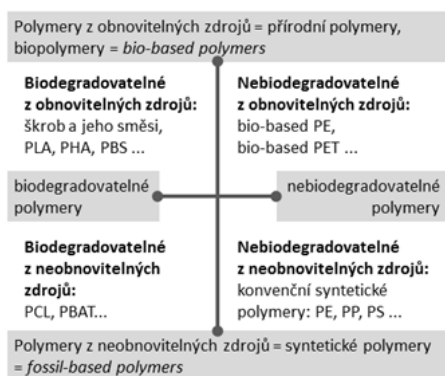
Obsah

1. Úvod: škrob jako nejběžnější přírodní biodegradovatelný polymer
2. Molekulární a nadmolekulární struktura škrobu
3. Plastifikace škrobu
 - 3.1. Teoretická část
 - 3.2. Výsledky z ÚMCH: reprodukovatelná příprava vysoce homogenního TPS
4. Využití termoplastifikovaného škrobu
 - 4.1. Technické aplikace
 - 4.2. Medicinální aplikace
 - 4.3. Výsledky z ÚMCH: systémy pro řízené uvolňování antibiotik na bázi TPS
5. Souhrn

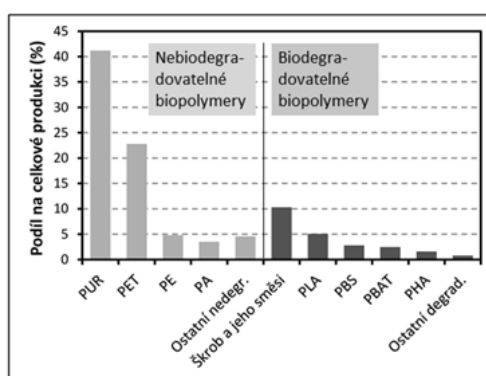
1. Úvod: škrob jako nejběžnější přírodní biodegradovatelný polymer

Biopolymery přitahují v posledních letech čím dál větší pozornost výzkumníků po celém světě. Pojem biopolymer není zcela jednoznačný, jak ukazuje obr. 1: musíme rozlišovat minimálně dvě hlediska (původ polymeru a biodegradovatelnost) a dostáváme tak čtyři kategorie plastů (přírodní degradovatelné, přírodní nedegradovatelné, syntetické degradovatelné a syntetické nedegradovatelné)¹. Přitom pokud jde o původ, pojem *přírodní* zde označuje polymer z obnovitelných zdrojů (biomasy), zatímco pojem *syntetický* označuje polymer z fosilních zdrojů (především ropa, ale i uhlí, zemní plyn a zemní vosk). Pokud jde o degradovatelnost, míníme zde výhradně rozklad v přírodních podmínkách, tj. *biodegradovatelnost*. Omezíme-li se na přírodní degradovatelné polymery, první místo mezi nimi zaujímá škrob a jeho směsi¹, jak dokládá obr. 1b.

Škrob je přírodní zásobní polysacharid, vznikající jako konečný produkt fotosyntézy. Ukládá se v zásobních orgánech rostlin ve formě škrobových zrn (rozlišujeme např. cereální škroby: ze semen pšenice, žita, rýže, kukuřice a dalších obilovin; hlízové škroby: zejména hlízy brambor a tapioky neboli manioky; semena dalších rostlin: luštěniny aj.). U cereálních škrobů rozlišujeme podle velikosti zrn škroby typu A (větší čočkovitá zrna s průměrem ~25 µm), typu B (menší kulovitá zrna s průměrem ~5 µm), případně i C (nejmenší zrna s průměrem kolem ~2 µm).



(a) Kategorie biopolymerů a konvenčních polymerů.



(b) Produkce nebiodegradovatelných a biodegradovatelných biopolymerů.

Polymer	Produkce
Nebiodegradovatelné biopolymery	
Celkem	76.9 %
PUR	41.2 %
PET	22.8 %
PE	4.8 %
PA	3.5 %
Ostatní nedeგრ.	4.6 %
Biodegradovatelné biopolymery	
Celkem	23.1 %
Škrob a jeho směsi	10.3 %
PLA	5.1 %
PBS	2.8 %
PBAT	2.5 %
PHA	1.6 %
Ostatní degrad.	0.8 %
Celkem	100 %

Obr. 1. Biopolymery: (a) rozdělení do kategorií podle zdroje a biodegradovatelnosti a (b) produkce biopolymerů v r. 2016 (podle cit.¹, kde pojem *nebiodegradovatelné biopolymery* označuje polymery z obnovitelných zdrojů, zatímco pojem *biodegradovatelné biopolymery* označuje polymery bez ohledu na původ). Význam zkratk: PUR = polyurethany, PET = (bio-based) polyetylen tereftalát, PE = (bio-based) polyetylen, PA = (bio-based) polyamidy, PLA = polylaktid, PBS = polybutylen sukcinát, PBAT = polybutylen adipát tereftalát, PHA = polyhydroxyalkanoáty

Škroby různého původu se mohou poněkud lišit svým složením a vlastnostmi^{2,3}; níže diskutované materiály z naší laboratoře jsou založeny na jednom z nejběžnějších typů – pšeničném škrobu typu A. Škrob je klíčová složka lidské potravy, v níž slouží jako zdroj energie³.

Po extrakci z rostlin získáme tzv. nativní, *práškový škrob* sestávající ze škrobových zrn, který má řadu aplikací díky kombinaci příznivých vlastností, jako je poměrně dobrá dostupnost z obnovitelných zdrojů a s ní související nízká cena, biodegradovatelnost, nebo i snadná chemická modifikovatelnost⁴. Ovšem pokud chceme škrob využít jako termoplastický materiál (např. ve směsích s dalšími polymery), musíme ho smísit s nízkomolekulárními látkami a za zvýšené teploty plastifikovat⁵, neboli převést na *termoplastifikovaný škrob* (thermoplasticized starch = TPS). Práškový škrob, jeho vlastnosti i aplikace byly již v české odborné literatuře popsány^{2,3}. Tato práce se zaměřuje na termoplastifikovaný škrob. Po velmi stručném popisu struktury práškového škrobu se podrobněji zabýváme popisem plastifikace a uvádíme i náš vlastní, nedávno vyvinutý reprodukovatelný způsob přípravy vysoce homogenního TPS⁶, který je vhodný pro technické i medicínské aplikace. Ve druhé části této práce stručně shrnujeme aplikace škrobu a opět uvádíme i naše výsledky, týkající se polymerních směsí na bázi TPS pro řízení uvolňování antibiotik⁷.

2. Molekulární a nadmolekulární struktura škrobu

Z hlediska molekulární struktury jsou všechny druhy škrobu polysacharidy, přesněji homoglykany (tvořené pouze glukosovými jednotkami). Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany: převážně lineární amylosa (která ovšem může mít jistá rozvětvení⁸), obsahující α -(1→4) glykosidové vazby (molární hmotnost $M \sim 10^5$ – 10^6 g mol⁻¹) a značně rozvětvený amylopektin obsahující jak α -(1→4) vazby, tak i α -(1→6) vazby, které tvoří místa větvení ($M \sim 10^7$ – 10^8 g mol⁻¹). Obě hlavní složky mají neobvykle vysokou molární hmotnost, která se u běžných syntetických polymerů vyskytuje jen vzácně (např. ultravysokomoleku-

lární polyethylen má molární hmotnost srovnatelnou s amylosou, ale nižší než amylopektin). Škrobová zrna obsahují i menší množství dalších složek, zejména lipidů a proteinů^{2,5}.

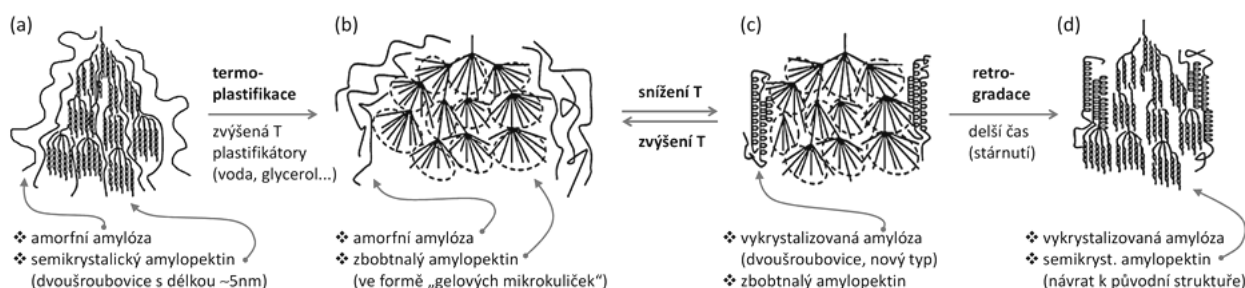
Z hlediska nadmolekulární struktury je škrob semikrystalický polymer (krystalinita 20–45 %), ovšem jeho struktura je dosti složitá. V nativním škrobu jsou lineární amylosové řetězce amorfni, zatímco rozvětvené amylopektinové řetězce vytvářejí částečně krystalickou strukturu sestávající z orientovaných dvoušroubovic o délce kolem 5 nm (obr. 2a; cit.⁹). Situace ohledně nadmolekulární struktury se ještě dále komplikuje při termoplastifikaci škrobu (obr. 2b–2d), kterou popisujeme v následující sekci. Menší odlišnosti v rámci molekulární i nadmolekulární struktury různých typů škrobu mají zřejmě za následek i různé velikosti a tvary škrobových zrn¹⁰.

3. Plastifikace škrobu

3.1. Teoretická část

Jak bylo popsáno výše, nativní škrob je semikrystalický prášek, jehož polymerní řetězce mají ve srovnání s běžnými syntetickými polymery vyšší molární hmotnost a navíc se uspořádávají do složitějších nadmolekulárních struktur. Nativní škrob netaje – před dosažením teploty tání krystalické fáze dojde k degradaci. Nejedná se tudíž o standardní termoplastický polymer⁵. Nicméně smísením s vhodnými nízkomolekulárními látkami (zejména s vodou, která může být kombinována nebo zcela nahrazena glycerolem, kyselinou citronovou, močovinou a dalšími nízkomolekulárními látkami schopnými vytvářet vodíkové můstky) za zvýšené teploty (typicky 60–120 °C) lze nativní práškový škrob plastifikovat a tím převést na termoplastifikovaný škrob (TPS), který už vykazuje vlastnosti termoplastů, jako jsou např. polyolefiny^{5,11}.

Termoplastifikace škrobu (někdy též mazování či želatinizace = gelatinization) je složitý proces, během kterého (a také bezprostředně po něm) dochází k rozsáhlým změnám jeho struktury i vlastností (obr. 2; cit.⁹). V prvním kroku dosáhneme smísením s vodou (nebo i jinou vhodnou



Obr. 2. Schématické znázornění strukturních změn při termoplastifikaci škrobu a po ní. Překresleno podle cit.⁹

nízkomolekulární látkou, např. glycerolem) za zvýšené teploty nabotnutí a rozrušení struktury amylopektinových řetězců (obr. 2a → 2b). Ve druhém, bezprostředně následujícím kroku, musí dojít k ochlazení právě vzniklého TPS, při kterém zčásti vykrystalizují dříve amorfni řetězce amylosy (obr. 2b → 2c). Ve třetím, dlouhodobějším kroku dochází k částečné ztrátě vody a přeuspořádání molekul amylopektinu do původních krystalických struktur, přičemž ovšem ve struktuře zbydou dvojšroubovice amylosy z předchozího kroku – tento finální proces se často nazývá retrogradace a dochází k němu zvláště při stárnutí ve vlhku^{5,12,13} (obr. 2c → 2d).

Většina aplikací vyžaduje TPS jako homogenní materiál s minimem neplastifikovaných zrn nebo jejich částí^{4,14}. V technických aplikacích je homogenita TPS důležitou podmínkou při mísení s dalšími polymery a/nebo plnivy (viz dále kap. 3.2.), zatímco v medicínálních aplikacích je homogenita TPS naprosto nezbytná pro dosažení reprodukovatelných výsledků, např. při řízeném uvolňování antibiotik (viz dále kap. 4.3.). Destrukce semikrystalických zrn byla intenzivně zkoumána^{15–20}. Ukázalo se, že daný proces závisí na mnoha faktorech: především na podmínkách termoplastifikace (koncentrace nízkomolekulárních plastifikátorů, intenzita míchání^{9,15,19,20}), dále na použitém plastifikátoru (voda, glycerol aj.^{17,18}), ale i na zdroji škrobu (cereální, hlízový aj.), typu škrobových zrn (A, B, C)^{2,4,10} či typu krystalinity škrobu (která se shodou okolností také často označuje písmeny A, B, C)^{2,21}.

Pokud jde o podmínky termoplastifikace, z hlediska systematického rozdělení procesů je vhodné uvažovat dvě základní kritéria⁹: za prvé podle koncentrace nízkomolekulárních plastifikátorů (zejména vody; odtud termín moisture content = MC) rozlišujeme plastifikaci při nízkém a vysokém MC (low-MC a high-MC gelatinization) a za druhé podle intenzity míchání rozlišujeme plastifikaci při nulových, nižších nebo vyšších střižných silách (shearless, low-shear a high-shear stress gelatinization). Ve většině dosavadních prací byla používána jednokroková metoda termoplastifikace a to buď (i) mísení ve vodném prostředí (solution casting = SC; tj. obecně vyšší MC, nižší střižné síly; cit.^{22–28}) nebo (ii) mísení v tavenině (melt-mixing = MM; tj. obecně nižší MC, vyšší střižné síly; cit.^{29,30}). Autoři většinou dospěli k makroskopicky homogennímu TPS, ale z mikroskopického hlediska zpravidla nebyla homogenita materiálu dokonalá, což potvrdily i naše výsledky diskutované v následující kapitole.

3.2. Výsledky z ÚMCH: reprodukovatelná příprava vysoce homogenního TPS

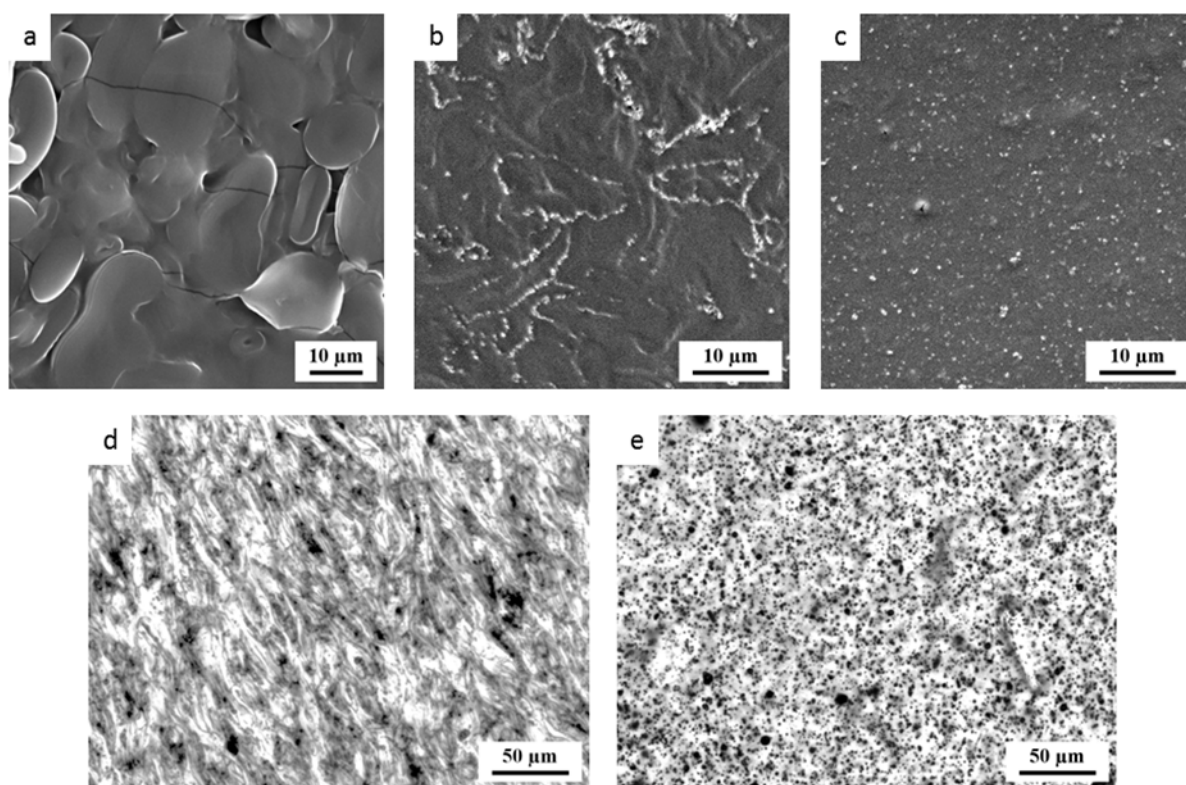
Hledáním jednoduché, spolehlivé a reprodukovatelné metody přípravy vysoce homogenního termoplastifikovaného škrobu jsme se zabývali i na Ústavu makromolekulární chemie (dále ÚMCH). V naší práci⁶ jsme ukázali, že nejlepších výsledků lze dosáhnout dvoukrokovým postupem, při kterém kombinujeme mísení ve vodném prostředí (SC) a následně mísení v tavenině (MM). Pokud použijeme pouze MM, dostáváme makroskopicky homogenní

materiál, ale pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) lomových ploch lze ukázat, že takto připravený TPS vždy ve větší či menší míře obsahuje oblasti s neplastifikovanými zrny (obr. 3a), které se nepodařilo zcela eliminovat ani změnou podmínek mísení (teplota, otáčky, opakované mísení aj.), ani změnou či kombinováním plastifikátorů (voda, glycerol aj.). Pokud použijeme pouze SC, lze sice dosáhnout homogenní struktury, v níž nejsou neplastifikovaná zrna patrná, ale přidané plnivo (v našem případě mikročástice TiO₂) má tendenci se hromadit mezi zbotnalými plastifikovanými zrny a téměř neproniká dovnitř (obr. 3b a 3d). Hlavním přínosem našich experimentů⁶ bylo zjištění, že dokonale homogenní TPS lze spolehlivě a reprodukovatelně připravit vhodnou kombinací obou postupů, tj. (SC+MM): v prvním kroku (SC) škrobová zrna v nadbytku vody dokonale zbotnají (takže nezůstanou oblasti neúplně plastifikovaných zrn, které jsou typické pro mísení v tavenině), a v následujícím kroku (MM) se rozruší hranice mezi zbotnalými zrny, což se projeví mj. velmi dobrou a rovnoměrnou distribucí plniv (srovnej obr. 3b vs. 3c a 3d vs. 3e). Technické detaily (nalezené optimální podmínky SC a MM pro dokonalou termoplastifikaci) a podrobnější charakterizaci morfologie a vlastností výsledných produktů (TPS a jeho kompozitů s mikro- a nanočásticemi na bázi TiO₂) lze dohledat přímo v původní práci⁶.

4. Využití termoplastifikovaného škrobu

4.1. Technické aplikace

Zhruba od devadesátých let minulého století je v ohnisku zájmu všech odvětví průmyslu adaptovat takové technologie, které v co nejmenší míře poškozují životní prostředí. V oblasti průmyslu plastů se zmíněný trend projevil zvýšeným zájmem o přírodní biodegradovatelné polymery, z nichž nejvíce využívaný je škrob (často v termoplastifikované formě) a jeho směsi (obr. 1). V zemědělství se kupříkladu rozšířilo využívání mulčovací biodegradovatelných fólií, kde se hojně využívá TPS díky své nízké ceně³¹. Zajímavé je využití TPS fólie plastifikované močovinou, která v průběhu degradace slouží jako hnojivo³². Rozsáhlé je též využití škrobu i TPS v oblasti obalové techniky, kde řada prací popisuje environmentálně přijatelné obaly³³, obaly s antimikrobiálními vlastnostmi³⁴ nebo TPS kompozity s vhodnými nanoplňivy^{23,35,36}. Velmi významnou aplikační oblastí je potravinářský průmysl, protože škrob je jednou z hlavních složek stravy, mj. jako klíčová část mouky. Škrob se v potravinářství využívá jak v neplastifikované formě, zejména pro úpravu funkčních vlastností potravin, jako je zahušťování či úprava textury^{3,11}, tak ve formě tepelně modifikovaného škrobu (pre-gelatinized starch), který bývá složkou tzv. instantních potravin (instantní polévky, omáčky aj.)³⁷. Tematika škrobů v potravinářství je tak rozsáhlá, že zde uvedeme již jen dva nedávné souborné články^{26,38}. Z dalších významnějších aplikací škrobu (zpravidla v ne-



Obr. 3. Morfologie termoplastikovaného škrobu (TPS) a jeho kompozitu s 3 % TiO_2 mikročástic (TPS/ TiO_2), připraveného pomocí mísení v tavenině (MM), mísení ve vodném prostředí (SC) a kombinací obou zmíněných metod (SC+MM). (a–c) SEM mikrofotografie lomových ploch připravených v kapalném dusíku: (a) čistý TPS připravený pomocí MM, (b) TPS/ TiO_2 připravený pomocí SC a (c) TPS/ TiO_2 připravený pomocí SC+MM. (d–e) LM mikrofotografie tenkých řezů: (d) TPS/ TiO_2 připravený pomocí SC a (e) TPS/ TiO_2 připravený pomocí SC+MM. (SEM = rastrovací elektronová mikroskopie, zobrazování pomocí sekundárních elektronů; LM = světelná mikroskopie, prošlé světlo)

plastifikované, ale často i v plastifikované formě) lze jmenovat kupříkladu textilní průmysl (úprava tkanin³⁹), papírenství⁴⁰, kosmetiku a hygienu (dětské pleny, hygienické vložky⁴¹), farmaceutický průmysl (škrub jako plnivo, pojiivo či rozvolňovadlo³) a dokonce i těžební průmysl⁴⁰. Pro TPS můžeme ještě zmínit využití jeho adhezivních a lepicích účinků⁴², nebo i méně obvyklé využití v oblasti optoelektroniky a ohebných displejů²⁵ a dokonce i v laserové technice, kde použití škrobu může v určitých systémech zvýšit fotostabilitu laserové emise⁴³.

4.2. Medicinální aplikace

Škrub je považován za velmi perspektivní materiál pro biomedicínální aplikace, což dokládá neobvykle vysoké množství publikací, ze kterých zde vybíráme kvůli stručnosti jen menší část – zaměřujeme se zejména na nejnovější práce a/nebo práce reprezentující klíčové výzkumné směry. Velmi aktuální práce²⁸ shrnuje, že TPS pro medicínální účely se využívá v mnoha formách, např. jako hydrogel⁴⁴, porézní mikrokuličky⁴⁵, mikročástice⁴⁶, nanočástice^{47–49}, porézní materiál⁵⁰ nebo nanovlákna získaná pomocí elektrostatického zvlákňování (electrospinning)^{51–54}.

Protože samotný TPS je citlivý vůči vodě, relativně obtížně zpracovatelný kvůli vysoké viskozitě a trpí i horšími mechanickými vlastnostmi, používá se ve všech výše uvedených formách často ve směsích či kompozitech³⁵; velmi často ve směsích s poly(ϵ -kaprolaktonem) (PCL)⁵⁵, ale i ve více-složkových směsích zahrnujících např. PCL a poly(mléčnou kyselinu) (PLA)⁴⁷, v kompozitech s neplastifikovaným škrobem či celulosou²⁸, v kompozitech s anorganickými nanoplnivými⁵⁶ nebo i s fluorescenčními nanočásticemi⁴⁹. Kvůli optimalizaci vlastností se často používá modifikovaný škrub, přičemž nejčastějším způsobem modifikace je esterifikace, která mj. snižuje rychlost hydrolýzy a biodegradace^{57–59}. Ve většině biomedicínálních aplikací je ve škrobu dispergováno též léčivo, které se uvolňuje v závislosti na změně určitého stimulu, jako je pH (cit.⁴⁸), zbotnění materiálu⁴⁵, enzymatická reakce⁴⁶ nebo teplota⁴⁴. Významnou roli při rychlosti uvolňování léčiva z některých systémů hraje i morfologie⁵², což se potvrdilo i v naší práci (viz následující sekce). Kromě využití TPS složky jako nosiče léčiva ovšem autoři často uvažují o využití TPS směsí a kompozitů v oblasti tkáňového inženýrství^{50,51,53–55,60,61}.

4.3. Výsledky z ÚMCH: systémy pro řízené uvolňování antibiotik na bázi TPS

Spolehlivou metodu přípravy vysoce homogenního TPS (viz kap. 3.2.) jsme na ÚMCH začali vyvíjet zejména kvůli potenciálním medicínám aplikacím. Ukázalo se, že dvoukroková metoda přípravy umožňuje nejen homogenní dispergaci anorganických plniv (jak je ukázáno na obr. 3c a 3e a doloženo v naší práci⁶), ale i velmi rovnoměrné smísení škrobu s vybranými typy antibiotik (ATB), která ovšem musí být odolná vůči vyšším teplotám používaným při dvoukrokové modifikaci (SC+MM; popis v kap. 3.2., max. teploty zpracování ~120 °C). Mezi často používaná a přitom dostatečně tepelně odolná ATB patří zejména cykliny (např. tetracyklin), aminoglykosidická antibiotika (např. gentamicin) a glykopeptidová antibiotika (např. vankomycin). V prvním kroku (SC) dojde k promísení škrobu a vodného roztoku ATB a ve druhém kroku (MM) dojde k finální homogenizaci systému. Rychlost uvolňování antibiotika můžeme v širokém rozmezí řídit tím, že smísíme TPS s dalším, pomaleji biodegradovatelným polymerem poly(ϵ -kaprolaktonem) (PCL). Nejvyšší rychlosti uvolnění ATB, řádově hodiny až jednotky dní, dosáhneme pro systémy s vyšším obsahem TPS (taková rychlost je žádoucí zejména při silných lokálních infekcích jako je osteomyelitida). Při stoupajícím podílu PCL se rychlost uvolňování antibiotika postupně snižuje až na týdny a měsíce. Výše uvedené poznatky se staly základem českého patentu⁷ (řízení související s mezinárodní přihláškou vynálezu právě probíhá).

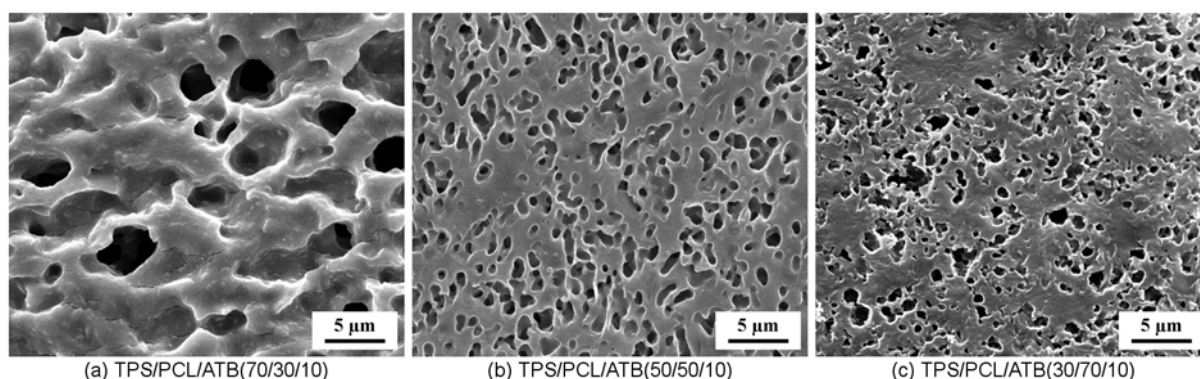
Fázová struktura připravených systémů TPS/PCL/ATB je ukázána na SEM mikrofotografiích (obr. 4). V závislosti na složení (a do jisté míry i změnou podmínek mísení v tavenině) dokážeme řídit strukturu směsí, přičemž škrobová složka (která byla při přípravě vzorků odleptána, takže při zobrazení pomocí sekundárních elektro-

nů v SEM se projeví jako díry na zobrazené ploše) postupně mění svoji morfologii z kontinuální (obr. 4a) na částečně kontinuální (obr. 4b) a částicovou neboli diskrétní (obr. 4c). Pomocí UV/Vis spektroskopie jsme prokázali, že se snižováním kontinuity škrobové fáze drasticky klesá rychlost uvolňování ATB. Podrobnější SEM experimenty kombinující zobrazování (SE a BSE imaging) a mikroprvkovou analýzu (EDX analysis) poskytly důkaz, že v případě částečně kontinuální nebo diskrétní morfologie škrobové fáze dochází k difuzi ATB přes PCL fázi porušenou zbotnáním škrobu. V tuto chvíli probíhá *in vitro* testování systémů TPS/PCL/ATB ve Fakultní nemocnici v Motole a průběžné výsledky ukazují, že použité ATB (vankomycin) nebylo v průběhu plastifikace porušeno a uchovalo si svoji antibakteriální aktivitu.

Systémy PCL/TPS/ATB se zdají být velmi perspektivními materiály pro léčbu silných lokálních infekcí v oblasti skeletu, jejichž typickým zástupcem je osteomyelitida. Ve srovnání s běžně používanými materiály pro danou aplikaci (kostní cement a fibrinové pěny s přídavkem ATB) vykazují lepší mechanické vlastnosti (lepší tvarovatelnost než kostní cement, větší pevnost než fibrinové pěny) a zejména možnost pomocí jejich morfologické struktury efektivně řídit rychlost uvolňování ATB.

5. Souhrn

Škrob je nepoužívanější přírodní biodegradovatelný polymer, který je relativně snadno dostupný z obnovitelných zdrojů, neboť se ukládá v zásobních orgánech rostlin ve formě škrobových zrn. Po extrakci z vhodných rostlin získáme tzv. nativní, práškový škrob (prášek sestávající z granulí – resp. zrn škrobu); struktura a vlastnosti práškového škrobu byly již v české literatuře popsány^{2,3}. Tento příspěvek se soustředí na popis přípravy



Obr. 4. SEM mikrofotografie polymerních systémů TPS/PCL/ATB, kde TPS = termoplastifikovaný škrob, PCL = poly(ϵ -kaprolakton) a ATB = antibiotikum vankomycin. Vzorky pro SEM byly připraveny řezáním a vyhlazením v kapalném dusíku, po kterém následovalo odleptání škrobové fáze. Mikrofotografie ukazují, jak lze složením řídit morfologii, přičemž struktura TPS fáze se mění z kontinuální (a), přes částečně kontinuální (b) až na diskrétní (c); SEM zde označuje rastrovací elektronovou mikroskopii, zobrazování v režimu sekundárních elektronů

a aplikací termoplastifikovaného škrobu (TPS), který na rozdíl od práškového škrobu (který se při vyšších teplotách rozkládá) vykazuje vlastnosti běžných termoplastických polymerů. Kromě stručného přehledu literatury uvádíme i naše vlastní nedávno publikované výsledky, které se týkají spolehlivého a reprodukovatelného způsobu přípravy vysoce homogenního TPS (kap. 3.2.) a jeho následného využití v systémech pro řízené uvolňování antibiotik (kap. 4.3.).

Vypracováno s podporou MŠMT ČR, Národní program udržitelnosti I (NPU I), projekt POLYMAT LO1507.

LITERATURA

1. *European Bioplastics*. <http://www.europeanbioplastics.org/bioplastics/materials/>, staženo 27. března 2018.
2. Šárka E., Bubník Z.: *Chem. Listy* 104, 318 (2010).
3. Šárka E., Smrčková P., Seilerová L.: *Chem. Listy* 107, 929 (2013).
4. Bertolini A. C.: *Starches: Characterization, Properties, and Applications*. Taylor and Francis Group, Boca Raton 2010.
5. Nafchi A. M., Moradpour M., Saeidi M., Alias A. K.: *Starch/Stärke* 65, 61 (2013).
6. Ostafinska A., Mikesova J., Krejčíková S., Nevoralova M., Sturcova A., Zhigunov A., Michalkova D., Slouf M.: *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 273 (2017).
7. Šlouf M., Kruliš Z., Ostafinska A., Nevoralová M., Krejčíková S., Horák P., Pokorný D., Jahoda D., Fulín P.: CZ 307056 B6.
8. Nada S. S., Zou W., Li C., Gilbert R. G.: *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 6813 (2017).
9. Liu H., Xie F., Yu L., Chm L., Li L.: *Prog. Polym. Sci.* 34, 1348 (2009).
10. Ao Z., Jane J. L.: *Carbohydr. Polym.* 67, 46 (2007).
11. Šárka E., Dvořáček V.: *J. Food Eng.* 206, 77 (2017).
12. Soest J. J. G., Hulleman S. H. D., Wit de D.: *Ind. Crops. Prod.* 5, 11 (1996).
13. Smits A. L. M., Ruhnau F. C., Vliegthart J. F. G., Soest U., Soest J. J. G.: *Starch/Stärke* 50, 478 (1998).
14. Visakh P. M., Mathew. A. P., Oksman K., Thomas S., v knize: *Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials*, (Habibi Y., Lucia L. A., ed.), str. 287. J. Wiley, New Jersey 2012.
15. Aichholzer W., Fritz H.-G.: *Starch/Stärke* 50, 77 (1998).
16. Huang M., Yu J., Ma X.: *Polym. Degrad. Stabil.* 90, 501 (2005).
17. Pushpadass H., Marx D. B., Hanna M. A.: *Starch/Stärke* 60, 527 (2008).
18. Dai H., Chang P., Yu J., Ma X.: *Starch/Stärke* 60, 676 (2008).
19. Li G., Sarazin P., Favis B. D.: *Macromol. Chem. Phys.* 209, 991 (2008).
20. Xie F., Halley P. J., Averous L.: *Prog. Polym. Sci.* 37, 595 (2012).
21. Buleon A., Gallant D. J., Bouchet B., Mouille G., D'Hulst C., Kossmann J., Ball S.: *Plant Physiol.* 115, 949 (1997).
22. Campos A., Senta Neto A. R., Rodrigues V. B., Luchesi B. R., Moreira F. K. V., Correa A. C., Mattoso L. H. C., Marconcini J. M.: *Carbohydr. Polym.* 175, 330 (2017).
23. Dufresne A., Castano J.: *Starch/Stärke* 69, 1500307 (2017).
24. Guz L., Candal R., Goyanes S.: *Carbohydr. Polym.* 157, 1611 (2017).
25. Javanbakht S., Namazi H.: *Carbohydr. Polym.* 176, 220 (2017).
26. Liu S., Li X., Chen L., Li L., Li B., Zhu J.: *Int. J. Biol. Macromol.* 104, 1330 (2017).
27. Pelissari F. M., Andrade-Mahecha M. M., Amaral Sobral P. J., Menegalli F. C.: *J. Colloid Interface Sci.* 505, 154 (2017).
28. Ali A., Xie F., Yu L., Liu H., Meng L., Khalid S., Chen L.: *Compos. Pt. B-Eng.* 133, 122 (2018).
29. Olivato J. B., Marini J., Yamashita F., Pollet E., Grossmann M. V. E., Averous L.: *Mater. Sci. Eng., C* 70, 296302 (2017).
30. Campos-Requena V. H., Rivas B. L., Perez M. A., Figueroa C. R., Figueroa N. E., Sanfuentes E. A.: *Postharvest Biol. Technol.* 129, 29 (2017).
31. Tan Z., Yi Y., Wanf H., Zhou W., Yang Y., Wang C.: *Appl. Sci.* 6, 147 (2016).
32. Rychter P., Kot M., Bajér K., Rogacz D., Šišková A., Kapušniak J.: *Carbohydr. Polym.* 137, 127 (2016).
33. Kuswandi B.: *Environ. Chem. Lett.* 15, 205 (2017).
34. Mlalila N., Hilonga A., Swai H., Devlieghere F., Ragaert P.: *Trends Food Sci. Technol.* 74, 1 (2018).
35. Xie F., Pollet E., Halley P. J., Averous L.: *Prog. Polym. Sci.* 38, 1590 (2013).
36. Kelnar I., Kaprálková L., Brožová L., Hromádková J., Kotek J.: *Ind. Crops Prod.* 46, 186 (2013).
37. Šárka E., v knize: *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin* (Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., ed.), str. 501, Key Publishing, Ostrava 2012.
38. Zhu F.: *Food Chem.* 229, 329 (2017).
39. Li W., Xu Z., Wang Z., Liu X., Li C., Ruan F.: *Int. J. Adhes. Adhes.* 84, 101 (2018).
40. Kodet J., Babor K.: *Modifikované škroby, dextriny a lepidla*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1991.
41. Teli M. D., Mallick A.: *J. Polym. Environ.* 26, 1393 (2018).
42. Wang Y., Xiong H., Wang Z., Din Z. U., Chen L.: *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 819 (2017).
43. Cyprych K., Sznitko L., Mysliwiec J.: *Org. Electron.* 15, 2218 (2014).
44. Poorgholy N., Massoumi B., Jaymand M.: *Int. J. Biol. Macromol.* 97, 654 (2017).
45. Fontes G. C., Calado V. M. A., Rossi A. M., Rocha-Leao M. H. M.: *Biomed. Res. Int.* 2013, 472626.

46. Balmayor E. R., Tuzlakoglu K., Marques A. P., Azevedo H. S., Reis R. L.: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1617 (2008).
47. Davoodi S., Oliaei E., Davachi S. M., Hejazi I., Seyfi J., Heidari B. S., Ebrahimi H.: *RSC Adv.* **6**, 39870 (2016).
48. Yang J., Fang L., Man L., Zhang S., Liu J., Liang C., Sun Q., Xiong L.: *Carbohydr. Polym.* **173**, 223 (2017).
49. Shi Y., Xu D., Liu M., Fu L., Wan Q., Mao L., Dai Y., Wen Y., Zhang X., Wei Y.: *Mater. Sci. Eng., C* **82**, 204 (2018).
50. Neves M. N., Kouyumdzhev A., Reis R. L.: *Mater. Sci. Eng.* **25**, 195 (2005).
51. Liu G., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Li C.: *J. Controlled Release* **252**, 95 (2017).
52. Tang S., Zhao Z., Chen G., Su Y., Lu L., Li B., Liang D., Jin R.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **77**, 594 (2016).
53. Waghmare V. S., Wadke, P. R., Dyawanapelly S., Deshpande A., Jain R., Dandekar P.: *Bioactive Mater.* **3**, 255 (2018).
54. Hemamalini T., Giri Dev V. R.: *Int. J. Biol. Macromol.* **106**, 712 (2018).
55. Ghavimi S. A. A., Ebrahimzadeh M. H., Shokrgozar M. A., Solati-Hashjin M., Osman N. A. A.: *Polym. Test.* **43**, 94 (2015).
56. Schmitt H., Creton N., Prashantha K., Soulestin J., Lacrampe M. F., Krawczak P.: *Polym. Eng. Sci.* **55**, 573 (2015).
57. Rodrigues A., Emeje M.: *Carbohydr. Polym.* **87**, 987 (2012).
58. Masina N., Choonara Y. E., Kumar P., Toit L. C., Govender M., Indermun S., Pillay V.: *Carbohydr. Polym.* **157**, 1226 (2017).
59. Khlestkin V. K., Peltek S. E., Kolchanov N. A.: *Carbohydr. Polym.* **181**, 460 (2018).
60. Mendes S. C., Reis R. L., Bovell, Y. P., Cunha, A. M., van Blitterswijk C. A, de Bruijn J. D.: *Biomaterials* **22**, 2057 (2001).
61. Li X., Ciu R., Sun L., Aifantis K. E., Fan Y., Feng Q., Cui F., Watari F.: *Int. J. Polym. Sci.* **2014**, 13.

S. Krejčíková, A. Ostafinska, and M. Šlouf
(Department of Polymer Morphology, Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Prague): Thermoplastic Starch and its Applications

Starch is the most widely used bio-based biodegradable polymer. This contribution briefly reviews basic information about natural starch and focuses on preparation, properties and applications of thermoplasticized starch (TPS). We present a literature review and, in addition, we show our recent results: the reliable and reproducible preparation method yielding highly homogeneous TPS and the TPS-based blends for local controlled release of antibiotics.

Keywords: starch, thermoplasticization, gelatinization, applications, controlled drug release

EXOPOLYSACHARIDY AKO VÝZNAMNÉ PRODUKTY PROBIOTÍK

**MONIKA FEDOROVÁ^a, MARIÁN PROKEŠ^b,
JURAJ PISTL^c a RADOMÍRA NEMCOVÁ^c**

^a Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie, ^b Katedra epizootológie a parazitológie, ^c Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
marian.prokes@uvlf.sk

Došlo 9.1.18, prijaté 9.2.18.

Kľúčové slová: exopolysacharidy, biofilm, baktérie mliečneho kvasenia, probiotické baktérie

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečneho kvasenia
3. Účinky exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečneho kvasenia
 - 3.1. Anti-adhezívne vlastnosti exopolysacharidov (anti-biofilm activity)
 - 3.2. Prebiotické vlastnosti izolovaných exopolysacharidov
 - 3.3. Vplyv exopolysacharidov na prospešné/patogénne baktérie tráviaceho traktu
4. Záver

1. Úvod

V priebehu rokov sa empiricky prišlo na to, že konzumácia určitých potravín, ako sú mliečne produkty prirodzene obsahujúce mikroorganizmy, pozitívne ovplyvňuje zdravotný stav organizmu. To vedie k zámernému užívaniu prospešných baktérií, či už prostredníctvom potravín, doplnkov stravy alebo liekov, čo má pozitívny vplyv na celkový zdravotný stav a pohodu hostiteľa. Tieto prospešné mikroorganizmy, známe ako probiotiká, sú definované Svetovou zdravotníckou organizáciou ako „živé mikroorganizmy, ktoré ak sú podávané v primeranom množstve, poskytujú zdravotné výhody hostiteľovi“^{1–3}. Prebiotiká sú nestráviteľné zložky potravy, ktoré podporujú rast a životaschopnosť probiotík. V súčasnej dobe sú dostupné informácie o probiotických baktériách a ich účinkoch. Zároveň sa zisťuje, že nielen samotné druhy baktérií, ale aj rôzne

d ďalšie faktory, ako napr. ich schopnosť tvorby exopolysacharidov, biofilmov a podobne, vo významnej miere ovplyvňujú pozitívny účinok probiotík. Probiotické baktérie sú schopné produkovať rôzne biologicky aktívne látky, z ktorých sa venuje popredná pozornosť najmä exopolysacharidom pre ich významné mnohostranné účinky aj na makroorganizmus⁴.

2. Charakteristika exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečneho kvasenia

Skupina baktérií mliečneho kvasenia pozostáva z grampozitívnych baktérií so spoločnými morfológickými, fyziologickými a metabolickými vlastnosťami. Ide o nesporujúce, fakultatívne anaeróbne alebo mikroaerotolerantné koky alebo paličky, ktoré fermentujú sacharidy za vzniku kyseliny mliečnej, prípadne ďalších metabolitov⁵.

Polysacharidy (PS) sú biopolyméry široko rozšírené v prírode. Ich výskyt je zdokumentovaný vo všetkých organizmoch (zvieratá, rastliny, huby a baktérie), rovnako ako aj ich biologické funkcie, ako je skladovanie energie (škrob), štruktúra bunkovej steny (celulóza) či mobilná komunikácia (glykozaminoglykány). Tieto makromolekuly majú vysokú molekulovú hmotnosť, ktorá niekedy dosahuje až niekoľko miliónov Daltonov; môžu byť substituované necukornými substituentami, pričom dosahujú lineárne alebo rozvetvené štruktúry, ktoré vedú napr. k ich špecifickému správaniu v roztoku.

Polysacharidy produkované mikroorganizmami môžu byť klasifikované do troch hlavných skupín podľa ich umiestnenia v bunke:

- cytozolové polysacharidy (poskytujú uhlík a energiu pre bunku);
- polysacharidy tvoriace bunkové steny (peptidoglykány, teichoové kyseliny a lipopolysacharidy);
- polysacharidy uvoľňované do extracelulárneho prostredia vo forme kapsúl alebo biofilmu, známe ako exopolysacharidy⁶.

Exopolysacharidy (EPS) sú umiestnené v extracelulárnom médiu bez kovalentného ohraničenia bakteriálnou membránou. Medzi popisované úlohy EPS patrí napr. ochrana bakteriálnych povrchov, pri interakciách s inými bakteriálnymi povrchmi slúžia ako substrát či lepidlá, ako ochranné prostriedky proti vonkajšiemu prostrediu, ako látky pre bakteriálne agregácie v rhizosfére, ako stavebné stabilizátory v biofilme, či ako signálne molekuly⁷. Niektoré bakteriálne polyméry sú využívané ako aditíva v potravinárskom priemysle (xantán, gellán a curdlán)^{6,8,9}.

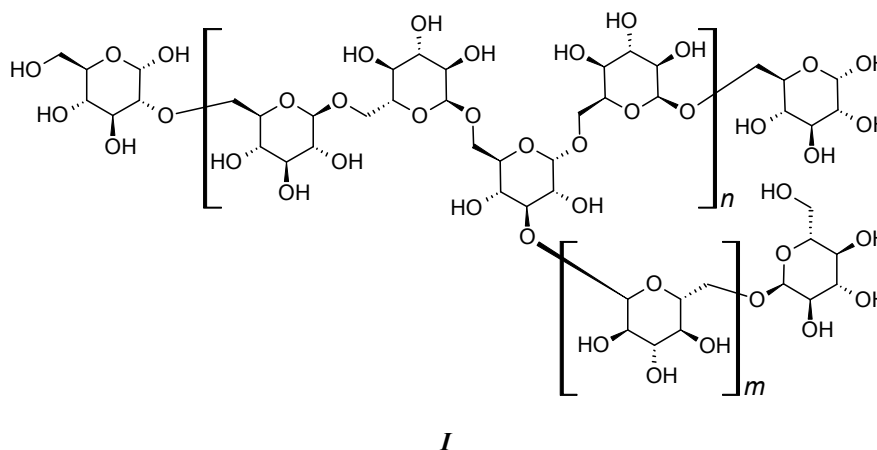
Približne 30 druhov laktobacilov je opísaných ako producenti EPS. Medzi nimi sú najznámejšie *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, atď. (cit.⁷).

Rozoznávame exopolysacharidy vylučované do prostredia (r-EPS – Released Exopolysaccharides) a exopolysacharidy viazané k stene bunky (c-EPS – Cell-Bound Exopolysaccharides). EPS produkované u niektorých probiotických kmeňov znázorňuje tab. I. Podľa zloženia sa EPS delia do dvoch skupín: homopolysacharidy (homo-EPS) a heteropolysacharidy (hetero-EPS). Homo-EPS sú tvorené z jedného typu monosacharidu, ako napríklad dextrán **I** (obr. 1) alebo leván **II** (obr. 2), kým hetero-EPS sú zložené z rôznych typov monosacharidov^{6,10,11}.

Homopolysacharidy

Medzi dve dôležité skupiny homo-EPS produkovaných baktériami mliečneho kvasenia patria: 1. α -glukány, pozostávajúce hlavne z α -1,6- a α -1,3-viazaných glukózových jednotiek; napríklad dextrány **I** produkované *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* a mutány produkované *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*; a 2. fruktány, zložené prevažne z β -2,6-viazaných molekúl fruktózy, ako je napríklad leván produkovaný *Streptococcus salivarius*.

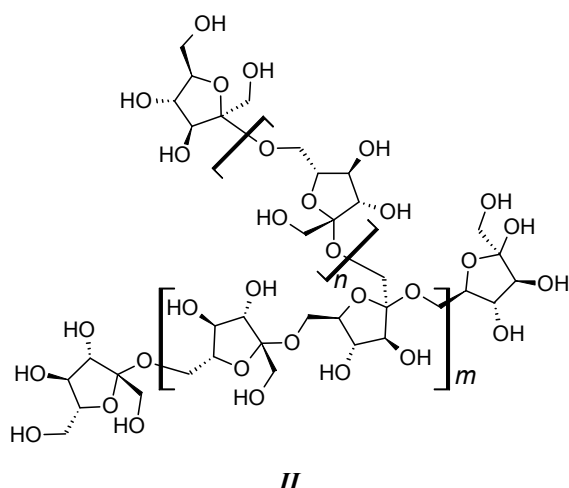
Spoločným znakom všetkých dextránov je prevaha α -1,6-väzby s vetvením v polohách 2, 3, alebo 4 (cit.²⁵). Niektoré kmene *Leuconostoc mesenteroides*²⁶ a *Lactobacillus curvatus*²⁷ sú uvádzané ako dextrán **I** produkujúce kmene. Mután **III** (obr. 3) je glukán syntetizovaný rôznyi-



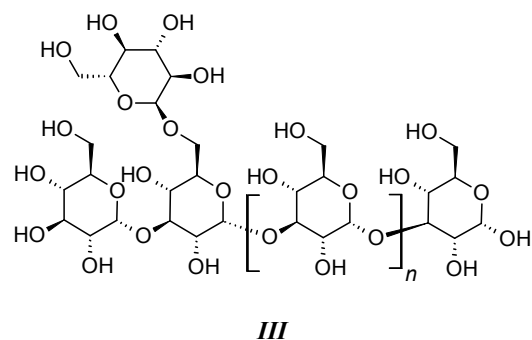
Obr. 1. Millsov vzorec dextránu **I**

Tabuľka I
Produkcia r-EPS a c-EPS u niektorých probiotických kmeňov

Kmeň	EPS	Lit.
<i>Lactobacillus plantarum</i> 70810	r-EPS	12,13
<i>L. acidophilus</i> A4	r-EPS	14
<i>Enterobacter cloacae</i> (číslo GenBank, GQ426323)	r-EPS	15
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> AD011	r-EPS	16
<i>L. reuteri</i> SK24.003	r-EPS	17
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WR-1	r-EPS	18
<i>Streptococcus macedonicus</i> Sc 136	r-EPS	19
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1	r-EPS	20
<i>L. brevis</i> KB290	c-EPS	21,22
<i>L. acidophilus</i> 606	c-EPS	23
<i>L. plantarum</i> EP56	c-EPS	24

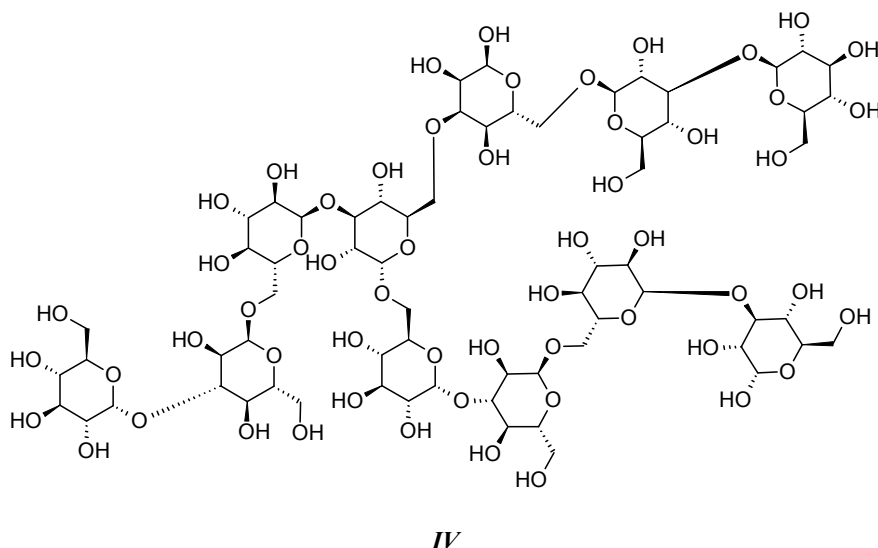
Obr. 2. Millsov vzorec levánu **II**

mi sérotypmi *Streptococcus mutans*, a líši sa od dextránu tým, že obsahuje vysoké percento α -1,3-väzieb. Rozdiely v dôsledku rozpustnosti vyplývajú z pomeru rôznych typov väzieb; vo vode rozpustné glukány sú bohaté na α -1,6-väzby, pričom vo vode nerozpustné glukány sú bohaté na α -1,3-väzby²⁵. Požitie mutánov bolo spojené so zubným kazom, pretože nerozpustné mutány môžu adherovať na zuby, a tým pomáhať mikroorganizmom zostať na povrchu zubov. Alternán **IV** (obr. 4) má alternatívne α -1,6- a α -1,3-väzby, a táto štruktúra je zodpovedná za jeho charakteristické fyzikálne vlastnosti, vrátane vysokej rozpustnosti a nízkej viskozity. Leván **II** je EPS vyrábaný zo sacharózy, ide o fruktán zložený z β -2,6-viazaných molekúl fruktózy

Obr. 3. Millsov vzorec mutánu **III**

s niektorými β -2,1-väzbami. Inulín je fruktán zložený z β -2,1-viazaných molekúl fruktózy s niektorými β -2,6-spojenými vetvami produkovaný napr. *Streptococcus mutans*. Inulín produkovaný baktériami sa líši od inulínu rastlinného pôvodu svojou rozvetvenou štruktúrou a výrazne vyššou molekulovou hmotnosťou. *Streptococcus salivarius*²⁸, *Leuconostoc mesenteroides*²⁹ a *Lactobacillus reuteri*³⁰ sú leván **II** produkujúce baktérie mliečneho kvasenia. *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 produkuje fruktán³¹.

Medzi lineárne homopolysacharidy patria napr. pullulán (zložený z glukózy tvoriacej maltotriózové opakujúce sa jednotky) a curdlán (nerozpustný, zložený z 400–500 D-glukózových zvyškov spojených β -(1 $\rightarrow$ 3)-glykozidickými väzbami)⁶. *Lactobacillus amylophilus* produkuje pullulán³² a curdlán je produkovaný *Agrobacterium* spp.³³.

Obr. 4. Millsov vzorec alternánu **IV**

Heteropolysacharidy

Heteropolysacharidy sú zložené z pravidelne sa opakujúcich jednotiek 3–8 rôznych sacharidových skupín syntetizovaných zvyčajne vo vnútri bunky^{6,10}. Sú zložené z rôznych typov monosacharidov, predovšetkým D-glukózy, D-galaktózy, L-rhamnózy a ich derivátov¹¹. Preukazujú malú štruktúrnú podobnosť a ich produkcia je ovplyvnená bakteriálnym rastom, jeho fázou, zložením média (zdroj uhlíka a dusíka), pH a teplotou³⁴; môžu byť produkované *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp., pričom zohrávajú kľúčovú úlohu v potravinárskom priemysle³⁵. Medzi kmene baktérií mliečneho kvasenia produkujúce hetero-EPS patria *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. kefirifaciens* a iné (cit.¹¹).

3. Účinky exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečneho kvasenia

Okrem technologických výhod ako je zlepšenie reologických vlastností fermentovaných potravín (viskozita a pružnosť), ďalej ich možné využitie ako prírodné zahusťovadlá, emulgátory, látky na tvorbu gélov, fyzikálne stabilizátory a pod., majú EPS syntetizované baktériami mliečneho kvasenia priaznivé fyziologické účinky na zdravie a opísané sú najmä ich protinádorové, antivredové, imunomodulačné účinky, či schopnosť znižovať hladinu cholesterolu^{11,36,37}.

Imunomodulačné účinky a najmä ich interakcie s črevnými epiteliálnymi bunkami boli popísané u EPS (vyučovaných do ich okolitého prostredia počas rastu) izolovaných z *Lactobacillus acidophilus* ssp. 5e2 a *Lactobacillus helveticus* ssp. Rosyjski³⁸. Shao a spol.³⁹ potvrdili potenciálnu imunomodulačnú aktivitu EPS kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* KF5 stimuláciou splenocytovej proliferácie *in vitro*. Boli potvrdené imunostimulačné účinky EPS produkovaných *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) (cit.²⁰).

Výsledky naznačujú, že c-EPS produkovaný *L. plantarum* 70810 môže byť vhodný na použitie do funkčných potravín a prírodných protinádorových liečiv¹². Kim a spol.²³ popísali mechanizmy, ktorými probiotické baktérie indukujú smrť nádorových buniek prostredníctvom autofágie. EPS izolované z *Lactobacillus acidophilus* 606 priamo ovplyvňujú morfológiu buniek a nie bunkový cyklus, čo skúmali na bunkovej línii HT-29 karcinómu hrubého čreva.

Antioxidačné účinky boli preukázané u EPS produkovaných *Pseudomonas fluorescens* WR-1 (cit.¹⁸) a u EPS z probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* (BDU7) z Ngari („Ngari“ je tradičná fermentovaná ryba z Indie), pričom sa uvažuje o jej terapeutickú hodnotu pri liečení žalúdočných vredov⁴⁰.

EPS z *L. rhamnosus* E/N môže byť použitý ako nástroj na odstraňovanie iónov ťažkých kovov z vodného

roztoku, čím sa zabráni ich absorpcii z gastrointestinálneho traktu do krvného obehu. Povrchová adsorpcia kovových iónov na povrchu EPS bola potvrdená snímacou elektrónovou mikroskopiou⁴¹.

3.1. Anti-adhezívne vlastnosti exopolysacharidov (anti-biofilm activity)

Väčšina druhov baktérií produkuje biofilm počas ich rastu v životnom prostredí^{42–44}. Tvorba biofilmu je významným problémom v mnohých oblastiach, od priemyselných korózií a biologického znečistenia⁴⁵, po chronické a nozokomiálne infekcie^{46,47}.

Biofilmy sa podieľajú na viac ako 80 % chronických infekcií spôsobených baktériami, vrátane otitídy, endokarditídy, infekciách močových ciest a pľúc, aj na infekciách u pacientov s cystickou fibrózou^{48,49}.

Biofilmy vyvinuté na prírodných tkanivách (koža, sliznica, endotel, epitel, zuby, kosti) alebo umelých zariadeniach (centrálne žilové, peritoneálne a močové katetre, dentálne materiály, srdcové chlopne, vnútromaternicové antikoncepčné prostriedky, kontaktné šošovky, rôzne typy implantátov) zahŕňajú 60 až 85 % všetkých mikrobiálnych infekcií^{46,50}. Biofilmy sa zároveň môžu podieľať aj na rezistencii baktérií voči antibiotikám.

Biofilm je štruktúrované konzorcium baktérií vložených do samoprodukovanej polymérnej matrice zloženej z polysacharidov, bielkovín a extracelulárnej DNA. Bakteriálne biofilmy sú rezistentné na antibiotiká, dezinfekčné chemikálie, fagocytózu a iné zápalové obranné systémy organizmu. Je známe, že pretrvávajúce stafylokokových infekcií spojených s cudzími telesami je v dôsledku tvorby biofilmu. Rovnako aj chronická infekcia pľúc vyvolaná *Pseudomonas aeruginosa* u pacientov s cystickou fibrózou je spôsobená rastom mukoidných kmeňov biofilmu. Nedochoádza k prechodu živín a kyslíka z vrcholu až na dno biofilmov a u bakteriálnych buniek umiestnených v oblastiach chudobných na živiny dochádza k poklesu metabolickej aktivity. Tieto „spiace bunky“ sú zodpovedné za niektoré tolerance voči antibiotikám. Baktérie v biofilme komunikujú pomocou molekúl, ktoré aktivujú niektoré gény zodpovedné za produkciu faktorov virulencie a do istej miery aj štruktúry biofilmu. Tento jav sa nazýva „quorum sensing“ a závisí od koncentrácie molekúl a počtu baktérií. Sľubne sa v tomto prípade javí použitie zlúčenín, ktoré môžu rozpustiť matricu biofilmu, a použitie inhibítorov „quorum sensing“, ktoré zvyšujú citlivosť biofilmu na antibiotiká a fagocytózu⁴⁷.

Bakteriálne EPS sprostredkujú mnohé interakcie, ktoré sú potrebné pre vytvorenie, súdržnosť a stabilizáciu bakteriálnych biofilmov. Niektoré bakteriálne polysacharidy inhibujú tvorbu biofilmu v širokom spektre baktérií a húb, a to ako *in vitro* aj *in vivo*⁵¹. Bolo preukázané, že bakteriálne interferencie prostredníctvom signálnych molekúl a povrchovo aktívnych látok antagonizujú tvorbu biofilmu, čo naznačuje, že non-antibiotické molekuly produkované počas konkurenčných interakcií medzi baktériami by mohli byť použité na redukcii biofilmu⁵².

Sayem a spol.⁴³ identifikovali PS zložený z jednoduchých monomérnych jednotiek α -D-galaktopyranozyl-(1→2)-glycerol-fosfát, ktorý vykazoval anti-biofilmovú aktivitu proti radu patogénnych a nepatogénnych kmeňov baktérií bez baktericídnych účinkov. Polysacharid bol extrahovaný z kmeňa *Bacillus licheniformis* z morského organizmu *Spongia officinalis*. Ošetrenie abiotických povrchov týmto PS znižuje počiatočnú príľnavosť a vývoj biofilmu u kmeňov ako *E. coli* PHL628 a *Pseudomonas fluorescens*.

Antibiofilmové polysacharidy boli izolované aj zo supernatantov rôznych baktérií mliečného kvasenia. Polysacharid izolovaný zo supernatantov z *L. acidophilus* A4 inhiboval tvorbu biofilmu *E. coli*, *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* a *Bac. cereus* v statickom a prietokovom bunkovom reaktore¹⁴. *L. acidophilus* sa bežne vyskytuje v gastrointestinálnom trakte ľudí a zvierat, ústach a pošve. Zubný kaz vzniká nerovnováhou metabolickej aktivity v zubných biofilmoch, ktoré vznikajú predovšetkým pôsobením *Streptococcus mutans*. Wu a spol.⁵³ analyzovali 64 kmeňov *Lactobacillus salivarius* (vyskytujúci sa v ľudských slinách) a zistili, že dva kmene, K35 a K43, významne inhibujú tvorbu biofilmu *Str. mutans*.

3.2. Prebiotické vlastnosti izolovaných exopolysacharidov

Zvýšený počet bifidobaktérií a/alebo laktobacilov v hrubom čreve má priaznivý účinok na zdravie. Ako prebiotiká boli definované rôzne oligosacharidy, ktoré môžu zvyšovať počty *Bifidobacterium* spp. v hrubom čreve. Galaktooligosacharidy a fruktooligosacharidy sú považované za dôležité prebiotiká. Medzi ďalšie sacharidy považované za prebiotiká patria gluko-oligosacharidy, isomalt-oligosacharidy, laktulóza, mannán-oligosacharidy¹¹.

Exopolysacharidy syntetizované pomocou baktérií mliečného kvasenia majú prebiotické vlastnosti (napr. 2-(1,3)- β -D-glukány) a prispievajú aj k reológii a textúre fermentovaných potravín. Werning a spol.⁵⁴ štandardizovali imunologickú metódu pre špecifickú detekciu 2-substituovaných (1,3)- β -D-glukánov. Metóda umožňuje priamu detekciu a kvantifikáciu tohto EPS v supernatante s obsahom iných mono- a polysacharidov. Metóda umožňuje rýchlu identifikáciu produktov baktérií aj biochemickú charakterizáciu glykozyltransferáz zodpovedných za ich syntézu.

Nie je známe, ktoré oligosacharidy sú najvhodnejšie ako substráty pre selektívny rast konkrétnych prospešných druhov alebo kmeňov. Boli navrhnuté metódy na zistenie potenciálnej prebiotickej aktivity oligosacharidov^{55–57}. α -D-Glukán produkovaný *Lactobacillus plantarum* DM5 môže slúžiť ako potenciálna prebiotická látka pre potravinárske výrobky. Prebiotická aktivita tohto glukánu bola potvrdená zvýšeným rastom probiotických baktérií ako *Bifidobacterium infantis* a *Lactobacillus acidophilus*, pričom nedošlo k rastu patogénnych baktérií ako sú *Escherichia coli* a *Enterobacter aerogenes*⁵⁸.

3.3. Vplyv exopolysacharidov na prospešné/patogénne baktérie tráviaceho traktu

Exopolysacharidy vďaka svojej zvýšenej viskozite v potravinách môžu ostať dlhší čas v gastrointestinálnom trakte, a preto sú prínosom pre prechodnú kolonizáciu probiotickými baktériami^{11,34}.

Interakcie medzi druhmi *Bifidobacterium* a *Bacteroides* v kofementáciách sú ovplyvnené uhlíkovými zdrojmi, vrátane EPS produkovaných bifidobaktériami. Rios-Covian a spol.⁵⁹ poukazujú na význam interakcií s ohľadom na špecifický bakteriálny druh a kmeň. V prítomnosti glukózy bol napríklad rast *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM-2079 inhibovaný *Bifidobacterium breve*, ale nezmenil sa v prítomnosti *Bifidobacterium longum*. *Bacteroides fragilis* DSM-2151 prispel k vyššiemu prežívaniu *Bifidobacterium longum* podporou zmeny v syntéze mastných kyselín s krátkym reťazcom a ďalších organických kyselín v kokultivácii v porovnaní s monokultúrou.

Li a spol.⁶⁰ vo svojej štúdii skúmali antioxidačné a antibakteriálne účinky EPS produkovaných *Bifidobacterium bifidum* WBINO3 (B-EPS) a *Lactobacillus plantarum* R315 (L-EPS). Pre hodnotenie antioxidačnej aktivity bolo použité vychytávanie 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) radikálov, hydroxylových radikálov a superoxidových radikálov. Okrem toho bola meraná inhibícia hemolýzy erytrocytov a peroxidácie lipidov. EPS produkované obidvoma kmeňmi mali silnú schopnosť zachytávať DPPH a superoxidové radikály vo vysokej koncentrácii. Inhibičný účinok B-EPS na hemolýzu erytrocytov bol silnejší ako u L-EPS, zatiaľ čo schopnosť zachytávať hydroxylové radikály bola u L-EPS významne vyššia. Všetky tieto schopnosti boli rozvíjané v závislosti od koncentrácie. Agar difúzny test ukázal, že obe EPS vykazovali antibakteriálne účinky proti testovaným patogénom, ako sú *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* a *Shigella sonnei*. Možno povedať, že oba EPS majú antimikrobiálne a antioxidačné účinky a môžu byť aplikované v potravinárskom priemysle⁶⁰.

4. Záver

Zvýšený záujem sa v súčasnosti orientuje na produkty prospešných (probiotických) baktérií, ktoré sú schopné rozrušovať, prípadne eradikovať biofilmy patogénnych baktérií s perspektívou použitia vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle ako alternatíva antibiotík. Medzi takéto produkty s antibiofilmovou aktivitou patria EPS. Významné sú aj ich imunostimulačné a ďalšie zdravie prospešné účinky, či možné využitie pre zlepšenie vybraných vlastností fermentovaných potravín. Výskum uvedených látok si zaslúži aj v budúcnosti zvláštnu pozornosť.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377.

LITERATÚRA

1. FAO/WHO: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Canada (2002). http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf, stiahnuté 4. 12. 2017.
2. Rakická M., Marko A., Šturdík E., Danihelová M., Mošovská S., Juríková L.: Chem. Listy 109, 371 (2015).
3. Liptáková D., Petruláková M., Pelikánová J., Valík L., Křišťáková K.: Chem. Listy 110, 149 (2016).
4. Husárová S., Matulová M., Capek P., Sancelme M., Delort A.: Chem. Listy 105, 397 (2011).
5. Mančušková T., Medved'ová A., Valík L.: Chem. Listy 110, 179 (2016).
6. Donot F., Fontana A., Baccou J. C., Schorr-Galindo S.: Carbohydr. Polym. 87, 951 (2012).
7. Badel S., Bernardi T., Michaud P.: Biotechnol. Adv. 29, 54 (2011).
8. Sutherland I. W.: Int. Dairy J. 11, 663 (2001).
9. Sutherland I. W., v knihe: *Comprehensive Glycoscience*, kapitola *Bacterial exopolysaccharides* (Kamerling J. P., ed.). Elsevier, Oxford 2007.
10. Ganzle M. G., Schwab C.: *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*. Caister Academic Press, Dunedin 2005.
11. Kongo M. J. (ed.): *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech, Rijeka 2013.
12. Wang K., Li W., Rui X., Chen X. H., Jiang M., Dong M. S.: Int. J. Biol. Macromol. 63, 133 (2014).
13. Wang K., Li W., Rui X., Chen X. H., Jiang M., Dong M. S.: Int. J. Biol. Macromol. 67, 71 (2014).
14. Kim Y., Oh S., Kim S. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 379, 324 (2009).
15. Hua X., Wu Z., Zhang H., Lu D., Wang M., Liu Y., Liu Z.: Chemosphere 80, 951 (2010).
16. Alhuthud M., Humphreys P., Laws A.: J. Microbiol. Methods 100, 93 (2014).
17. Miao M., Ma Y. J., Jiang B., Huang C., Li X. H., Cui S. W., Zhang T.: Carbohydr. Polym. 106, 384 (2014).
18. Raza W., Yang W., Jun Y., Shakoor F., Huang Q. W., Shen Q. R.: Carbohydr. Polym. 90, 921 (2012).
19. Tiwari P., Misra A. K.: Glycoconjugate J. 25, 85 (2008).
20. Makino S., Ikegami S., Kano H., Sashihara T., Sugano H., Horiuchi H., Saito T., Oda M.: J. Dairy Sci. 89, 2873 (2006).
21. Suzuki S., Yakabe T., Suganuma H., Fukao M., Saito T., Yajima N.: Can. J. Microbiol. 59, 549 (2013).
22. Suzuki S., Honda H., Suganuma H., Saito T., Yajima N.: Can. J. Microbiol. 60, 139 (2014).
23. Kim J. Y., Kwon J. H., Ahn S. H., Lee S. I., Han Y. S., Choi Y. O., Lee S. Y., Ahn K. M., Ji G. E.: Pediatr. Allergy Immunol. 21, 386 (2010).
24. Tallon R., Bressollier P., Urdaci M. C.: Res. Microbiol. 154, 705 (2003).
25. Cerning J.: FEMS Microbiol. Lett. 87, 113 (1990).
26. Han J., Hang F., Guo B. H., Liu Z. M., You C. P., Wu Z. J.: Carbohydr. Polym. 112, 556 (2014).
27. Minervini F., De Angelis, M., Surico, R. F., Di Cagno R., Ganzle, M., Gobbetti M.: Int. J. Food Microbiol. 141, 130 (2010).
28. Barbour A., Philip K.: PLoS One 9, 16 (2014).
29. Olvera C., Centeno-Leija S., Lopez-Munguia A.: Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 92, 11 (2007).
30. Sims I. M., Frese S. A., Walter J., Loach D., Wilson M., Appleyard K., Eason J., Livingston M., Baird M., Cook G.: ISME J. 5, 1115 (2011).
31. Korakli M., Ganzle M. G., Vogel R. F.: J. Appl. Microbiol. 92, 958 (2002).
32. Vishnu C., Naveena B. J., Altaf M., Venkateshwar M., Reddy G.: Enzyme Microb. Technol. 38, 545 (2006).
33. West T. P., Peterson J. L.: Can. J. Microbiol. 60, 53 (2014).
34. Duboc P., Mollet B.: Int. Dairy J. 11, 759 (2001).
35. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B.: Int. Dairy J. 11, 687 (2001).
36. Zhang Y. C., Li S. Y., Zhang C. H., Luo Y. K., Zhang H. P., Yang Z. A.: Afr. J. Biotechnol. 10, 2080 (2011).
37. Hlubeňová K., Mudroňová D., Nemcová R., Gancarčíková S., Maďar M., Sciranková L.: Folia Vet. 61 (2), 61 (2017).
38. Patten D. A., Leivers S., Chadha M. J., Maqsood M., Humphreys P. N., Laws A. P., Collet A.: Carbohydr. Res. 384, 119 (2014).
39. Shao L., Wu Z. J., Zhang H., Chen W., Ai L. Z., Guo B. H.: Carbohydr. Polym. 107, 51 (2014).
40. Abdhul K., Ganesh M., Shanmughapriya S., Kanagavel M., Anbarasu K., Natarajaseenivasan K.: Int. J. Biol. Macromol. 70, 450 (2014).
41. Polak-Berecka M., Szwajgier D., Wasko A.: J. Food Sci. 79, T2404 (2014).
42. Flemming H. C., Wingender J.: Nat. Rev. Microbiol. 8, 623 (2010).
43. Sayem S. M. A., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., Zanfardino A., De Felice M., Varcamonti M.: Microb. Cell Fact. 10, 74 (2011).
44. Englerová K., Nemcová R., Mudroňová D.: Folia Vet. 61 (1), 27 (2017).
45. Lopez D., Vlamakis H., Kolter R.: Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2, 1 (2010).
46. Francolini I., Donelli G.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59, 227 (2010).
47. Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser, C., Jensen P. Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T.: Int. J. Oral Sci. 3, 55 (2011).
48. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Cell. Microbiol. 11, 1034 (2009).
49. Garcia A., Salas-Jara M. J., Herrera C., Gonzalez C.: World J. Gastroenterol. 20, 5632 (2014).
50. Lazar V., Chifiriuc M. C.: Rom. Arch. Microbiol.

- Immunol. 69, 125 (2010).
51. Rendueles O., Kaplan J. B., Ghigo J. M.: Environ. Microbiol. 15, 334 (2013).
 52. Valle J., Da Re S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert P., Ghigo J. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 12558 (2006).
 53. Wu C. C., Lin C. T., Wu C. Y., Peng W. S., Lee M. J., Tsai Y. C.: Mol. Oral Microbiol. 30, 16 (2015).
 54. Werning M. L., Perez-Ramos A., de Palencia P. F., Mohedano M. L., Duenas M. T., Prieto A., López P.: Carbohydr. Polym. 113, 39 (2014).
 55. Olano-Martin E., Gibson G. R., Rastall R. A.: J. Appl. Microbiol. 93, 505 (2002).
 56. Vulevic J., Rastall R. A., Gibson G. R.: FEMS Microbiol. Lett. 236, 153 (2004).
 57. Sanz M. L., Gibson G. R., Rastall R. A.: J. Agric. Food. Chem. 53, 5192 (2005).
 58. Das D., Baruah R., Goyal A.: Int. J. Biol. Macromol. 69, 20 (2014).
 59. Rios-Covian D., Arboleya S., Hernandez-Barranco A. M., Alvarez-Buylla J. R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilan C. G.: Appl. Environ. Microbiol. 79, 7518 (2013).
 60. Li S., Huang R., Shah N., Tao X., Xiong Y., Wei H.: J. Dairy Sci. 97, 7334 (2014).

M. Fedorová^a, M. Prokeš^b, J. Pistl^c, and R. Nemcová^c (^a*Department of Pharmacy and Social Pharmacy*, ^b*Department of Epizootology and Parasitology*, ^c*Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovak Republic*: **Exopolysaccharides as Important Probiotic Products**

Probiotics are beneficial microorganisms, defined as "live microorganisms which, when administered in a reasonable amount, provide health benefits for the host". Not only the types of bacteria themselves, but also various other factors such as the ability to produce exopolysaccharides, biofilms, etc. significantly affect the positive effect of probiotics. Probiotic bacteria are extremely efficient in the production of biologically active substances – exopolysaccharides. These substances are important for their multilateral effects on the human organism. Significant properties of the exopolysaccharides produced by the lactic acid bacteria include anti-biofilm activity, prebiotic properties and other impacts of these substances on both beneficial and pathogenic bacteria of the digestive tract.

Keywords: exopolysaccharides, biofilm, lactic acid bacteria, probiotic bacteria

ŽLUČOVÉ KYSELINY – MALÉ MOLEKULY VELKÝCH MOŽNOSTÍ

MAREK VECKA^a, ALEŠ ŽÁK^a, BARBORA STAŇKOVÁ^a, ŠTĚPÁNKA FOJTÍKOVÁ^a,
PETRA TOMÁŠOVÁ^{a,b} a SIMONA KUTOVÁ^a

^a IV. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
marek.vecka@lfl.cuni.cz

Došlo 26.4.18, přijato 17.10.18.

Klíčová slova: žlučové kyseliny, receptory, supramolekulární struktury

Obsah

1. Úvod
2. Funkce žlučových kyselin (BA)
 - 2.1. Proces trávení
 - 2.2. Signální molekuly
 - 2.2.1. Jaderné receptory
 - 2.2.2. Membránové receptory
3. Jiné funkce BA
 - 3.1. Farmakologické využití BA
 - 3.2. Střevní mikrobiom a BA
 - 3.3. BA jako markery patofyziologických procesů
4. Žlučové kyseliny jako výchozí struktury pro syntézy nových molekul
 - 4.1. Antibiotika
 - 4.2. Protinádorová/antivirová terapie
 - 4.3. Molekulární senzory pro různé látky
 - 4.4. Organotropní látky
5. Supramolekulární struktury s BA
 - 5.1. Molekulární deštníky
 - 5.2. Dendrimery
 - 5.3. Gely
 - 5.4. Nanočástice
 - 5.5. Smíšené micely, liposomy a bilosomy
 - 5.6. Fotolitografie
6. Závěr

1. Úvod

Žlučové kyseliny (BA) tvoří skupinu látek s pleiotropními funkcemi. Výzkum struktury žlučových kyselin má velmi dlouhou tradici, od izolace „matière aciculaire“ v roce 1827 Tidemannem a Gmélinem¹, po

první izolace krystalických žlučových kyselin Streckerem v 1847–1849 (cit.²), postulování sumárního vzorce cholové kyseliny týměž autorem a následné dlouhotrvající úsilí hlavně organických chemiků, které objasnilo jak základní konstituci, tak i stereochemii žlučových kyselin (podrobněji viz např. Janata³ a Černý⁴). Fylogeneticky nejpokročilejší obratlovci, savci, jsou (až na výjimky) schopni syntetizovat pouze žlučové kyseliny s 24 uhlíky⁵. U člověka se navíc příspěvek jednotlivých biosyntetických drah v průběhu ontogeneze mění: u novorozenců převažuje alternativní cesta, kdežto dospělí tvoří BA převážně pomocí klasické biosyntetické dráhy⁶. Žlučové kyseliny podstupují v lidském organismu mnoho dalších reakcí, jako konjugaci⁷, dekonjugaci enzymy střevního mikrobiomu nebo i působením pankreatických karboxypeptidas⁸, a další metabolické přeměny – dehydroxylaci^{9,10}, dehydrogenaci 7 α , epimerační reakce, případně sulfataci, především toxické lithocholové kyseliny (LCA) vzniklé mikrobiální konverzí chenodeoxycholové kyseliny (CDCA). Žlučové kyseliny v organismu podstupují enterohepatální cirkulaci; odhaduje se, že každá molekula BA je před ztrátou exkrecí ve stolici recyklována až 9–14 krát.

2. Funkce žlučových kyselin

2.1. Proces trávení

Historicky nejdéle známé funkce žlučových kyselin v gastrointestinálním traktu jsou indukce toku žluči (žlučových lipidů), micelarizace a trávení lipidů včetně látek v nich rozpustných, nebo usnadnění absorpce proteinů podporou aktivity pankreatických proteas. Podpora absorpce tuků (volných mastných kyselin tvořících s ionty Ca²⁺ nerozpustná mýdla) je důležitá pro precipitaci oxalátu¹¹, případně nekonjugovaného bilirubinu¹² vápenatými ionty, což v prvním případě zabraňuje poškození ledvin a druhém tvorbě pigmentových kamenů. Novější poznatky zdůrazňují důležitou roli BA v homeostáze cholesterolu a v antimikrobiálním obranném střevním systému, protože BA ovlivňují střevní mikrobiom⁸ i indukují expresi antimikrobiálních genů.

2.2. Signální molekuly

Potenciální receptory pro BA lze nalézt v živých buňkách kulturách pomocí fotoreaktivních chemických sond založených na struktuře cholové kyseliny s alkynovou skupinou přístupnou pro cykloadici azidem. Následnými kvantitativními proteomickými analýzami bylo identifikováno několik set kandidátních proteinů¹³.

2.2.1. Jaderné receptory

BA jako signální molekuly ovlivňují mnoho metabolických drah a procesů včetně vlastní biosyntézy a enterohepatální cirkulace pomocí vazby na jaderný transkripční faktor FXR¹⁴. FXR dále reguluje metabolismus lipidů a glukosy pomocí složitých vazeb s dalšími transkripčními faktory. FXR je aktivován BA, které se do jater vrací při trávení lipidů, a tedy při dostatku potravy; BA tedy fungují jako nutriční senzory v játrech při přechodu do sytého stavu¹⁵. Lipocholeová kyselina a její oxoderiváty se váží na další jaderné receptory, jako PXR a CAR (jaderné receptory fungující jako senzor pro organismu cizí látky – xenobiotika), nebo receptor pro vitamin D (ve střevě pomáhá chránit sliznici před kancerogenními a zánětlivými účinky LCA a deoxycholeové kyseliny (DCA), protože zvyšuje aktivitu enzymů hydroxylujících a sulfatujících tyto BA (cit.¹⁶)).

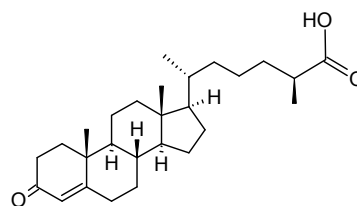
2.2.2. Membránové receptory

Interakce molekul BA s membránovými receptory pomáhají objasnit jejich endokrinní funkce; v roce 2002 byla objevena vazba BA na povrchový receptor TGR5/M-BAR (cit.¹⁷). Ve střevě vazba BA na receptor TGR5 zvyšuje sekreci proteinu GLP-1, a tak zlepšuje inzulinovou rezistenci, dále příznivě ovlivňuje funkci střevní bariéry i motility¹⁵. V játrech funguje TGR5 jako senzor pro BA při naplňování žlučníku a inhibuje prozánětlivé procesy¹⁸. V hnědé tukové tkáni i v buňkách kosterního svalstva vede stimulace TGR5 ke zvýšení energetického výdeje buněk, což platí i pro tzv. „běžové adipocyty“ uložené v bílé tukové tkáni¹⁹.

V roce 2012 byla publikována první práce o vazbě BA na receptor S1PR2 a rok později bylo prokázáno, že konjugát taurinu a ursodeoxycholeové kyseliny (TUDCA) přímo aktivuje $\beta 1$ integriny²⁰, což objasnilo příznivé účinky této BA na játra. Další interakce BA s receptory spojenými s G-proteiny vysvětlují imunopresivní vlastnosti BA i jejich vztah ke kontraktilitě hladkého svalstva²¹.

3. Jiné funkce BA

BA ovlivňují zvláštní schopnost jater zvanou „hepatostat“ (cit.²²), která zabezpečuje správnou velikost jater podle tělesné hmotnosti, včetně reakce na ztrátu jaterního parenchymu resekci nebo poškozením. BA fungují jako feromony u některých živočišných druhů: olfaktorický systém ryb je extrémně citlivý na BA (cit.²³) a BA snad fungují jako feromony nebo kairomony (pozn. kairomony = mezidruhová analoga feromonů) i u savců, konkrétně myši²⁴. U *Caenorhabditis elegans* patřícího do hlístic, bezobratlých živočichů neschopných syntetizovat cholesterol, působí struktury C27 žlučových kyselin (dafachronické kyseliny, obr. 1) jako hormony ovlivňující odolnost proti stresu a délku života²⁵. Podobně působí u kvasinek LCA, která se akumuluje v mitochondriích²⁶, pokud je podána v určitých fázích životního cyklu²⁷.



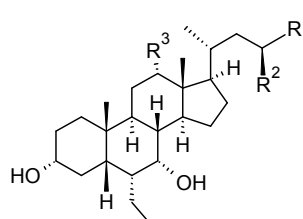
Obr. 1. 25S,Δ⁴-dafachronická kyselina

3.1. Farmakologické využití BA

Z předchozích údajů je zřejmé, že BA či jejich analoga budou mít široký terapeutický potenciál při léčbě jaterních onemocnění, ale i jiných, jako diabetes mellitus²⁸. Žlučové kyseliny se podávají při snížené biosyntéze BA způsobené vrozenými metabolickými chorobami (CA, CDCA) nebo se podává UDCA, pokud je třeba zmírnit cytotoxicitu akumulovaných BA, např. při terapii cholestázy (přerušení toku žluče), případně dalších typů jaterních poškození²⁹.

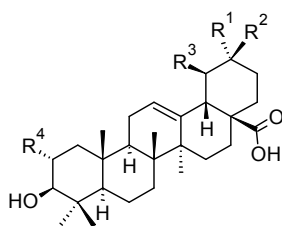
Účinek analog BA je zprostředkován přes receptory zmíněné v předchozí kapitole. Většinou je snaha syntetizovat látky selektivně aktivující pouze některé receptory: pro FXR je selektivní ligand 6 α -ethyl-CDCA (obeticholová kyselina), jiné ovlivňují jak FXR, tak TGR5 (obr. 2, cit.^{30,31}).

Některé přírodní triterpenoidy (obr. 3 a 4) se také váží na TGR5: oleanolová kyselina izolovaná z olivovníku evropského (*Olea europaea*), dále betulinová kyselina a ursolová kyselina mají dokonce vyšší afinitu k TGR5 než LCA³². Další látky podobného typu vyskytující se v extraktech z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*) nebo nového koření (*Pimenta dioica*), korosolová kyselina a maslinová kyselina, byly nedávno identifikovány jako ligandy TGR5 (cit.³³).



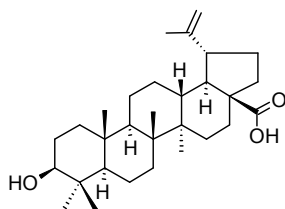
	R ¹	R ²	R ³
obeticholová kyselina	COOH	H	H
INT-767	OSO ₃ Na	H	H
INT-777	COOH	CH ₃	OH

Obr. 2. Syntetické ligandy receptorů FXR a TGR5



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
oleanolová kyselina	CH ₃	CH ₃	H	H
ursolová kyselina	CH ₃	H	CH ₃	H
maslinová kyselina	CH ₃	CH ₃	H	OH
korosolová kyselina	CH ₃	H	CH ₃	OH

Obr. 3. Přírodní ligandy receptorů FXR a TGR5



Obr. 4. Betulinová kyselina

3.2. Střevní mikrobiom a BA

Koncentrace bakterií ve střevním obsahu tlustého střeva je velmi vysoká (cca 10^{12} bakterií na 1 g stolice), přičemž množství střevních bakterií a jejich složení je výsledkem komplexní symbiotické rovnováhy mezi hostitelským organismem a střevním mikrobiomem. Do tohoto vztahu významně přispívají také BA, protože BA na straně jedné ovlivňují počet a druh bakterií a na straně druhé mikrobiom BA aktivně metabolizuje. Metabolismus BA ve střevě je uskutečňován několika typy bakteriálních enzymů, počínaje bakteriální BA hydrolasou (BSH) (cit.⁸) hydrolyzující amidovou vazbu konjugátů BA. Mezi aktivitou BSH ve střevním mikrobiomu a lipidovým metabolismem (tělesnou váhou) hostitele je určitý vztah, dokonce v současné době probíhají pokusy o nahrazení promotorů růstu založených na antibioticích vhodně zvolenými inhibitory BSH (cit.³⁴).

3.3. BA jako markery patofyziologických procesů

Při poruchách tvorby BA jsou často stanovovány meziprodukty biosyntézy³⁵; některé patofyziologické procesy probíhající v játrech nebo střevě jsou spojeny se změněným metabolismem BA (cit.^{36,37}). Profil BA je změněn u mnoha dalších nemocí zažívacího traktu, ale i u astmatu,

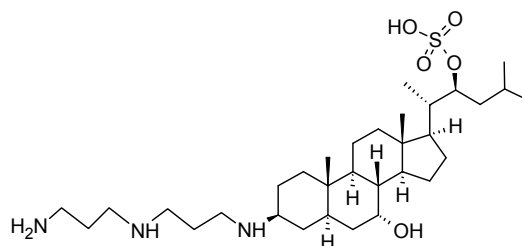
ků, obězních jedinců, snad i díky pozměněnému střevnímu mikrobiomu (viz též kapitola 3.2, cit.³⁸).

4. Žlučové kyseliny jako výchozí struktury pro syntézu nových molekul

Při chemických modifikacích BA se využívá pevná struktura steranového jádra s danými chirálními centry a dvěma možnostmi vazeb pro některé uhlíky, navíc ještě karboxylová skupina na postranním řetězci a několik hydroxylových skupin.

4.1. Antibiotika

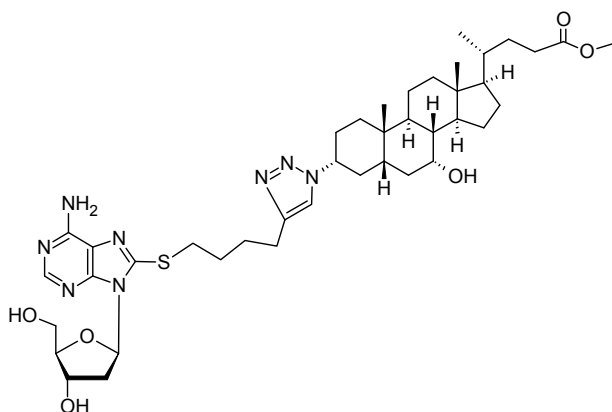
V roce 1993 bylo izolováno z ostrova obecného (*Squalus acanthias* L.) steroidní kationické antibiotikum skvalamin (obr. 5). Později se ukázalo, že v játrech tohoto typu žraloka je přítomno mnoho typů aminosterolů s protinádorovými a antivirovými účinky³⁹; zřejmě zamezují i rozvoji Parkinsonovy nemoci⁴⁰. Design jedné třídy nových kationických antibiotik je odvozen ze skvalaminového skeletu⁴¹.



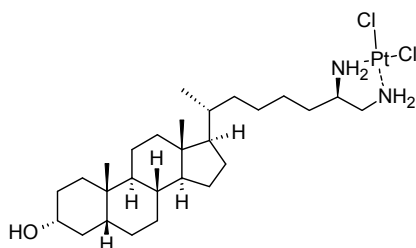
Obr. 5. Skvalamin

4.2. Protinádorová/antivirová terapie

Nekonjugované BA jsou cytotoxické, a podporují rozvoj kolorektálního karcinomu i rakoviny jícnu. Konjugáty BA s polyaminy nebo 1,2,3-triazolem a deoxyadenosinem, jako např. SdA-CDC (obr. 6) zamezují buněčnému růstu a jsou cytotoxické pro některé buněčné nádorové linie⁴². Mechanismus účinku spočívá nejen ve spuštění apoptotických procesů, ale i ve specifických interakcích těchto molekul s řetězcem DNA. Podobně konjugáty BA s oligodeoxynukleotidy mohou snadněji vstupovat do buněk a důsledkem vazeb s komplementárními úseky DNA vykazovat protinádorové nebo antivirové účinky⁴³. Konjugace s BA je vhodná také pro přípravu cytotoxických komplexů s Pt²⁺, které obecně mají závažné vedlejší efekty. Nově syntetizované konjugáty na bázi lithocholové kyseliny (obr. 7) vykazují mírné cytotoxické účinky (IC₅₀ 28 μmol l⁻¹) bez vlivu na normální buněčné linie⁴⁴. Pokud se struktury porfyrinů konjugují s BA, lze takovému slouče-



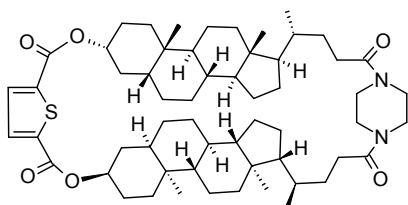
Obr. 6. SdA-CDC

Obr. 7. *cis*-Pt derivát lithocholové kyseliny

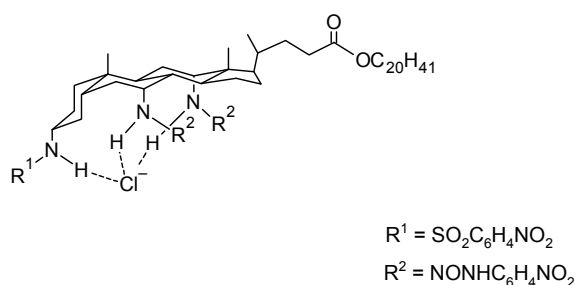
niny využít pro selektivní ablaci tumorů při fotodynamické terapii⁴⁵.

4.3. Molekulární senzory pro různé látky

Molekula BA obsahuje minimálně dvě funkční skupiny, které lze orientovat do jednoho poloprostoru, a tak použít pro tvorbu relativně malých cyklických struktur. Příkladem mohou být cholafany, které obsahují ve své struktuře 2–4 molekuly BA (obr. 8), a podle velikosti prostoru, který obklopují, mohou interagovat např. s různě velkými kationty: $\text{Ag}^+ > \text{K}^+$, nebo s deriváty naftalenu⁴⁶. Kationty lze s různou mírou selektivity vázat i pomocí tzv. crown etherů, makrocyclických etherů, s různě navázanými



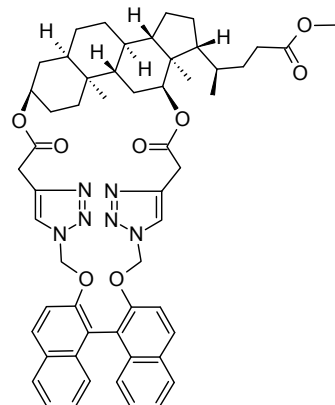
Obr. 8. Příklad struktury cholafanu

Obr. 9. Cholapodní struktura s navázaným iontem Cl^-

mi molekulami BA. Do cyklizačních reakcí vstupuje buď hydroxyl na pozici C3 a karboxyl⁴⁶, nebo v případě BA obsahujících 2 a více hydroxylových skupin pouze hydroxyly⁴⁷. Někdy se na strukturu BA připojuje jak molekula crown etheru vázající kation (= senzor), tak i jednotka fluoroforu (= zdroj signálu pro detekci) (cit.⁴⁸).

Struktura BA s třemi hydroxyly umožňuje tvorbu tripodálních struktur, v tomto případě cholapodů⁴⁹ (obr. 9); s výhodou se hydroxylové skupiny steranového jádra nahrazují aminoskupinami pro snazší reaktivitu při modifikačních reakcích. Některé molekuly vykazují vysokou afinitu pro halogenové anionty, jiné i pro acetátový/dusičnanový anion⁵⁰.

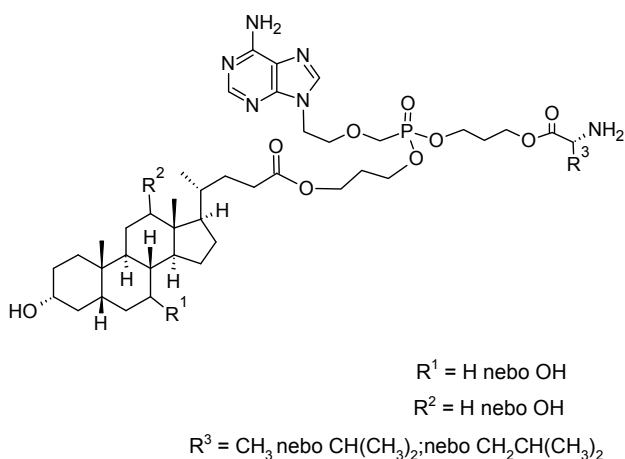
Byly připraveny i další struktury obsahující BA, které můžeme zařadit do cyklocholátů, molekulárních boxů, cyklofanů nebo kryptandů⁴⁷. Příkladem využití chirálních vlastností struktur odvozených od BA jsou pro biomedicínské účely důležité enantioselektivní senzory. U cyklického derivátu deoxycholové kyseliny (CDTB, obr. 10) je selektivní koordinace Hg^{2+} iontů (jež potlačuje fluorescenci) ovlivňována kompetitivní interakcí D- nebo L-isomerů aminokyselin s Hg^{2+} (cit.⁵¹).



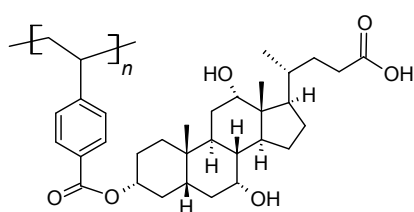
Obr. 10. CDTB

4.4. Organotropní látky

Enterohepatální cyklus BA závisí na jejich schopnosti překonávat membrány pomocí transportu specifickými přenašeči. Připojení molekuly BA k aktivní látce tedy může a) zvýšit absorpci ve střevě, a tak zvýšit dostupnost aktivní látky v krevním oběhu nebo b) zvýšit specifickou pro různé orgány gastrointestinálního traktu (hlavně střevní epitelie a játra). Pro terapii proti hepatitidě B byly nově syntetizovány estery adefoviru s BA a L-isomery aminokyseliny⁵². Získaná molekulární struktura (obr. 11) tak kombinuje hepatotropní vlastnosti látky (získané zbytkem BA) a antivirotické účinky (adefovir). Podobně některé polymerní nanočástice na bázi poly-[3-(4-vinylbenzoátu)] s navázanými zbytky BA (obr. 12) se jeví jako slibné léčivé vektory pro terapii nádorů jater⁵³.



Obr. 11. Estery adefoviru se žlučovými kyselinami a L-aminokyselinami

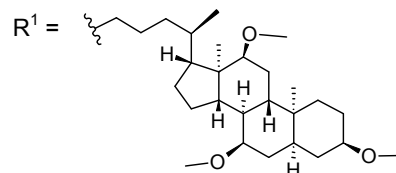
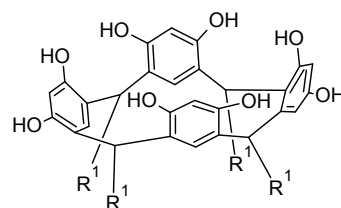


Obr. 12. Polymer na bázi 4-vinylbenzoátu a cholové kyseliny

5. Supramolekulární struktury s BA

5.1. Molekulární deštníky

Molekuly na bázi konjugátů cholové kyseliny a spermidinu jsou známy jako molekulární „deštníky“, struktury



Obr. 13. Iontový kanál na bázi cholové kyseliny a rezorcin[4]arenu

schopné přenášet hydrofilní peptidy, případně thiole AMP/ATP přes membrány⁵⁴. Čtyřramenné struktury s BA byly syntetizovány jako umělé iontové kanály, struktura znázorněná na obr. 13 je schopná přenášet ionty K^+ přes membrány⁵⁵.

5.2. Dendrimery

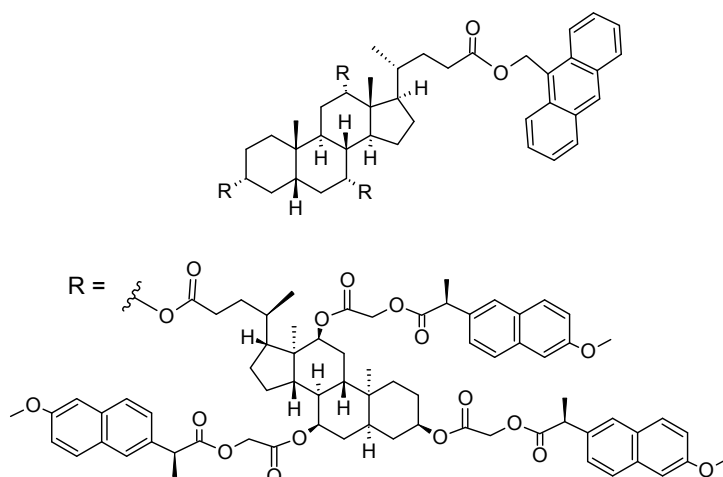
Molekuly BA byly v posledních letech využity pro asymetrické syntézy, nebo při tvorbě struktur molekulárních „kleští“ pro vazbu na báze nukleových kyselin, případně funkčních dendritických molekul, které se dají využít při konstrukci transmembránových iontových kanálů. Další typ dendrimerů odvozených od BA jsou fotosenzitivní struktury (obr. 14), kde absorpci světelných kvant obstarávají naproxenové části, a anthracenové zbytky jsou příjemci intramolekulárního přenosu energie pohlceného světla⁴⁸.

5.3. Gely

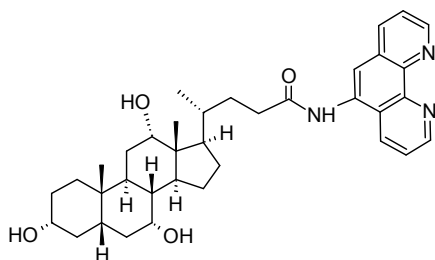
Neobvyklá struktura BA s hydrofobní a hydrofilní částí na pevném steranovém skeletu je předurčuje k tvorbě supramolekulárních struktur, jako nanovláken, případně gelovitých struktur⁵⁶. Hydrogely na bázi BA jsou dobré výchozí látky pro biologické aplikace – snadno se tvoří v biokompatibilních rozpouštědlech a jako gelátory se používají netoxické endogenní látky. Naopak organogely, které se uplatňují v kosmetice, farmakologii nebo i při likvidaci toxických odpadů, se mohou tvořit pomocí struktur na bázi amidových derivátů BA (obr. 15, cit.^{46,57}).

5.4. Nanočástice

Z dalších potenciálních aplikací v medicíně lze zmínit směsi sodných solí DCA s nanočásticemi zlata tvořící složitě větvené struktury, které mají vysokou absorpci v blízké infračervené oblasti, což by se mohlo využívat



Obr. 14. Příklad dendrimerní fotocitlivé struktury obsahující choleovou kyselinu

Obr. 15. (3 α ,7 α ,12 α)-trihydroxy-*N*-[1,10-fenantrolin-5-yl]-5 β -cholestan-24-amid

k fototerapii nádorů⁵⁸ po další modifikaci peptidy cílenými pro vstup do nádoru. Cholová kyselina tvoří s benzylaminem ve vodném prostředí agregáty, které podporují tvorbu sférických dutých křemíkových nanočástic o velikosti 200–1000 nm a tloušťce cca 60 nm (cit.⁵⁹). Tyto částice jsou žádané v imunochemických aplikacích jako podkladový materiál pro multiplexové analýzy, ve farmakologii pro řízené uvolňování látek, dále v separační analýze apod. Žlučové kyseliny mohou usnadňovat přechod různých typů látek přes střevní bariéru (viz kap. 4.4.) a uplatňovat se při zvyšování absorpce léků⁶⁰ či genových struktur uzavřených v nanočásticích na bázi chitosanů⁶¹.

5.5. Smíšené micely, liposomy a bilosomy

Smíšené micely jsou tvořeny v biomedicínských aplikacích BA, polárními lipidy a amfifilními látkami (např. léky), u kterých je požadována vyšší biologická dostupnost. Mezi dnes již konvenční vezikulární systémy řadíme liposomy (složené z fosfolipidů a cholesterolu) nebo ni-

osomy (složené z neionických surfaktantů a cholesterolu). Hledání ještě výhodnějších vakcín vhodných pro orální imunizaci vedlo k vývoji bilosomů, vezikul s BA a neionickými surfaktanty (vlastně jsou to niosomy s přidáním BA). Bilosomy mají proti liposomům i niosomům některé výhody – jsou stabilní v žaludečním i střevním obsahu a jsou snadno skladovatelné⁶². V bilosomech se úspěšně vyzkoušelo podávání jak léků, tak peptidů nebo různých vakcín⁶³.

5.6. Fotolitografie

Fotolitografické metody převádějí informace (např. o struktuře integrovaného obvodu) pomocí ozáření světlem o definované vlnové délce na matici (např. křemík). V současné době představují fotolitografické metody nejdůležitější postupy pro tvorbu mikro- i nano-obvodů, přičemž vzrůstající tlak na miniaturizaci struktur přináší i nové problémy při tvorbě tzv. fotorezistů, světlocitlivých sloučenin měnících po ozáření své chemické vlastnosti. Používané vlnové délky se postupně zkracují, sloučeniny s BA našly uplatnění jak v oblasti hluboké UV (193 nm litografie⁶⁴), tak u i struktur ještě jemnějších (150 nm, cit.⁶⁵).

6. Závěr

Ačkoliv výzkum BA má dlouhou tradici, v poslední době byly objeveny zcela nové funkce těchto malých molekul. Zdá se, že chápání BA jako molekul důležitých hlavně pro jejich fyzikálně-chemické vlastnosti budeme muset přehodnotit a zdůrazňovat význam BA v organismu jako struktur se signálními funkcemi. Molekuly BA nacházejí v současné době široké uplatnění, které na jedné straně

je odvozeno od jejich biologických funkcí, a na straně druhé využívá charakteristických vlastností molekul BA.

Tato práce byla podpořena výzkumnými projekty MPO FV10380, RVO VFN 64165/2012, PROGRES Q25/LF I UK a SVV 260370-2018.

Seznam použitých symbolů a zkratk

BA	žlučové kyseliny
BSH	bakteriální hydrolasa žlučových kyselin
CA	cholová kyselina
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
DCA	deoxycholová kyselina
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
LCA	lithocholová kyselina
TUDCA	ursodeoxycholyltaurin
UDCA	ursodeoxycholová kyselina

LITERATURA

1. Tidemann F., Gmélín L. (ed.): *Recherches experimentales physiologiques et chimiques sur la digestion*. sv. II, Paříž 1827.
2. Strecker A.: *Ann. Chem. Pharm.* 67, 1 (1848).
3. Janata V., v knize: *Chemie steroidních sloučenin*. (Černý V., Fajkoš J. Heřmánek S., Janata V., Protiva M., Schwarz V., Syhora K., Sýkora V., Šantavý F., Vystrčil A., ed.), kap. 2. Nakladatelství ČSAV, Praha 1960.
4. Černý V., Heřmánek S., Syhora K., v knize: *Chemie steroidních sloučenin*. (Černý V., Fajkoš J. Heřmánek S., Janata V., Protiva M., Schwarz V., Syhora K., Sýkora V., Šantavý F., Vystrčil A., ed.), kap. 3. Nakladatelství ČSAV, Praha 1960.
5. Hofmann A. F., Roda A.: *J. Lipid Res.* 25, 1477 (1984).
6. Dawson P. A., v knize: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. (Johnson L. R., ed.), sv. II, kap. 53, 5. vyd. Elsevier, London 2012.
7. Hofmann A. F., Hagey L. R.: *J. Lipid Res.* 55, 1553 (2014).
8. Horáčková Š., Mühlhansová A., Plocková M.: *Chem. Listy* 111, 246 (2017).
9. Macdonald I. A., Bokkenheuser V. D., Winter J., McLernon A. M., Mosbach E. H.: *J. Lipid Res.* 24, 675 (1983).
10. Hofmann A. F., Hagey L. R., Krasowski M. D.: *J. Lipid Res.* 51, 226 (2010).
11. Asplin J. R.: *Urolithiasis* 44, 33 (2016).
12. Vitek L., Carey M. C.: *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36, 122 (2012).
13. Zhuang S., Li Q., Cai L., Wang C., Lei X.: *ACS Cent. Sci.* 3, 501 (2017).
14. Vitek L., Haluzík M.: *J. Endocrinol.* 228, R85 (2016).
15. Li J., Li T.: *Liver Res.* 1, 17 (2017).
16. Copple B. L., Li T.: *Pharmacol. Res.* 104, 9 (2016).
17. Maruyama T., Miyamoto Y., Nakamura T., Tamai Y., Okada H., Sugiyama E., Nakamura T., Itadani H., Tanaka K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 714 (2002).
18. Deutschmann K., Reich M., Klindt C., Dröge C., Spomer L., Häussinger D., Keitel V.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1864, 1319 (2018).
19. Velazquez-Villegas L. A., Perino A., Lemos V., Zietak M., Nomura M., Pols T. W. H., Schoonjans K.: *Nat. Commun.* 9, 245 (2018).
20. Gohlke H., Schmitz B., Sommerfeld A., Reinehr R., Häussinger D.: *Hepatology* 57, 1117 (2013).
21. Thomas C., Pellicciari R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoonjans K.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 7, 678 (2008).
22. Michalopoulos G. K.: *Hepatology* 65, 1384 (2017).
23. Hamdani El H., Doving K. B.: *Prog. Neurobiol. (Oxford, U. K.)* 82, 80 (2007).
24. Doyle W. I., Dinser J. A., Cansler H. L., Zhang X., Dinh D. D., Browder N. S., Riddington I. M., Meeks J. P.: *Nat. Commun.* 7, 11936 (2016).
25. Dumas K. J., Guo C., Wang X., Burkhardt K. B., Adams E. J., Alam H., Hu P. J.: *Dev. Biol. (Amsterdam, Neth.)* 340, 605 (2010).
26. Beach A. a 11 spoluautorů: *Cell Cycle* 14, 1643 (2015).
27. Burstein M. T., Kyryakov P., Beach A., Richard V. R., Koupaki O., Gomez-Perez A., Leonov A., Levy S., Noohi F., Titorenko V. I.: *Cell Cycle* 11, 3443 (2012).
28. Cao H., Chen Z. X., Wang K., Ning M. M., Zou Q. A., Feng Y., Ye Y. L., Leng Y., Shen J. H.: *Sci. Rep.* 6, 28676 (2016).
29. Dawson P. A., v knize: *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease*. (Feldman M., Friedman L. S., Brandt L. J., Sleisenger L. S., ed.), sv. I, kap. 64, 9. vyd. Saunders Elsevier, Philadelphia 2016.
30. Sato H., Macchiarulo A., Thomas C., Gioiello A., Une M., Hofmann A. F., Saladin R., Schoonjans K., Pellicciari R., Auwerx J.: *J. Med. Chem.* 51, 1831 (2008).
31. Carino A., Cipriani S., Marchianò S., Biagioli M., Santorelli C., Donini A., Zampella A., Monti M. C., Fiorucci S.: *Sci. Rep.* 7, 42801 (2017).
32. Castellano J. M., Guinda A., Delgado T., Rada M., Cayuela J. A.: *Diabetes* 62, 1791 (2013).
33. Ladurner A., Zehl M., Grienke U., Hofstadler C., Faur N., Pereira F. C., Berry D., Dirsch V. M., Rollinger J. M.: *Front. Pharmacol.* 8, 468 (2017).
34. Long S. L., Gahan C. G. M., Joyce S. A.: *Mol. Aspects Med.* 56, 54 (2017).
35. Vaz F. M., Ferdinandusse S.: *Mol. Aspects Med.* 56, 10 (2017).
36. Xie G. a 17 spoluautorů: *Sci. Rep.* 7, 45232 (2017).
37. Bayerdörffer E., Mannes G. A., Richter W. O., Ochsenkühn T., Wiebecke B., Köpcke W., Paumgartner G.: *Gastroenterology* 104, 145 (1993).
38. Joyce S. A., Gahan C. G.: *Dig. Dis.* 35, 169 (2017).

39. Salunke D. B., Hazra B. G., Pore V. S.: *Curr. Med. Chem.* **13**, 813 (2006).
40. Perni M. a 23 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E1009 (2017).
41. Savage P. B.: *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 759.
42. Perrone D., Bortolini O., Fogagnolo M., Marchesi E., Mari L., Massarenti C., Navacchia M. L., Sforza F., Varani K., Capobianco M. L.: *New J. Chem.* **37**, 3559 (2013).
43. Bhatia D., Yue-Ming L., Ganesh K. N.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1789 (1999).
44. Hryniewicka A., Lotowski Z., Seroka B., Witkowski S., Morzycki J. W., *Tetrahedron* (2018), doi: 10.1016/j.tet.2018.01.007.
45. Osati S., Ali H., Guérin B., van Lier J. E.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* **21**, 701 (2017).
46. Virtanen E., Koivukorpi J., Tamminen J., Mänttari P., Kolehmainen E.: *J. Organomet. Chem.* **668**, 43 (2003).
47. Tamminen J., Kolehmainen E.: *Molecules* **6**, 21 (2001).
48. Nonappa, Maitra U.: *Org. Biomol. Chem.* **6**, 657 (2008).
49. Davis A. P.: *Molecules* **12**, 2106 (2007).
50. Edwards S. J., Vlakenier H., Busschaert N., Gale P. A., Davis A. P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 4592 (2015).
51. Wu J., Lu J., Liu J., Zheng C., Gao Y., Hu J., Ju Y.: *Sens. Actuators, B* **241**, 931 (2017).
52. Chen Y. a 12 spoluautorů: *Med. Chem. Res.* **26**, 1812 (2017).
53. Zhang J., Yu C., Jiang G.: *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **9**, 865 (2016).
54. Virtanen E., Kolehmainen E.: *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3385.
55. Zhang J. W., Zhu X. X.: *Sci. China, Ser. B: Chem.* **52**, 849 (2009).
56. Galantini L., di Gregorio M. C., Gubitosi M., Travaglini L., Vázquez Tato C., Jover A., Meijide F., Soto Tellini V. H., Pavel N. V.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **20**, 170 (2015).
57. Dukh M., Šaman D., Kroulík J., Černý I., Pouzar V., Král V., Drašar P.: *Tetrahedron* **59**, 4069 (2003).
58. Kim D. H., Larson A. C.: *Biomaterials* **56**, 154 (2015).
59. Ren Y., Li C., Lu Y., Wang X., Zeng X.: *J. Mater. Sci.* **45**, 6830 (2010).
60. Stojančević M., Pavlović N., Goločorbin-Kon S., Mikov M.: *Front. Life Sci.* **7**, 112 (2013).
61. Chae S. Y., Son S., Lee M., Jang M. K., Nah J. W.: *J. Controlled Release* **109**, 330 (2005).
62. Rajput T., Chauhan M. K.: *J. Drug Delivery Ther.* **7**, 4 (2017).
63. Faustino C., Serafim C., Rijo P., Reis C. P.: *Expert Opin. Drug Delivery* **13**, 1133 (2016).
64. Lawson R. A., Tolbert L. M., Henderson C. L.: *J. Vac. Sci. Technol., B: Nanotechnol. Microelectron.: Mater., Process., Meas., Phenom.* **28**, C6S12 (2010).
65. Sha J., Lee J.-K., Ober C. K.: *Proc. SPIE* **7273**, 7273T-1 (2009).

M. Vecka^a, A. Žák^a, B. Staňková^a, Š. Fojtíková^a, P. Tomášová^{a,b}, and S. Kutová^a (^a Charles University, 1st Medical Faculty, IVth Department of Medicine, ^b Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic): **Bile Acids – Small Molecules with Great Possibilities**

Bile acids are compounds with many functions in liver and other parts of gastrointestinal tract. Apart from long-known ability of bile acids to form micelles and help with both intestinal digestion and absorption of lipids, other (but not less important) properties of these molecules are still neglected. Among pleiotropic effects of bile acids belong regulation of cholesterol homeostasis, antimicrobial properties and novel functions discovered in last decades. It seems that the notion of bile acids as compounds important mainly for their physico-chemical properties should be reevaluated and we have to put stress on the importance of bile acids as structures with hormonal functions. Moreover, the molecules of bile acids have unusual properties, which predetermine them for attractive drug designs, as vectors for delivery of active substances, production of chiral compounds, dendrons, or even photoreistant molecules for microcircuits.

Keywords: bile acids, receptors, supramolecular structures

KYSELINA MLÉČNÁ JAKO SIGNÁLNÍ MOLEKULA A JEJÍ PREVENTIVNÍ A TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL

JAROSLAV ZELENKA

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
jaroslav.zelenka@vscht.cz

Došlo 14.6.18, přijato 25.9.18.

Klíčová slova: kyselina mléčná, laktát, signalizace, zánět

Obsah

1. Úvod
2. Metabolismus kyseliny mléčné v lidském organismu
3. Signalizační role laktátu
 - 3.1. Signalizace ve svalové a tukové tkáni
 - 3.2. Růst a regenerace
 - 3.3. Imunitní odpověď
 - 3.4. Signalizace v centrální nervové soustavě
 - 3.5. Humorální signalizace
4. Laktát jako lék v akutních stavech
5. Laktát jako prevence chronických chorob
6. Závěr

1. Úvod

Role kyseliny mléčné v lidském organismu se v povědomí veřejnosti obvykle omezuje na svalovou bolest a píchání v boku při velké fyzické námaze. Dnes už víme, že v tomto případě nezpůsobuje poškození tkáně, ale pouze dráždí receptory bolesti, aby naopak zabránila neúměrnému ničujícímu zatížení¹. A nejen to, posledních 10 let výzkumů ukázalo, že kyselina mléčná, resp. její anion laktát, nehraje v lidském organismu zdaleka jen podřadnou roli metabolického meziproductu, ale mnohé buňky ji využívají jako exkluzivní zdroj energie a signální molekulu. Z praktického hlediska je zase zajímavá její účast v prevenci nebo naopak patogenезi různých civilizačních chorob. Je tedy molekulou, která má nejen zvůčnou minulost, ale zřejmě i budoucnost.

2. Metabolismus kyseliny mléčné v lidském organismu

V přírodě obecně, lidské tělo nevyjímaje, je hlavním zdrojem kyseliny mléčné (2-hydroxypropanové) proces kvašení, přesněji glykolýza. Při ní je typicky jedna mole-

kula glukosy přeměněna na dvě molekuly kyseliny pyrohroznové a kromě potřebného ATP vzniknou 2 redukční ekvivalenty NADH. Pokud pro ně nemá organismus další využití, např. je nemůž spotřebovat jako substrát pro citrátový cyklus a respiraci, ukončí celou metabolickou dráhu redukcí kyseliny pyrohroznové přebyčným NADH, čímž vzniká kyselina mléčná. V lidském těle se to stává především v situacích, kdy je buňka nedostatečně zásobována kyslíkem, nebo kdy respirační kapacita mitochondrií nedostačuje toku metabolitů glykolýzou².

Vzhledem k svému pK_a 3,86 se kyselina mléčná při fyziologickém pH nachází téměř výhradně ve formě svého aniontu – laktátu. Nicméně její vyšší produkce může překonat puřovací kapacitu daného prostředí a vést k poklesu pH. Typickým příkladem je bakteriální kvašení mléka za vzniku kyselého jogurtu. Pokud tímto způsobem dojde k okyselení vnitřního prostředí lidského organismu, byt' se jedná jen o setiny jednotek pH, vzniká potenciálně závažný stav zvaný laktátová acidóza.

Protože prostřední uhlík laktátu je chirální, jedná se o opticky aktivní sloučeninu. Zatímco některé bakterie včetně kmenů přítomných v kvašených potravinách nebo v tlustém střevě produkují kyselinu mléčnou ve formě racemické směsi, lidské buňky vytvářejí výhradně L-laktát. Tento rozdíl je podstatný vzhledem k přísné optické specifičt metabolických enzymů a molekulárních receptorů. Protože v lidském těle se D-laktát významněji hromadí jen v souvislosti se vzácnými patologickými stavy, bude zbytek tohoto článku věnován výhradně L-laktátu, aniž by na to bylo dále upozorňováno².

Dva neznámější a skutečně nejdůležitější zdroje laktátu v lidském organismu jsou svalová práce a kvasná činnost bakterií. V prvním případě vzniká laktát zesílenou glykolýzou v intenzivně pracujících svaech. Jejich požadavky na energii jsou totiž při mimořádné námaze vyšší, než v daný okamžik stačí pokrýt respirace v mitochondriích. Glykolýza v těchto situacích představuje nouzové řešení, na rozdíl od respirace je rychlejší a není limitována přísunem kyslíku. Vznikající kyselina mléčná ovšem musí být exportována ven ze svalových buněk, aby nepůsobila jako zpětnovazebný inhibitor. Bílá svalová vlákna, která jsou uzpůsobena ke krátkodobé intenzivní námaze, např. sprintu, proto spoléhají především na glykolýzu, a obsahují mnohem méně mitochondrií, než červená svalová vlákna sloužící vytrvalostnímu pohybu. Díky tomu může hladina laktátu v krvi při intenzivním sportovním výkonu vystoupat vysoko přes 10 mmol l⁻¹. V ostatních tkáních, které nejsou tak zatíženy, se laktát pomocí specifických přenašečů dostává zpět do buněk a je oxidován na pyruvát. Jaterní tkáň z něj obvykle glukoneogenezí znovu vytvoří glukosu, kterou může uvolnit do krevního oběhu, čímž uzavře tzv. Coriho cyklus. Naproti tomu srdeční nebo

mozková tkáň takto vzniklý pyruvát využije spíše jako zdroj energie a „prodýchá“ ho v mitochondriích. Laktát však neprodukuje jen svaly, jeho hladiny jsou zvýšeny také v rostoucí či hojící se tkáni, v intenzivně pracujících částech mozku, nebo v tukové tkáni intenzivně metabolizující glukosu. V podstatě každá buňka lidského těla se může stát producentem či konzumentem laktátu, a tak se i v klidu pohybují jeho tkáňové a sérové koncentrace někde mezi 0,5 a 2 mmol l⁻¹ (cit²).

Dalším velkým producentem laktátu je naše přirozená mikroflóra. Nejvyšší koncentrace symbiotických bakterií se nacházejí v tlustém střevě, kde tyto mikroorganismy završují proces trávení rozkládáním pro člověka nestravitelných složek potravin, jako je třeba celulóza. Kvůli nízké koncentraci kyslíku jsou pro ně hlavním způsobem získávání energie různé typy kvašení včetně mléčného, tedy výše uvedené glykolýzy. Vzniká řada metabolických produktů. Kromě kyseliny mléčné též ethanol a kyseliny octové, propionové a máselné, které jsou potom vstřebávány střevní stěnou a tvoří nezanedbatelnou část kalorického příjmu člověka. Stejně tak je využit laktát z kysaných potravin, jako je jogurt, kefir či kysané zelí³. Kyselinu mléčnou produkují i bakterie osidlující pokožku a zejména laktobacily ve vaginální sliznici postpubertálních žen. Tam se uplatňují její hydratační a hlavně antiseptické účinky, které znesnadňují pohlavní přenos patogenů včetně viru HIV⁴.

Laktát se hromadí i při některých patologických stavech. Laktátová acidóza doprovází například vrozené metabolické poruchy mitochondriálního původu, mnohé otravy včetně otravy alkoholem a především situace vyznačující se nedostatečným zásobením tkáně kyslíkem, například šok způsobený těžkým poraněním, popálením, alergií či infekcí. Nedostatečné lokální zásobení tkáně, ischemie, jako důsledek zúžení či ucpaní cév (např. při infarktu nebo mrtvici) vede pro změnu k hromadění laktátu pouze v postiženém místě². Konečně nesmíme vynechat závažné téma, které je velmi exponovaným odvětvím základního i klinického výzkumu. Je jím laktátová acidóza uvnitř nádorů, jakožto důsledek intenzivního metabolismu a zároveň nedostatečného cévního zásobení nádorové tkáně. Přítomnost laktátové acidózy ovlivňuje agresivitu nádorového onemocnění a je tématem natolik obsáhlým a významným, že vyžaduje samostatný článek⁵.

3. Signalizační role laktátu

Laktát se významně a předvídatelně hromadí za specifických situací, obvykle souvisejících s metabolickým stresem a zvýšeným energetickým výdejem. Proto je nasnadě, že by tělu mohl sloužit jako signál upozorňující na zátěžové situace. Ovšem každá signální molekula potřebuje také receptor či alespoň obecný signalizační mechanismus, a ty byly v případě laktátu dlouho přehlíženy. Revoluce přišla až před 10 lety, kdy byly objeveny hned dva signalizační mechanismy laktátu a následně byla popsána jeho role v regulaci celé plejády procesů.

3.1. Signalizace ve svalové a tukové tkáni

Poprvé byl laktát označen za signální molekulu v práci publikované skupinou G. A. Brookse v roce 2007. Tehdy se ukázalo, že kultury svalových buněk *in vitro* vystavené laktátu sepnuly transkripční program stimulující tvorbu nových mitochondrií, který zvyšuje jejich respirační kapacitu⁶. Nárůst respirační kapacity doprovází adaptaci svalů na pravidelné cvičení a patří mezi faktory, které příznivě ovlivňují celkové zdraví člověka, takže tato práce vlastně poprvé naznačila, že laktát by se jako signál mohl podílet na zdravotních benefitech pravidelného sportování.

Následovala celá řada dalších prací, které signalizační roli laktátu potvrzovaly a rozvíjely. Kromě toho se ukázalo, že i mnohé další metabolity včetně produktů bakteriální fermentace, ketolátek a metabolitů citrátového cyklu mají signalizační funkce, přičemž se někdy s laktátem ve svých účincích překrývají^{7–9}.

Středobodem signalizačních účinků laktátu je aktivace transkripčního faktoru „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α“ (PGC1α). Ten ovlivňuje transkripci několika stovek genů zodpovědných za stimulaci mitochondriální biogeneze, oxidačního metabolismu, antioxidační ochrany buňky, ale také za tlumení chronické zánětlivé reakce. Typickými aktivátory PGC1α jsou zátěžové podmínky jako hladovění, podchlazení a fyzická námaha. Sluší se zmínit, že všechny uvedené faktory byly asociovány se zvýšenou odolností proti chronickým onemocněním a s dlouhověkostí¹⁰.

Laktát zcela jistě není jediným aktivátorem PGC1α, patří však mezi několik málo přírodních molekul, které jsou této aktivace schopny, takže je nadějným kandidátem na případnou farmakologickou aplikaci. Zajímavé je, že laktát ani další metabolity podle všeho neaktivují PGC1α přímo. Současný stav poznání naznačuje, že přítomnost laktátu zvyšuje cytoplasmatický poměr NADH/NAD⁺, čímž vzniká tzv. reduktivní stres, který zvyšuje produkci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) v mitochondriích. Zatímco vysoké koncentrace ROS mohou buňku poškodovat, nízké fyziologické hladiny jsou dobře kompenzovány antioxidanty a slouží jako signál. A právě PGC1α patří mezi signální proteiny, jejichž aktivita je ROS stimulována¹¹.

V tukových buňkách aktivuje kaskáda laktát – ROS – PGC1α proces hnědnutí, který zahrnuje zvýšenou tvorbu mitochondrií a také proteinu odpřahujícího oxidaci tuků od tvorby ATP (cit.⁹). Zatímco normální bílé tukové buňky slouží hlavně jako zásobárny tuku, hnědé tukové buňky obsahují zvýšený podíl mitochondrií s aktivním odpřahujícím proteinem, které tuk naprázdno spalují, a vytvářejí tak teplo. Hnědnutí bílé tukové tkáně je nedílnou součástí adaptace organismu na pobyt v nízkých teplotách a doprovází také pravidelnou fyzickou námahu. Experimenty na myších ukazují, že nejen fyzická námaha, ale i otužování je (přínejmenším v tukové tkáni) doprovázeno zvýšením hladin laktátu, který je mediátorem procesu hnědnutí⁹. Protože hnědá tuková tkáň spaluje tuky jen tak, „zadarmo“, a protože lidé, kteří mají více hnědého tuku,

jsou štíhlejší a hrozí jim menší riziko, že onemocní diabetem, je hnědnutí tukové tkáně ostře sledovaným objektem farmaceutického průmyslu. Je příjemné vědět, že laktát dokáže tvorbu hnědého tuku indukovat přirozeně.

V tukové tkáni byl také poprvé popsán druhý signální mechanismus laktátu. Tukové buňky mají na svém povrchu hojně vystaven receptor s názvem „G-protein-coupled receptor 81“ (GPR81), který původně patřil mezi „osiřelé“ receptory, protože nebyla známa signální molekula, která by se na něj vážala. Ukázalo se, že ligandem GPR81 je laktát, jehož vazba aktivuje v buňce enzym fosfodiesterasu snižující koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)¹². Ten patří mezi tzv. druhé posly a v buňce má celou řadu funkcí závislých na kontextu. V tukových a svalových buňkách zastavuje pokles cAMP po vazbě laktátu na GPR81 štěpení a uvolňování tukových zásob¹². Objev této signalizace pomohl objasnit dlouho známý fenomén, že při intenzivním fyzickém výkonu, kdy svaly spotřebovávají obrovské spousty glukosy a krevní řečiště je plné laktátu, klesá v krvi hladina volných mastných kyselin a glycerolu pocházejících z tukových zásob, a jako zdroj energie pro ostatní buňky místo nich slouží právě přebytečný laktát. Další práce ukázaly, že tento mechanismus nehraje roli jen při fyzickém výkonu, ale je součástí fyziologické regulace tukové tkáně. Zjistilo se, že během ukládání tukových zásob po jídle bohatém na sacharidy nedochází jen k přímé přeměně glukosy přes pyruvát a acetyl-koenzym A na mastné kyseliny, ale velké množství pyruvátu je redukováno na laktát. Lokální zvýšení jeho hladiny pak aktivuje GPR81 a tím v tukové buňce potlačuje štěpení tuků, které by jinak kolidovalo s jejich současným ukládáním¹³. Mimochodem ani v tomto případě není laktát jediným metabolitem, který se účastní regulace buněčných procesů skrze GPR receptory. Řada dalších „osiřelých“ receptorů s jiným číselným označením našla své ligandy opět mezi mikrobiálními a intermediárními metabolity⁸.

3.2. Růst a regenerace

V rostoucí tkáni nebo hojícím se poranění se také zvyšuje koncentrace laktátu jako důsledek nedostatečného zásobení kyslíkem a překotného dělení nových buněk, případně i energeticky náročné imunitní odpovědi proti pronikajícím patogenům. V tomto kontextu laktát skrze ROS a PGC1 α aktivuje signální kaskádu angiogeneze, která stimuluje proliferaci endotelových buněk a tvorbu nových krevních cév nezbytných pro správné vyživování a okysličování vznikající tkáně^{14,15}. Laktát tak vlastně ukazuje buňkám cévní stěny, kde je potřeba, aby se dělily a tvořily nové kapiláry. Zajímavé je, že stejným způsobem zlepšuje laktát uvolňovaný při sportovním výkonu i prokrvení svalů a mozku¹⁶. Kromě toho laktát v buňkách pojivové tkáně, fibroblastech, stimuluje produkci mezibuněčné molekuly hyaluronanu, která usnadňuje migraci buněk do místa určení¹⁷. Z praktického hlediska je zajímavé, že pokud se hlodavcům do hojící se rány implantuje polymerní nosič uvolňující pozvolna kyselinu mléčnou, proces hojení

se výrazně urychlí a to i u obtížně hojitelných ran¹⁸. Několik takových nosičů už je patentovaných a lze doufat, že v blízké budoucnosti přispějí k lepší kvalitě života pacientů trpících syndromem diabetické nohy nebo bérčovými vředy¹⁹.

Systémové zvýšení hladin laktátu při náročné fyzické aktivitě nebo pobytu ve velkých nadmořských výškách zase stimuluje tvorbu červených krvinek a jejich vyplavování do krve. Pouhá injekce laktátu pokusným myším tak zvýší hematokrit a koncentraci hemoglobinu v krvi o 10 % (cit.²⁰). Laktát může stimulovat i dělení a diferenciaci dalších buněk, včetně kmenových²¹. Poslední experimentální práce ukazují, že laktátová signalizace tímto způsobem přispívá k růstu svalů po cvičení, regeneraci poškozené či opotřebované nervové tkáně, obnově střevního epitelu po jídle a u mužů též k vyšší kvalitě spermií. Nicméně tento výzkum je teprve v počátcích. Naše nedávné výsledky předestřely ještě další roli laktátové signalizace v regeneraci. Kožní buňky pravidelně vystavované koncentracím laktátu běžným při sportovním výkonu vykazovaly méně známek stárnutí než buňky ve standardním médiu²². Důvodem je zřejmě opět aktivace kaskády ROS – PGC1 α . Tato data jsou nepřímo podpořena klinickými studiemi ukazujícími nižší tvorbu vrásek na pokožce pacientek ošetřovaných chemickým peelingem obsahujícím kyselinou mléčnou²³.

3.3. Imunitní odpověď

Velice významné je zjištění, že laktát slouží jako signál i v imunitní odpovědi. Uplatňuje se zde zřejmě několik signálních mechanismů najednou včetně GPR81, ROS, PGC1 α a prosté inhibice glykolýzy produktem. Proto se účinek laktátu může výrazně lišit podle koncentrace, doby expozice a pH. *In vitro* studie, kde byla použita dlouhodobá expozice laktátu bez přítomnosti acidózy, ukázaly, že laktát může skrze ROS stimulovat zánětlivé procesy²⁴. Tato situace může být relevantní u obězních lidí trpících metabolickým syndromem, jejichž systémové hladiny laktátu jsou dlouhodobě mírně zvýšeny v důsledku přítomnosti velkého množství tukové tkáně nekontrolovatelně produkující laktát²⁵. Vzhledem k tomu, že metabolický syndrom i s ním související ateroskleróza jsou doprovázeny chronickým zánětem, může laktát přispívat k prohlubování zánětlivých změn až ke vzniku nevratného diabetu či srdečnímu selhání.

Naopak práce studující krátkodobou expozici laktátu, případně současnou přítomnost laktátu a acidózy, ukázaly silný protizánětlivý účinek. Tyto modely jsou analogií přechodného zvýšení hladin laktátu při fyzické námaze, resp. lokální laktátové acidózy v hojícím se poranění či ve střevní sliznici⁷. Protizánětlivé působení má řadu potenciálních aplikací včetně prevence metabolického syndromu. Pokusy na myších ukázaly, že podání laktátu výrazně zmenšuje poškození jater a pankreatu vlivem septického šoku, což je život ohrožující systémová zánětlivá reakce na přítomnost bakteriálních antigenů v krvi²⁶. V *in vitro* experimentu zase laktát v hladinách běžných při sportovním

výkonu výrazně tlumil aktivaci žírných buněk, tedy první krok v alergické reakci²⁷. Konečně v *ex vivo* experimentech už jen samotné médium vzniklé činností bakterií mléčného kvašení dokázalo významně utlumit zánět střevní stěny pacientů s Crohnovou chorobou a zánět spojený s invazí salmonel²⁸.

3.4. Signalizace v centrální nervové soustavě

Mimořádně zajímavá a komplexní je role laktátu v centrální nervové soustavě, kde slouží jako zdroj energie a neurotransmiter. Poměrně nedávné výzkumy ukázaly, že hlavním energetickým substrátem pro neurony není cukr glukosa, ale právě laktát. Glukosa je totiž v mozkové tkáni nejprve přeměněna pomocnými buňkami, gliemi, na laktát, a až ten slouží za palivo neuronům²⁹. Zajímavým průvodním jevem této skutečnosti je zvýšená koncentrace laktátu v aktivních částech mozku. V případech, kdy v důsledku svalové námahy roste hladina laktátu v krvi, pak neurony spotřebovávají přímo tento laktát a šetří tím glukosu pro pracující svaly. Laktát je dokonce nezbytný pro tvorbu dlouhodobé paměti. Myši s chybějícími exportéry laktátu na gliích, nebo importéry laktátu na neuronech, ztratily schopnost se učit³⁰. Tento jev není důsledkem nutriční, ale spíše signalizační role laktátu, který v neuronech stimuluje expresi proteinů zodpovídajících za neuroplasticitu, tedy podstatu tvorby paměti³¹. Významným peptidem stimulujícím neuroplasticitu a novotvorbu neuronů z kmenových buněk je „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF). Jeho exprese řízená skrze PGC1 α je stimulována fyzickou i duševní aktivitou a je možné ji zvýšit dokonce i pouhou infuzí laktátu^{32,33}. Nízké hladiny BDNF byly asociovány s depresemi a Alzheimerovou chorobou. Aktivace signální dráhy laktát – PGC1 α – BDNF je možná vysvětlením toho, proč dávka fyzické aktivity u lidských dobrovolníků i pokusných zvířat krátkodobě zlepšuje schopnost se učit³⁴ a proč jsou fyzicky i duševně aktivní lidé méně náchylní k depresím a rozvoji demence, včetně té Alzheimerovy³⁵.

V mozku se uplatňuje i signalizace pomocí receptoru GPR81, i když o jejím významu zatím máme jen dílčí informace. Aktivace GPR81 na membráně neuronů mozkové kůry snižuje frekvenci přenášených impulsů³⁶. Vzhledem k tomu, že koncentrace laktátu se lokálně zvyšuje v intenzivně pracující mozkové tkáni, jedná se zřejmě o zpětnovazebnou ochranu příliš aktivních neuronů. Tuto hypotézu podporuje fakt, že laktát chrání neurony před glutamátovou excitotoxicitou³⁷, tedy jakousi smrtí z přepracování, která je zodpovědná za masivní odumírání neuronů při mozkové mrtvici, epilepsii nebo poranění hlavy. Naopak v části mozku zvané *locus coeruleus* působí laktát produkovaný gliemi jako neuronální aktivátor³⁸. *Locus coeruleus* je zodpovědný za vybuzení pozornosti a aktivuje se např. během probouzení ze spánku nebo ve stresu. Zvířata, která dostala injekci laktátu do této oblasti, se vyznačovala zvýšenou pozorností až nervozitou³⁸.

3.5. Humorální signalizace

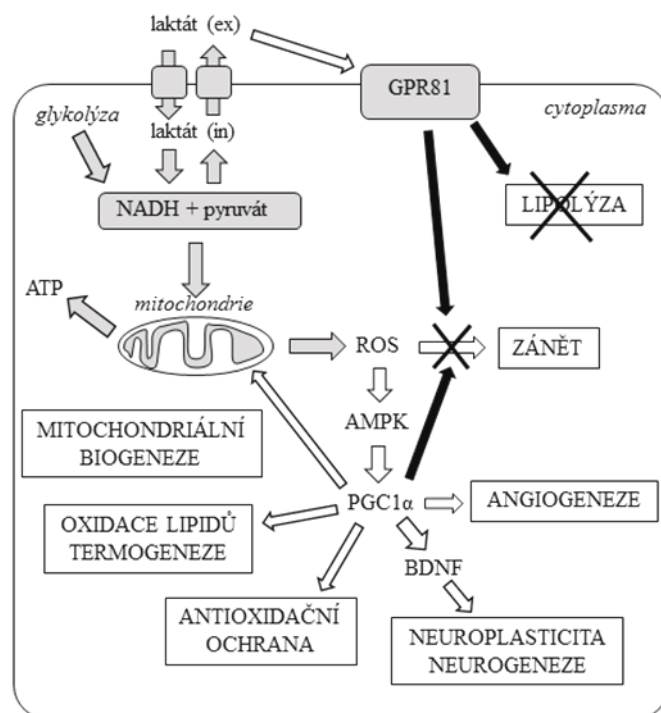
Mimo svou roli v centrální nervové soustavě se laktát účastní i humorální signalizace tím, že inhibuje nebo aktivuje produkci některých hormonů. Pro naši utěšeně tloustnoucí populaci, kde oblibu TV pořadů o hubnutí předčí jen obliba pořadů o vaření, je jistě zajímavé, že receptor GPR81 se nachází na žaludečních buňkách produkujících hormon ghrelin. Ten patří mezi tzv. orexigenní peptidy, tj. jeho vyšší hladiny způsobují hlad a nižší naopak pocit sytosti. Vazba laktátu na GPR81 snižuje jeho sekreci a tím tlumí pocit hladu³⁹. Význam tohoto jevu potvrdily experimenty, kdy byl lidským dobrovolníkům nebo pokusným myším podáván laktát ve formě nitrožilní infuze a následně byl hodnocen jejich apetit. Zvýšená hladina laktátu v krvi skutečně snižovala pocit hladu i následný příjem potravy^{40,41}. Tento jev je v souladu s nižším pocitem hladu krátce po intenzivním cvičení⁴² a představuje zřejmě evoluční adaptaci bránící tomu, aby intenzivní fyzická zátěž, např. při lovu, boji či útěku před predátorem, která je pochopitelně spjata s energetickým deficitem, vyvolávala intenzivní chuť k jídlu v momentě, kdy jsou na místě důležitější věci.

Zřejmě z podobných důvodů tlumí infuze laktátu též výlev stresových hormonů noradrenalinu, adrenalinu a kortizolu, které se vyplavují při hladovění, podchlazení a fyzické námaze, a jejichž úkolem je aktivovat metabolismus a zajistit dostatečné zásobování tkání živinami⁴³. Naproti tomu produkce mužského pohlavního hormonu testosteronu je stimulována jak fyzickou aktivitou, tak infuzí laktátu a v *ex vivo* pokusech též ošetřením testikulární tkáně roztokem obsahujícím laktát⁴⁴.

Komplikovaná, nejasná, ale potenciálně velmi významná je role laktátu v inzulinové signalizaci. Zatímco pravidelné cvičení a konzumace kysaných mléčných výrobků, tedy situace spojené s přechodným zvýšením hladin laktátu, jsou dobře zdokumentovanou prevencí inzulinové rezistence i diabetu^{35,45}, chronické mírné zvýšení hladin laktátu u obézních jedinců vlivem jeho nadprodukce v hypertrofované a hypoxické tukové tkáni má přesně opačný efekt^{25,46}. Infuze laktátu skutečně snižuje transport glukosy do svalových a jaterních buněk, což lze interpretovat jednak jako inzulinovou rezistenci, jednak jako prioritní odstraňování laktátu z cirkulace⁴⁷. Naproti tomu aktivace PGC1 α působí spíše jako prevence diabetu¹⁰. Celá situace je ještě komplikovaná tím, že inzulinová rezistence je v podstatě projev chronického zánětu a i v zánětlivé signalizaci má laktát dvojí roli závisléjící na době expozice. Na konečné vyjasnění této problematiky si zkrátka ještě musíme počkat (obr. 1).

4. Laktát jako lék v akutních stavech

Zřejmě již v horizontu několika málo let bude laktát plošně používán jako lék v akutní medicíně. Je to díky sérii nezávislých klinických studií, které ukázaly, že periorální infuze hypertonického roztoku laktátu sodného



Obr. 1. **Přehled nejvýznamnějších signálních drah ovlivňovaných laktátem.** Bílé šipky – aktivací signalizace, černé šipky – inhibiční signalizace, šedé šipky – metabolické toky, AMPK – AMP-aktivovaná protein kinasa

namísto běžně užívaného Ringerova nebo fyziologického roztoku výrazně zlepšuje prognózu pacientů s mozkovou mrtvicí, traumatickým poškozením mozku, hemoragickým šokem nebo akutním srdečním selháním^{48–51}. Kromě lepšího hospodaření s vodou a ionty, které je mimo záběr tohoto článku, je zřejmě příznivý účinek laktátu vázán i na jeho protizánětlivé vlastnosti, schopnost aktivovat mitochondriální respiraci, komplexní stimulaci hojivých procesů a angiogeneze, a v případě poškození mozku též neuroprotektivní a neuroplastický účinek.

5. Laktát jako prevence chronických chorob

Zatímco terapeutické použití laktátu v akutních stavech se teprve zvolna prosazuje, jeho preventivní účinky na celou řadu chronických onemocnění byly empiricky objeveny již dávno a může je využívat každý a hned. Pravidelná konzumace nízkotučných kysaných mléčných výrobků byla v populačních studiích asociována s nižší incidencí kardiovaskulárních chorob, diabetu, karcinomu tlustého střeva a s celkově nižší mortalitou^{45,52,53}. Mimořádně významné jsou preventivní účinky sportu: pravidelná pohybová aktivita dramaticky snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, obezity, diabetu, hypertenze, demence včetně Alzheimerovy choroby, některých druhů

nádorových onemocnění a také výrazně prodlužuje život³⁵. Přestože laktát jistě není jediným účinným principem těchto dvou intervencí, data sumarizovaná v našem článku ukazují, že se na jejich příznivém účinku významně podílí.

6. Závěr

V posledních 10 letech došlo ve vědecké komunitě studující laktát k razantní změně paradigmatu. Opadl zájem o práce studující negativní roli laktátové acidózy při sportovním výkonu a šokových stavech. Naopak se objevila spousta prací popisujících signální roli laktátu v celé řadě fyziologických regulací. Kromě toho je laktát stále častěji označován za molekulu schopnou aktivovat obranné mechanismy lidského organismu a působit tak jako lék v akutních stavech a jako prevence chronických chorob. To je důležité zejména vzhledem k rychlému tloustnutí a stárnutí celosvětové populace, které s sebou nesou zvyšující se riziko výše uvedených problémů a s tím spojenou zdravotní, společenskou i finanční zátěž. Data sumarizovaná v tomto článku naznačují, že bychom měli začít uvažovat o laktátu jako o strategické složce výživy a potenciálním terapeutikou.

Tato práce byla podpořena granty: Operační program Praha – konkurenceschopnost [OPPC CZ.2.16/3.1.00/21537] a [OPPC CZ.2.16/3.1.00/24503] a Národním programem udržitelnosti [NPU I LO1601].

LITERATURA

- Pollak K. A., Swenson J. D., Vanhaisma T. A., Hughes R. W., Jo D., Light K. C., Schweinhardt P., Amann M., Light A. R.: *Exp. Physiol.* **99**, 368 (2014).
- Adeva-Andany M., López-Ojén M., Funcasta-Calderón R., Ameneiros-Rodríguez E., Donapetry-García C., Vila-Altesor M., Rodríguez-Seijas J.: *Mitochondrion* **17**, 76 (2014).
- Garrote G. L., Abraham A. G., Rumbo M.: *Front. Microbiol.* **6**, 629 (2015).
- Aldunate M., Tyssen D., Johnson A., Zakir T., Sonza S., Moench T., Cone R., Tachedjian G.: *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2015 (2013).
- Zelenka J., Koncošová M., Ruml T.: *Biotechnol. Adv.* **36**, 583 (2018).
- Hashimoto T., Hussien R., Oommen S., Gohil K., Brooks G. A.: *FASEB J.* **21**, 2602 (2007).
- Iraporda C., Errea A., Romanin D. E., Cayet D., Peyreya E., Pignataro O., Sirard J. C., Garrote G. L., Abraham A. G., Rumbo M.: *Immunobiology* **220**, 1161 (2015).
- Haas R., Cucchi D., Smith J., Pucino V., Macdougall C. E., Mauro C.: *Trends. Biochem. Sci.* **41**, 460 (2016).
- Carrière A. a 16 spoluautorů: *Diabetes* **63**, 3253 (2014).
- Chan M. C., Arany Z.: *Metabolism* **63**, 441 (2014).
- Irrcher I., Ljubicic V., Hood D. A.: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C116 (2009).
- Liu C. a 12 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* **284**, 2811 (2009).
- Ahmed K., Tunaru S., Tang C., Müller M., Gille A., Sassmann A., Hanson J., Offermanns S.: *Cell Metab.* **11**, 311 (2010).
- Ruan G. X., Kazlauskas A.: *J. Biol. Chem.* **288**, 21161 (2013).
- Arany Z. a 12 spoluautorů: *Yale J. Biol. Med.* **451**, 1008 (2008).
- Morland C. a 20 spoluautorů: *Nat. Commun.* **8**, 15557 (2017).
- Stern R., Shuster S., Neudecker B. A., Formby B.: *Exp. Cell Res.* **276**, 24 (2002).
- Porporato P. E., Payen V. L., De Saedeleer C. J., Prêat V., Thissen J. P., Feron O., Sonveaux P.: *Angiogenesis* **15**, 581 (2012).
- Cherreddy K. K. a 10 spoluautorů: *Nanomedicine* **11**, 1975 (2015).
- Luo S. T. a 11 spoluautorů: *Sci. Rep.* **7**, 38105 (2017).
- Schneider C. C., Ateshrang A., Königsrainer I., Glatzle J., Bühler S., Schaefer R., Northoff H., Königsrainer A., Zieker D.: *Cell Physiol. Biochem.* **30**, 1547 (2012).
- Zelenka J., Dvořák A., Alán L.: *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2015**, 351698 (2015).
- Stiller M. J., Bartolone J., Stern R., Smith S., Kollias N., Gillies R., Drake L. A.: *Arch. Dermatol.* **132**, 631 (1996).
- Samuvel D. J., Sundararaj K. P., Nareika A., Lopes-Virella M. F., Huang Y.: *J. Immunol.* **182**, 2476 (2009).
- Lovejoy J., Newby F. D., Gebhart S. S. P., DiGirolamo M.: *Metabolism* **41**, 22 (1992).
- Hoque R., Farooq A., Ghani A., Gorelick F., Mehal W. Z.: *Gastroenterology* **146**, 1763 (2014).
- Ababayehu D. a 14 spoluautorů: *J. Immunol.* **197**, 2909 (2016).
- Tsililingiri K., Barbosa T., Penna G., Caprioli F., Sonzogni A., Viale G., Rescigno M.: *Gut* **61**, 1007 (2012).
- Wyss M. T., Jolivet R., Buck A., Magistretti P. J., Weber B.: *J. Neurosci.* **31**, 7477 (2011).
- Suzuki A., Stern S. A., Bozdagi O., Huntley G. W., Walker R. H., Magistretti P. J., Alberini C. M.: *Cell* **144**, 810 (2011).
- Yang J., Ruchti E., Petit J. M., Jourdain P., Grenningloh G., Allaman I., Magistretti P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12228 (2014).
- Wrann C. D., White J. P., Salogiannis J., Laznik-Bogoslavski D., Wu J., Ma D., Lin J. D., Greenberg M. E., Spiegelman B. M.: *Cell Metab.* **18**, 649 (2013).
- Schiffer T., Schulte S., Sperlich B., Achtzehn S., Fricke H., Strüder H. K.: *Neurosci. Lett.* **488**, 234 (2011).
- Skriver K., Roig M., Lundbye-Jensen J., Pingel J., Helge J. W., Kiens B., Nielsen J. B.: *Neurobiol. Learn. Mem.* **116**, 46 (2014).
- Viña J., Sanchis-Gomar F., Martinez-Bello V., Gomez-Cabrera M. C.: *Br. J. Pharmacol.* **167**, 1 (2012).
- Bozzo L., Puyal J., Chatton J.-Y.: *PLoS One* **8**, e71721 (2013).
- Jourdain P., Allaman I., Rothenfusser K., Fiumelli H., Marquet P., Magistretti P. J.: *Sci. Rep.* **6**, 21250 (2016).
- Tang F., Lane S., Korsak A., Paton J. F., Gourine A. V., Kasparov S., Teschemacher A. G.: *Nat. Commun.* **5**, 3284 (2014).
- Engelstoft M. S. a 20 spoluautorů: *Mol. Metab.* **2**, 376 (2013).
- Silberbauer C. J., Surina-Baumgartner D. M., Arnold M., Langhans W.: *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* **278**, R646 (2000).
- Schultes B., Schmid S. M., Wilms B., Jauch-Chara K., Oltmanns K. M., Hallschmid M.: *Appetite* **58**, 818 (2012).
- Deighton K., Barry R., Cannon C. E., Stensel D. J.: *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**, 1147 (2013).
- Fattor J. A., Miller B. F., Jacobs K. A., Brooks G. A.: *Am. J. Physiol. Metab.* **288**, E143 (2005).
- Lu S. S. a 12 spoluautorů: *Med. Sci. Sports Exercise* **29**, 1048 (1997).
- Forouhi N. G.: *Nutr. Rev.* **73**, 15 (2015).

46. Crawford S. O., Hoogeveen R. C., Brancati F. L., Astor B. C., Ballantyne C. M., Schmidt M. I., Young J. H.: *Int. J. Epidemiol.* **39**, 1647 (2010).
47. Choi C. S., Kim Y.-B., Lee F. N., Zabolotny J. M., Kahn B. B., Youn J. H.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E233 (2002).
48. Ichai C., Payen J. F., Orban J. C., Quintard H., Roth H., Legrand R., Francony G., Leverve X. M.: *Intensive Care Med.* **39**, 1413 (2013).
49. Nalos M., Leverve X., Huang S., Weisbrodt L., Parkin R., Seppelt I., Ting I., Mclean A.: *Crit. Care* **18**, R48 (2014).
50. Bisri T., Utomo B., Fuadi I.: *Asian J. Neurosurg.* **11**, 151 (2016).
51. Somasetia D. H., Setiati T. E., Sjahrodji A. M., Idjradinata P. S., Setiabudi D., Roth H., Ichai C., Fontaine E., Leverve X. M.: *Crit. Care* **18**, 466 (2014).
52. Farvid M. S. a 15 spoluautorů: *Am. J. Epidemiol.* **185**, 697 (2017).
53. Pala V. a 13 spoluautorů: *Int. J. Cancer* **129**, 2712 (2011).

J. Zelenka (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Lactic Acid as a Signaling Molecule and its Prospects in Prevention and Therapy**

Lactic acid and its anion lactate are known as metabolic waste products of bacterial fermentation and anaerobic muscle work. However, during the last 10 years of research, much evidence of their role in physiological regulations of human organism has been accumulated. This review describes their role in metabolic adaptation of muscle and fat tissues, their stimulating effect on regeneration and reparation, double-edge function in the immune response, signaling role in the central nervous system, and modulatory function in humoral regulations. The review also describes their potential applications in acute medicine and in the prevention of chronic diseases.

Keywords: lactic acid, lactate, signaling, inflammation

SLINNÉ PEPTIDY A PROTEINY, JEJICH STRUKTURA A VÝZNAM V ÚSTNÍ DUTINĚ

LENKA FIALOVÁ

*Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná
fakultní nemocnice v Praze, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2
lfial@lf1.cuni.cz*

Došlo 8.1.19, přepracováno 13.6.19, přijato 15.6.19.

Klíčová slova: histatin, proteiny bohaté na prolin, sliny, statherin

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika vybraných proteinů ve slině
 - 2.1. Histatiny
 - 2.1.1. Struktura histatinů
 - 2.1.2. Histatiny v ústní dutině
 - 2.1.3. Funkce histatinů
 - 2.2. Proteiny bohaté na prolin
 - 2.2.1. Struktura proteinů bohatých na prolin
 - 2.2.2. Proteiny bohaté na prolin v ústní dutině
 - 2.2.3. Funkce proteinů bohatých na prolin
 - 2.3. Statherin
 - 2.3.1. Struktura statherinu
 - 2.3.2. Statherin v ústní dutině
 - 2.3.3. Funkce statherinu
3. Závěr

1. Úvod

Slina je snadno dostupná biologická tekutina, jejíž složení je za fyziologických i patologických podmínek již mnoho let intenzivně zkoumáno^{1–3}. Ve slině lze stanovovat řadu analytů jako součást diagnostického procesu různých onemocnění, prokazovat drogy, monitorovat hladiny léků a vzhledem k přítomnosti buněk i analyzovat DNA. K rutinnímu využití sliny jako diagnostické tekutiny zbývá ještě vyřešit řadu problémů týkajících se standardizace metod ve fázi preanalytické i analytické^{1,4,5}. Z širšího pohledu termínem slina označujeme tekutinu v ústní dutině, která obsahuje kromě produktů slinných žláz (vlastní slina) tekutinu dentogingiválního žlábků a slizničního transudátu, produkty bakteriálního metabolismu, součástí nosního a faryngeálního sekretu, zbytky potravy, uvolněné buňky epitelu, krevní buňky a mikroorganismy⁶.

Současný rozmach analytických metod zahrnující i oblasti metabolomiky, genomiky a proteomiky otevírá možnosti pro rozšíření spektra látek využitelných v diagnostice jak onemocnění v oblasti ústní dutiny, tak dalších chorob (např. nádorové, endokrinologické a infekční), nebo pro testování DNA¹.

Ve slině, která je tvořena z 98–99 % vodou, jsou rozpuštěné četné minerální látky a nízkomolekulární i vysokomolekulární organické sloučeniny včetně proteinů a peptidů^{1,5}. Proteiny a peptidy představují důležité součásti sliny, jejichž rozmanité účinky jsou nezbytné pro zajištění správné funkce ústní dutiny^{7,8}. Pro studium proteinů existují v současnosti moderní analytické postupy. Uplatnění metod proteomické a peptidomické analýzy přineslo celou řadu informací, které doplnily naše znalosti o slinných proteinech a peptidech získaných před érou proteomiky a peptidomiky^{9–11}. K dispozici jsou nové poznatky o kvantitativních i kvalitativních vlastnostech mnoha slinných proteinů za fyziologických i vybraných patologických podmínek^{3,9,12}.

Proteiny a peptidy představují složky, bez nichž by slina nebyla schopna plnit své funkce. Ústní dutina je vstupní bránou pro četné mikroorganismy, ale také místem, v němž minerální zubní tkáň mohou být v kontaktu s agresivně působícím okolím. Důležitá je úloha proteinů v iniciační fázi trávení, při vytváření proteinového filmu na povrchu v ústní dutině, při poskytování ochrany proti různým infekčním agens a při udržování homeostázy vápníku, potřebné pro zachování integrity minerální složky zubů.

Zajištění některých funkcí, zejména protektivních, není omezeno na jeden protein, ale podílí se na něm několik proteinů¹³. V této souvislosti jsou vhodným příkladem redundantní antimikrobiální účinky histatinů, cystatinů, mucinů a enzymů amylasy a peroxidasy, zajišťující obranu proti širokému spektru mikroorganismů, které se dostávají do ústní dutiny s potravou a vzduchem. Jiný příklad redundantního působení slinných proteinů souvisí se zachováním integrity minerálu skloviny. Rozpuštění minerálu skloviny v prostředí ústní dutiny zabraňuje přesycený roztok fosforečnanu vápenatého ve slině. Nežádoucím důsledkem těchto podmínek by byla precipitace fosforečnanu vápenatého v lalůčkách a vývodech slinných žláz a dále tvorba krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů. Uvedeným jevům zamezuje přítomnost několika peptidů a proteinů ve slině, jako jsou např. statherin a proteiny bohaté na prolin¹³.

Cílem článku je podat přehlednou informaci o struktuře, chování a funkcích vybraných skupin slinných proteinů a peptidů. Text bude zaměřen zejména na ty proteiny, popř. peptidy, jejichž přítomnost je nezbytná ve specifickém prostředí ústní dutiny. Soustředíme se zejména na fosforylované proteiny či peptidy, interagující

s hydroxyapatitem a tvořící součást antimikrobiální ochrany v ústech. Podobná práce v české literatuře není k dispozici.

2. Charakteristika vybraných proteinů ve slině

K hlavním skupinám slinných proteinů jsou řazeny muciny, slinná amylasa, proteiny bohaté na prolin, cystatiny, statherin, histatiny a karboanhydrasy, jejichž hmotnostní podíly ve slině jsou uvedeny na obr. 1. Tabulka I shrnuje základní údaje o proteinech a peptidech, kterými se budeme podrobněji zabývat v dalším textu.

2.1. Histatiny

Histatiny představují rodinu strukturně příbuzných peptidů s neobvykle vysokým obsahem aminokyseliny histidinu¹⁴. Původně byly histatiny považovány za peptidy specificky produkované pouze ve slinných žlázách, ale nedávno byla prokázána produkce i v některých jiných tkáních¹⁵.

2.1.1. Struktura histatinů

Bylo charakterizováno nejméně 12 histatinů, které jsou produkty dvou genů a proteolytického štěpení. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 7 do 38 aminokyselinových zbytků. Hlavními zástupci jsou histatiny 1, 3 a 5 tvořené z 38, 32 a 24 aminokyselinových zbytků¹⁴. Histatiny 1 a 3 jsou kódovány geny *HTN1* a *HTN3*, histatin 5 vzniká proteolytickým odštěpením C-koncové části z histatinu 3.

Tabulka I

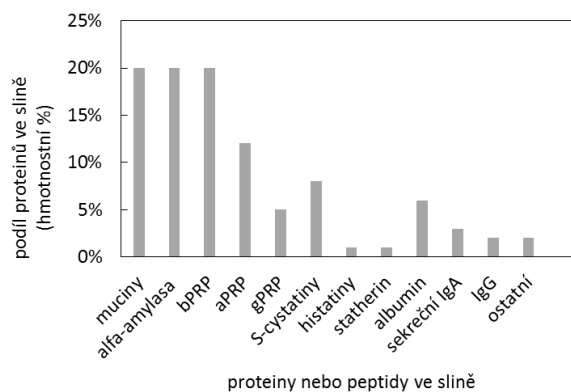
Přehled hlavních proteinů ve slině – vybrané skupiny

Protein/peptid	Počet aminokyselinových zbytků	Mr	Hlavní typy posttranslačních modifikací	Koncentrace v plné slině ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Původ ve slině
Histatin 1	38	4929	proteolýza, fosforylace, sulfatace	10,9–44,3	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Histatin 3	32	4063	proteolýza	1,7–11,8	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Kyselé proteiny bohaté na prolin	150 (171) ^a	15 000–17 000	proteolýza, fosforylace, transglutaminace	90–180	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Bazické a glykosylované proteiny bohaté na prolin	56–300	různá	proteolýza, fosforylace, transglutaminace, glykosylace	–	příušní žláza
Statherin	43	5000	fosforylace, proteolýza, transglutaminace	2–12	příušní, podčelistní a podjazyková žláza

^a Pouze jeden z kyselých proteinů bohatých na prolin je složen ze 171 aminokyselinových zbytků; (zpracováno podle cit.^{9,12,14,18,19,21,39,41})

Kromě dvou výjimek je sekvence prvních 22 aminokyselinových zbytků pro histatiny 1, 3 a 5 identická a sekvence sedmi zbytků na C-konci je společná pro histatin 1 a 3 (obr. 2). Prekurzorem ostatních histatinů jsou histatiny 1 a 3 (cit.^{14,16,17}).

Označení histatiny je odvozeno z primární struktury a antimikrobiálních vlastností. Jeden z dřívějších názvů, proteiny bohaté na histidin (HRPs – histidine-rich proteins), upozorňoval na vysoký podíl histidinu, který v histatinech tvoří kolem 18–29 % (cit.^{14,16}). Každý



Obr. 1. Zastoupení hlavních proteinů a peptidů ve slině. V grafu jsou uvedeny hlavní skupiny slinných proteinů (aPRP – kyselé proteiny bohaté na prolin, bPRP – bazické proteiny bohaté na prolin, gPRP – glykosylované proteiny bohaté na prolin). (přepřevládá podle cit.¹⁰)

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselin
		N-konec	C-konec	
<i>HTN1</i>	Histatin 1			38
<i>HTN3</i>	Histatin 3			32
	Histatin 5			24

Obr. 2. Hlavní zástupci histatinů – strukturní vztahy mezi isoformami. Histatiny 1 a 3 jsou kódovány geny *HTN1* a *HTN3*, histatin 5 vzniká proteolytickým odštěpením C-koncové části z histatinu 3. (---- oblast chybějících částí polypeptidového řetězce), (přepřacováno podle cit.^{17,18})

z histatinů 1, 3 a 5 obsahuje sedm histidinových zbytků. Jediným fosforylovaným zástupcem je histatin 1, v němž je fosfát vázán na serinový zbytek Ser2 (cit.¹⁴).

Histatiny jsou charakterizovány převážně jako kationické proteiny, které ve vodném prostředí zaujímají strukturu náhodného klubka¹⁷. V polypeptidovém řetězci histatinů jsou rozlišovány domény odpovědné za specifické funkce. N-koncový úsek v histatinu 1 a 3 zabezpečuje antimikrobiální aktivitu a C-koncová doména se podílí na hojení ran podporou procesu epitelizace a angiogeneze. V N-koncových oblastech histatinů 3 a 5 byly popsány motivy umožňující vazbu kationtů kovů Cu^{2+} a Ni^{2+} a ve všech hlavních histatinech i místa schopná vytvářet komplex se Zn^{2+} (cit.¹⁷).

2.1.2. Histatiny v ústní dutině

Histatiny, jejichž podíl v plné slině představuje 1,0 až 1,5 % ze všech slinných proteinů, jsou secernovány velkými párovými slinnými žlázami. Nejvíce zastoupené histatiny 1, 3 a 5 tvoří kolem 80 % všech histatinů secernovaných slinnými žlázami^{14,18}. Koncentrace celkových histatinů ve slině produkované příušní žlázou po stimulaci její sekrece (např. žvýkáním) je $155 \pm 59 \mu\text{g ml}^{-1}$, ale koncentrace histatinů v plné slině s hodnotou $26,8 \pm 7,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ je několikanásobně nižší, než v sekretech slinných žláz¹⁹. Tento rozdíl je vysvětlován tím, že poté, co se histatiny uvolní ze slinné žlázy a dostanou se do kontaktu se součástí plné sliny, stávají se předmětem intenzivního proteolytického štěpení, na němž se účastní různé proteasy^{11,20–22}. Kromě toho se histatiny s vysokou afinitou adsorbují na povrch zubů jako součást získané pelikuly a rovněž mohou vytvářet komplexy s muciny nebo se prostřednictvím enzymu transglutaminasy propojují příčnými vazbami s dalšími proteiny a peptidy^{23,24}. Proteolytickému štěpení podléhají i histatiny vázané na povrch zubní skloviny²⁴.

2.1.3. Funkce histatinů

Účinky histatinů v ústní dutině se projevují v několika oblastech.

- Společně s dalšími peptidy a proteiny jsou histatiny řazeny mezi antimikrobiálně působící látky, které v ústech poskytují ochranu proti širokému spektru

mikrobů^{16,25,26}. Předpokládá se, že důležitou roli v jejich antibakteriálním působení hrají pozitivně nabitě skupiny, které se elektrostatickými interakcemi vážou na negativní náboje kyselých fosfolipidů přítomných v membránách bakterií. Integrace histatinů do buněčné membrány vyvolá její zvýšenou permeabilitu a narušení struktury, což může vyústit až v destrukci bakterií¹⁷. Významné je především fungistatické a fungicidní působení histatinů namířené proti *Candida albicans*¹⁴. Nejúčinněji *in vitro* působí histatin 5 (cit.¹⁷). Mechanismus, kterým histatiny zneškodňují *Candida albicans*, je popisován jako několikastupňový. Je zahájen internalizací histatinu 5 po navázání na membránový receptor. Uvnitř buňky může histatin ovlivňovat mitochondrie a indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku. Jinými uváděnými důsledky jsou únik ATP a K^+ z buňky a zástava buněčného cyklu v G1 fázi^{17,25,27}.

- Další účinky histatinů souvisejí s jejich schopností vytvářet komplexy s kovovými ionty¹⁷. Ionty se stávají nedostupné pro enzymy, což může ovlivnit růst bakterií²⁷. Vznik komplexů může také přispívat k uvolňování reaktivních forem kyslíku s nežádoucími účinky na různé buněčné struktury mikroorganismů.
- Histatiny představují slinné složky, které mohou chránit extracelulární součásti pojiva v ústní dutině. *In vitro* byly prokázány inhibiční účinky histatinů na bakteriální, ale i endogenní metaloproteasy podílející se na destrukci struktur bílkovinných součástí pojivové tkáně u onemocnění parodontu²⁸.
- Histatiny mají i schopnost vazby na hydroxyapatit, v níž hraje důležitou roli fosforylovaný serinový zbytek v histatinu 1, ale zřejmě i konformační změny navozené adsorpcí k hydroxyapatitu. Histatiny se podílejí na potlačení spontánního růstu hydroxyapatitových krystalů ve slinném prostředí přesyceného roztoku fosforečnanu vápenatého¹⁶.
- Významnou a intenzivně zkoumanou funkcí histatinů je urychlení hojení ran. Přítomnost histatinů ve slině je dáována do souvislosti se skutečností, že rány se v dutině ústní hojí rychleji než kožní poranění. Na C-konci molekuly histatinů 1 a 3 je lokalizována ob-

last, která se podílí na hojivých procesech. Histatiny podporují růst epitelálních buněk a jejich migraci, což je předpokladem re-epitelizace a angiogeneze a podobným způsobem působí i na fibroblasty a některé další buněčné typy²⁹.

- Histatiny jsou peptidy vykazující vysokou afinitu k taninům. Vytvářejí s nimi komplexy, které jsou stabilní ve střevě. Tím mohou omezovat některé negativní účinky taninů (např. poškození sliznice gastrointestinálního traktu)³⁰.

2.2. Proteiny bohaté na prolin

Proteiny obsahující úseky bohaté na prolin jsou hojně zastoupeny u eukaryot i prokaryot. Jejich specifická struktura podmiňuje řadu důležitých funkcí v buňkách. V různých proteinech může být prolin soustředěn do krátkých repetitivních sekvencí nebo různě uspořádaných delších sekvencí. Ve skupině proteinů bohatých na prolin (PRP – prolin-rich proteins), které patří k nejhojnějším proteinovým složkám ve slině, je prolin obsažen v delších úsecích, které se tandemově opakují³¹.

2.2.1. Struktura proteinů bohatých na prolin

Slinné PRP představují skupinu proteinů s charakteristickou primární strukturou³². Kromě vysokého obsahu prolinových zbytků, jež dosahuje v lidských PRP až 40 %, jsou v PRP početné zbytky glycinu, glutaminu a kyseliny glutamové¹⁸. Převažující zastoupení uvedených aminoky-

selin, které narušují vytváření α -helixu, způsobuje, že PRP zaujímají strukturu náhodného klubka³³. Slinné PRP na rozdíl od jiných PRP (např. kolagenu) neobsahují hydroxylovaný prolin ani lysin¹⁸.

Lidské PRP jsou produkty šesti genů a vyznačují se výrazným polymorfismem²¹. Výsledkem RNA splicingu, proteolytického štěpení, odehrávajícího se před sekrecí, a dalších posttranslačních modifikací, jsou skupiny proteinů, obvykle označované jako kyselé, bazické a glykosylované PRP (cit.^{21,32,34}).

Molekuly kyselých PRP, na jejichž polypeptidovém řetězci se podílí s výjimkou jednoho PRP 150 aminokyselinových zbytků, jsou tvořeny dvěma hlavními doménami – N-koncovou, silně kyselou s malým obsahem prolinu, ale větším počtem zbytků kyseliny glutamové a asparagové, a delší C-koncovou částí s vysokým zastoupením prolinu, glutaminu a glycinu^{8,35}. Serinové zbytky v pozicích 8 a 22 mohou být fosforylovány oba současně nebo může být fosforylován pouze jeden z nich. V malé míře se může vyskytnout nefosforylovaná a trifosforylovaná varianta, v níž fosforylaci podléhá i serin na 17. pozici³⁶. Sekvence aminokyselin včetně fosforylace serinů podmiňuje výraznou asymetrii v molekule z hlediska rozložení nábojů. V prvních 29 aminokyselinových zbytcích v N-koncové části molekuly jsou soustředěny negativní náboje podstatné pro vazbu kladně nabitých Ca^{2+} iontů³⁷. N-konec kyselých PRP je zakončen zbytkem kyseliny pyroglutamové, která poskytuje ochranu před působením aminopeptidas^{35,38}. Intracelulárním proteolytickým štěpením vznikají

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselinových zbytků
		N-konec	C-konec	
PRH1	Db-s			171
	Db-f		P-C peptid	127
	PIF-s			150
	PIF-f		P-C peptid	106
PRH2	Pa-dimer			2 x 150
	PRP1			150
	PRP3		P-C peptid	106
	PRP2			150
	PRP4		P-C peptid	106

Obr. 3. **Hlavní zástupci kyselých proteinů bohatých na prolin a isoform vzniklých proteolýzou.** Kyselé proteiny bohaté na prolin jsou kódovány dvěma geny *PRH1* a *PRH2*. Část kyselých proteinů bohatých na prolin podléhá intracelulárnímu proteolytickému štěpení, kterým vznikají zkrácené isoformy. Společným produktem uvedené proteolýzy je fragment jejich C-konce obsahující 44 aminokyselinových zbytků, tzv. P-C peptid. Jeden z kyselých proteinů bohatých na prolin (Pa) vytváří dimer.

zkrácené isoformy odpovídajících kyselých PRP. Společným produktem uvedené proteolýzy kyselých PRP je fragment jejich C-konce obsahující 44 aminokyselinových zbytků, tzv. P-C peptid. Štěpení ale nepodléhají všechny kyselé PRP a ve slině se společně s proteolytickými fragmenty nacházejí i intaktní kyselé PRP (cit.^{21,35,37,39}). Jeden z kyselých PRP je ve slině přítomen ve formě dimeru spojeného disulfidovým můstkem (obr. 3).

Bazické PRP tvoří skupinu vysoce polymorfních proteinů, lišících se v primární struktuře a různých posttranslačních modifikacích zmiňovaných u kyselých PRP, jako jsou proteolytická štěpení, fosforylace a vytvoření zbytku kyseliny pyroglutamové na N-konci^{18,39,40}. Posttranslační úpravy jsou zahajovány intracelulárně a pokračují i v extracelulárním prostředí ve vývodech slinných žláz a v ústní dutině. Významná je i proteolýza, které se účastní bakteriální endoproteasy. Výsledkem jsou peptidy o délce 7–20 aminokyselinových zbytků³⁹. Na rozdíl od kyselých PRP nejsou ve slině prokazovány bazické PRP ve formě neštěpených proproteinů³⁶.

Bazické PRP kromě již zmíněných posttranslačních modifikací podléhají i glykosylaci, jejíž produkty jsou zahrnovány pod samostatnou skupinu glykosylovaných PRP. Připojení oligosacharidů s variabilním složením se děje prostřednictvím N- a O-glykosidových vazeb na různých glykosylačních místech³⁹.

2.2.2. Proteiny bohaté na prolin v ústní dutině

Skupina heterogenních PRP tvoří ve slině téměř 40 % všech proteinů a peptidů¹⁰. Kyselé PRP, které představují asi jednu třetinu mezi všemi PRP, jsou produkovány pouze slinnými žlázami. Hodnoty koncentrací kyselých PRP jsou v plné slině po stimulaci ve srovnání s jinými slinnými proteiny vysoké, a to v rozsahu $430 \pm 130 \mu\text{g ml}^{-1}$. V sekretech z příušní žlázy jsou hladiny dokonce 1,5krát vyšší než v plné slině¹⁹.

Bazické PRP jsou také syntetizovány ve slinných žlázách, především v *gl. parotis*, ale jejich přítomnost je prokazována i v jiných sekretech^{10,41}. Jejich koncentrace se zvyšuje v průběhu dětství až do období dospívání zřejmě v závislosti na hormonálních, ale i dietních změnách⁴². Ve slině se odehrává fragmentace PRP, při níž se tvoří i fosfopeptidy. Řada z nich jsou N-koncové fragmenty vzniklé proteolýzou kyselých PRP a účinné v inhibici precipitace fosforečnanu vápenatého^{43,44}.

PRP se vážou na povrch zubů a stávají se součástí získané pelikuly. V menším množství PRP nalézáme i ve slizniční pelikule, kde se předpokládá jejich účast v lubrikaci, hydrataci, popř. interakci s mikroorganismy^{24,45,46}.

2.2.3. Funkce proteinů bohatých na prolin

Podobně jako histatiny i PRP se svými účinky podílejí na interakcích s vápenatými ionty nebo ovlivňují vazby mikroorganismů k povrchům skloviny.

- Hlavní funkce kyselých PRP spočívá v účasti na udržování homeostázy vápníku v prostředí ústní dutiny³⁷. Toto působení kyselých PRP je podmíněno zápornými

náboji kyselých aminokyselin, ale i fosforylací obou serinových zbytků N-domény, která vykazuje vysokou afinitu k hydroxyapatitu a schopnost vázat vápenaté ionty^{8,18}. Adsorpce kyselých PRP na povrch zubu zamezuje sekundárnímu růstu krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů, ale nikoliv primární precipitaci fosforečnanu vápenatého při fyziologických koncentracích^{34,39,47}.

- Vazba PRP na hydroxyapatit skloviny prostřednictvím N-domény navozuje konformační změnu v molekule proteinu, při níž se odhalí C-koncový úsek molekuly, umožňující vazbu bakterií. Kratší fragmenty kyselých PRP zahrnující N-úsek molekuly schopnost vazby bakterií postrádají a naopak s nativními PRP soutěží o vazbu na hydroxyapatit⁸. Podobně jako kyselé PRP i skupina bazických PRP váže mikroorganismy. Zatím není plně prozkoumána úloha četných peptidových fragmentů. Přítomnost některých z nich byla prokázána v získané pelikule³⁹.
- Účinky glykosylovaných PRP vyplývají z přítomnosti připojených sacharidů. Podobně jako muciny napomáhají lubrikaci a poskytují ochranu tvrdým i měkkým tkáním ústní dutiny. Chrání i proti různým patogenům. Prostřednictvím značně variabilní sacharidové složky jsou glykosylované PRP schopny vázat různé mikroorganismy a napomáhat jejich odstranění z ústní dutiny^{21,39}.
- PRP, zejména bazické, vykazují výraznou afinitu k taninům. Stejně jako histatiny s nimi tvoří stabilní komplexy⁴⁸ a omezují jejich absorpci v gastrointestinálním traktu⁴⁹.

2.3. Statherin

Statherin představuje další multifunkční peptid ve slině, jehož význam spočívá zejména ve stabilizaci zubní skloviny. Ve slinném prostředí přesyceného roztoku reguluje statherin primární (spontánní) i sekundární precipitaci (růst krystalů) fosforečnanu vápenatého¹⁸. Název statherin má původ v řeckém slovu *statheropio*, což znamená stabilizovat⁵⁰.

2.3.1. Struktura statherinu

Statherin, produkt jednoho genu, je peptid tvořený 43 aminokyselinovými zbytky o relativní molekulové hmotnosti 5380 (cit.³⁷). Na N-konci v první třetině molekuly je soustředěna většina nabitých aminokyselinových zbytků a v poloze 2 a 3 dva sousedící fosforylované serinové zbytky, po kterých bezprostředně následují dva zbytky kyseliny glutamové. Kyselá část molekuly zahrnující prvních pět aminokyselin umožňuje vazbu vápenatých iontů. V dalších dvou třetinách molekuly představuje tyrosin téměř jednu čtvrtinu aminokyselin a přispívá k hydrofobnímu charakteru této struktury^{50,51}. Existuje varianta statherinu označovaná SV2, která postrádá vnitřní úsek 10 aminokyselinových zbytků obsahující všechny bazické aminokyseliny. Je produktem alternativního sestřihu mRNA. Z polypeptidového řetězce statherinu i jeho

varianty SV2 může být posttranslačně proteolýzou odštěpen fenylalanin na C-konci, což se projeví snížením hydrofobicity molekuly^{18,21,52} (obr. 4).

Ve vodném prostředí statherin nezaujímá žádnou ze sekundárních struktur a je řazen mezi nestrukturované proteiny^{53,54}. N-koncová doména statherinu, pokud je vázána k povrchu hydroxyapatitu, má potenciál vytvořit strukturu α -helixu. Úsek N-konce s dvěma fosforylovanými serinovými zbytky a dvěma karboxylovými skupinami umožňuje pevnější interakci s hydroxyapatitovým povrchem, zatímco zbylá část α -helixu je připojena méně pevně⁵⁴.

2.3.2. Statherin v ústní dutině

Statherin produkují především příušní, podčelistní a von Ebnerovy slinné žlázy, ale nepatří mezi peptidy specifické pouze pro sliny^{41,55}. Statherin je prokazován i v jiných biologických tekutinách, jako jsou slzy a bronchiální a nosní sekrety⁴¹.

Koncentrace statherinu ve slině vykazuje výrazné interindividuální difference, ale na rozdíl od histatinů nebyly prokázány cirkadiální rytmy⁵⁶. Rozmezí koncentrací statherinu v sekretech příušní žlázy je 17,7–208,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a je pouze mírně vyšší než v sekretech podčelistní a podjazykové žlázy na rozdíl od plné sliny, v níž byly naměřeny řádově nižší hladiny (2,5–12,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (cit.⁵⁷). Tak významný rozdíl mezi koncentracemi statherinu v sekretech slinných žláz a plnou slinou, který v této míře u jiných slinných proteinů či peptidů není pozorován, je mimo jiné podobně jako u histatinů vysvětlován degradací peptidu a výraznou adsorbací na povrch zubů¹⁸. V sekretech slinných žláz byl statherin popsán jako jedna ze složek heterotypických komplexů s muciny, které by mohly poskytovat ochranu před proteolýzou, ale také představovat zásobní formu pro získanou pelikulu⁵⁸.

Statherin patří mezi hlavní složky získané pelikuly a v menší míře je prokazován i jako součást slizniční pelikuly^{24,45,57}.

2.3.3. Funkce statherinu

- Hlavní funkce statherinu souvisí s homeostázou vápníku v ústní dutině. Statherin efektivně inhibuje pri-

mární precipitaci fosforečnanu vápenatého na rozdíl od jiných slinných proteinů a peptidů⁵⁹. Na účinné inhibici spontánní precipitace vápenatých solí v přesyceném roztoku sliny (primární precipitace) se účastní celá molekula⁶⁰. Společně s dalšími slinnými proteiny působí statherin také jako inhibitor sekundární precipitace fosforečnanu vápenatého^{60,61}. Pomocí N-konce polypeptidového řetězce se může vázat na hydroxyapatit skloviny a tím zamezit růstu krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů^{53,54}. Vrstvička obohacená statherinem a vápníkem, která byla prokázána na povrchu zubů, může podporovat mineralizaci zubů bez projevů nežádoucí sekundární precipitace⁶².

- Statherin připojený k hydroxyapatitu skloviny je jedním z prekursorů získané pelikuly a prostřednictvím hydrofobní C-domény je schopen vázat některé bakterie na povrch zubů^{63,64}. Na druhé straně tím, že statherin společně s dalšími proteiny některé mikroorganismy agreguje, jejich schopnost adheze může být potlačena⁶⁵.
- Molekula statherinu může za určitých podmínek projevovat amfipatické vlastnosti a na povrchu zubů fungovat jako přirozený lubrikant^{66,67}.

3. Závěr

Slina je perspektivní biologická tekutina a proteiny a peptidy představují její významnou složku. Svými účinky slinné proteiny a peptidy zajišťují optimální prostředí v ústní dutině, která je vystavena nejrůznějším vlivům ze zevního prostředí.

Proteiny a peptidy ve slině jsou tvořeny heterogenním souborem po stránce strukturní i funkční. Některé z nich jsou prokazovány pouze ve slině, jiné jsou přítomné i v dalších biologických tekutinách. Náročnost analýzy slinných proteinů je dána četnými posttranslačními modifikacemi a degradačními procesy, které se v ústech odehrávají zejména vlivem bakteriálních enzymů.

Studium slinných proteinů a peptidů přináší cenné poznatky perspektivně aplikovatelné pro diagnostické úče-

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselinových zbytků
		N-konec	C-konec	
<i>STATH</i>	Statherin			43
	SV1			42
<i>STATH</i>	SV2			33
	SV3			32

Obr. 4. **Statheriny – strukturní vztahy mezi isoformami.** Statherin je produkt jednoho genu *STATH*. Výsledkem alternativního sestřihu mRNA je varianta statherinu označovaná SV2, která postrádá vnitřní úsek 10 aminokyselinových zbytků. Posttranslační proteolýzou statherinu nebo varianty SV2 může být na C-konci odštěpen fenylalanin. Vzniklé produkty se označují SV1 a SV3. (---- oblast chybějících částí polypeptidového řetězce), (přepřacováno podle cit.¹⁸)

ly a monitorování různých onemocnění. Otevírají se i další možnosti jejich využití, např. jako účinných antimikrobiálních prostředků a látek podporujících hojení ran (např. histatiny)²⁹. Tyto aplikace jsou však zatím ve fázi primárního výzkumu.

Práce byla podpořena projekty PROGRES Q25 a MZ ČR – RVO VFN64165, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze.

LITERATURA

- Nunes L. A., Mussavira S., Bindhu O. S.: *Biochem. Med. (Zagreb)* 25, 177 (2015).
- Malamud D.: *Dent. Clin. North. Am.* 55, 159 (2011).
- Ruhl S.: *Expert Rev. Proteomics* 9, 85 (2012).
- Janšáková K., Celec P., Tóthová L.: *Klin. Biochem. Metab.* 26, 21 (2018).
- Castagnola M. a 11 spoluautorů: *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 31, 347 (2011).
- Kaufman E., Lamster I. B.: *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 197 (2002).
- Koscielniak D., Jurczak A., Zygmunt A., Krzysciak W.: *Acta Biochim. Pol.* 59, 451 (2012).
- Lamkin M. S., Oppenheim F. G.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 251 (1993).
- Messana I., Inzitari R., Fanali C., Cabras T., Castagnola M.: *J. Sep. Sci.* 31, 1948 (2008).
- Scarano E. a 10 spoluautorů: *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 30, 125 (2010).
- Amado F., Lobo M. J., Domingues P., Duarte J. A., Vitorino R.: *Expert Rev. Proteomics* 7, 709 (2010).
- Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M. T., Messana I.: *Trends Biotechnol.* 29, 409 (2011).
- Levine M. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694, 11 (1993).
- Oppenheim F. G., Xu T., McMillian F. M., Levitz S. M., Diamond R. D., Offner G. D., Troxler R. F.: *J. Biol. Chem.* 263, 7472 (1988).
- Shah D., Ali M., Pasha Z., Jaboori A. J., Jassim S. H., Jain S., Aakalu V. K.: *PLoS One* 11, e0148018 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0148018.
- Oppenheim F. G., v knize: *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology* (Tenovuo J. O., ed.), svazek I, kapitola 6, str. 151. CRC Press, Boca Raton 1989.
- Melino S., Santone C., Di Nardo P., Sarkar B.: *FEBS J.* 281, 657 (2014).
- Oppenheim F. G., Salih E., Siqueira W. L., Zhang W., Helmerhorst E. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098, 22 (2007).
- Campese M., Sun X., Bosch J. A., Oppenheim F. G., Helmerhorst E. J.: *Arch. Oral Biol.* 54, 345 (2009).
- Ekström J., Khosravani N., Castagnola M., Messana I., v knize: *Dysphagia: Diagnosis and Treatment*, série Medical Radiology (Ekberg O., ed.), str. 19. Springer-Verlag, Berlin 2012.
- Helmerhorst E. J., Oppenheim F. G.: *J. Dent. Res.* 86, 680 (2007).
- Helmerhorst E. J., Alagl A. S., Siqueira W. L., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral. Biol.* 51, 1061 (2006).
- Yao Y., Lamkin M. S., Oppenheim F. G.: *J. Dent. Res.* 78, 1696 (1999).
- Lee Y. H., Zimmerman J. N., Custodio W., Xiao Y., Basiri T., Hatibovic-Kofman S., Siqueira W. L.: *PLoS One* 8, e67919 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0067919.
- De Smet K., Contreras R.: *Biotechnol. Lett.* 27, 1337 (2005).
- Fabian T. K., Hermann P., Beck A., Fejerdy P., Fabian G.: *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4295 (2012).
- Wiesner J., Vilcinskas A.: *Virulence* 1, 440 (2010).
- Gusman H., Travis J., Helmerhorst E. J., Potempa J., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Infect. Immun.* 69, 1402 (2001).
- Torres P., Castro M., Reyes M., Torres V. A.: *Oral Dis.* 24, 1150 (2018).
- Shimada T.: *J. Chem. Ecol.* 32, 1149 (2006).
- Williamson M. P.: *Biochem. J.* 297 (Pt 2), 249 (1994).
- Bennick A.: *J. Dent. Res.* 66, 457 (1987).
- Murray N. J., Williamson M. P.: *Eur. J. Biochem.* 219, 915 (1994).
- Bennick A.: *Mol. Cell. Biochem.* 45, 83 (1982).
- Hay D. I., Bennick A., Schlesinger D. H., Minaguchi K., Madapallimattam G., Schluckebier S. K.: *Biochem. J.* 255, 15 (1988).
- Messana I. a 19 spoluautorů: *Mol. Cell. Proteomics* 7, 911 (2008).
- Hay D. I., Moreno E. C., v knize: *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology* (Tenovuo J. O., ed.), svazek I, kapitola 5, str. 131. CRC Press, Boca Raton 1989.
- Inzitari R., Cabras T., Onnis G., Olmi C., Mastinu A., Sanna M. T., Pellegrini M. G., Castagnola M., Messana I.: *Proteomics* 5, 805 (2005).
- Manconi B., Castagnola M., Cabras T., Olinas A., Vitali A., Desiderio C., Sanna M. T., Messana I.: *J. Proteomics* 134, 47 (2016).
- Padiglia A., Orru R., Boroumand M., Olinas A.: *J. Proteome Res.* 17, 3292 (2018).
- Schenkels L. C., Veerman E. C., Nieuw Amerongen A. V.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 161 (1995).
- Cabras T., Pisano E., Boi R., Olinas A., Manconi B., Inzitari R., Fanali C., Giardina B., Castagnola M., Messana I.: *J. Proteome Res.* 8, 4126 (2009).
- Minaguchi K., Madapallimattam G., Bennick A.: *Biochem. J.* 250, 171 (1988).
- Bennick A., Chau G., Goodlin R., Abrams S., Tustian D., Madapallimattam G.: *Arch. Oral Biol.* 28, 19 (1983).
- Hannig C., Hannig M., Kensche A., Carpenter G.: *Arch. Oral Biol.* 80, 144 (2017).
- Yakubov G., Gibbins H. B., Proctor G., Carpenter G., v knize: *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems* (Khutoryanskiy V. V., ed.), str. 1. J. Wiley, Chichester 2014.
- Hay D. I., Carlson E. R., Schluckebier S. K., Moreno

- E. C., Schlesinger D. H.: *Calcif. Tissue Int.* 40, 126 (1987).
48. Lu Y., Bennick A.: *Arch. Oral Biol.* 43, 717 (1998).
 49. Bennick A.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 184 (2002).
 50. Schlesinger D. H., Hay D. I.: *J. Biol. Chem.* 252, 1689 (1977).
 51. Raj P. A., Johnsson M., Levine M. J., Nancollas G. H.: *J. Biol. Chem.* 267, 5968 (1992).
 52. Jensen J. L., Lamkin M. S., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral Biol.* 36, 529 (1991).
 53. Goobes G. a 11 spoluaautorů: *Magn. Reson. Chem.* 45, S32 (2007).
 54. Stayton P. S., Drobny G. P., Shaw W. J., Long J. R., Gilbert M.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 370 (2003).
 55. Azen E. A., Hellekant G., Sabatini L. M., Warner T. F.: *J. Dent. Res.* 69, 1724 (1990).
 56. Castagnola M. a 11 spoluaautorů: *Biol. Rhythm Res.* 33, 213 (2002).
 57. Li J., Helmerhorst E. J., Yao Y., Nunn M. E., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral Biol.* 49, 379 (2004).
 58. Iontcheva I., Oppenheim F. G., Troxler R. F.: *J. Dent. Res.* 76, 734 (1997).
 59. Hay D. I., Smith D. J., Schluckebier S. K., Moreno E. C.: *J. Dent. Res.* 63, 857 (1984).
 60. Schwartz S. S., Hay D. I., Schluckebier S. K.: *Calcif. Tissue Int.* 50, 511 (1992).
 61. Hay D. I., Moreno E. C., Schlesinger D. H.: *Inorg. Perspect. Biol.* 2, 271 (1979).
 62. Proctor G. B., Hamdan S., Carpenter G. H., Wilde P.: *Biochem. J.* 389, 111 (2005).
 63. Amano A., Sojar H. T., Lee J. Y., Sharma A., Levine M. J., Genco R. J.: *Infect. Immun.* 62, 3372 (1994).
 64. Goobes G., Goobes R., Schueler-Furman O., Baker D., Stayton P. S., Drobny G. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16083 (2006).
 65. Humphrey S. P., Williamson R. T.: *J. Prosthet. Dent.* 85, 162 (2001).
 66. Douglas W. H., Reeh E. S., Ramasubbu N., Raj P. A., Bhandary K. K., Levine M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 91 (1991).
 67. Ramasubbu N., Thomas L. M., Bhandary K. K., Levine M. J.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 363 (1993).
- L. Fialová** (*Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University, and General University Hospital in Prague, Prague*): **Salivary Peptides and Proteins, Their Structure and Importance in the Oral Cavity**
- Proteins and peptides represent important components of saliva. A wide spectrum of their effects is necessary for physiological function of the oral cavity. The aim of the article is to provide review information on selected groups of salivary proteins and peptides, namely histatins, proline-rich proteins and statherin. Attention is paid to their structure, behavior in the mouth and functions.
- Keywords:** histatin, proline-rich proteins, saliva, statherin
- Acknowledgements**
This work was supported by projects PROGRES Q25 and RVO VF64165, General University Hospital in Prague from the Ministry of Health of the Czech Republic.

ENDOFYTY IZOLOVANÉ Z RÉVY VINNÉ (*Vitis vinifera*)

ADÉLA MARKOVÁ, LUCIA GHARWALOVÁ,
MARIA VRUBLEVSKAYA a IRENA
KOLOUCHOVÁ

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

Došlo 2.12.18, přijato 25.3.19.

Klíčová slova: endofyty, sekundární metabolity, *Vitis
vinifera*

Obsah

1. Charakteristika *Vitis vinifera*
2. Antioxidační sloučeniny *Vitis vinifera*
3. Endofyty
 - 3.1. Sekundární metabolity endofytů
4. Endofyty *Vitis vinifera*
 - 4.1. Sekundární metabolity endofytů *Vitis vinifera*
5. Závěr

1. Charakteristika *Vitis vinifera*

Vitis vinifera neboli réva vinná patří do čeledi révovitých (*Vitaceae*). Tato čeleď zahrnuje několik desítek divokých druhů *Vitis* rozptýlených po Asii, Severní Americe (*Vitis labrusca*) a Evropě. První záznamy o révě byly nalezeny již v mladší době kamenné, proto ji řadíme mezi jednu z nejstarších kulturních rostlin. Většina odrůd *Vitis vinifera* je široce pěstována pro přímou konzumaci hroznů, moštu a především vína^{1–4}.

Vitis vinifera celosvětově pokrývá více než 7,16 miliónů hektarů, z čehož plocha evropských vinic představuje 3,56 miliónů hektarů⁵. V roce 2016 tvořila plocha vinic v Česku 17,7 tis. ha s produkcí 0,6 miliónu hl a dovoz vína činil 1,4 mil. hl (cit.⁶). Česká republika je minoritním producentem vína ze světového i evropského pohledu, nicméně ji to nijak zvlášť neubírá na jedinečnosti. Svými specifickými a spíše severně rozkládajícími se vinařskými oblastmi se zařazuje ke státům s tzv. „cool climate viticulture“ (vinohradnictví chladného podnebí). Právě časté výkyvy teplot a chladné klima mají za důsledek příznivější podmínky pro rozvoj fenolických látek uvnitř hroznů⁷.

Z hlediska morfologie dělíme révu na nadzemní a podzemní část (kořenový systém). Nadzemní část je tvo-

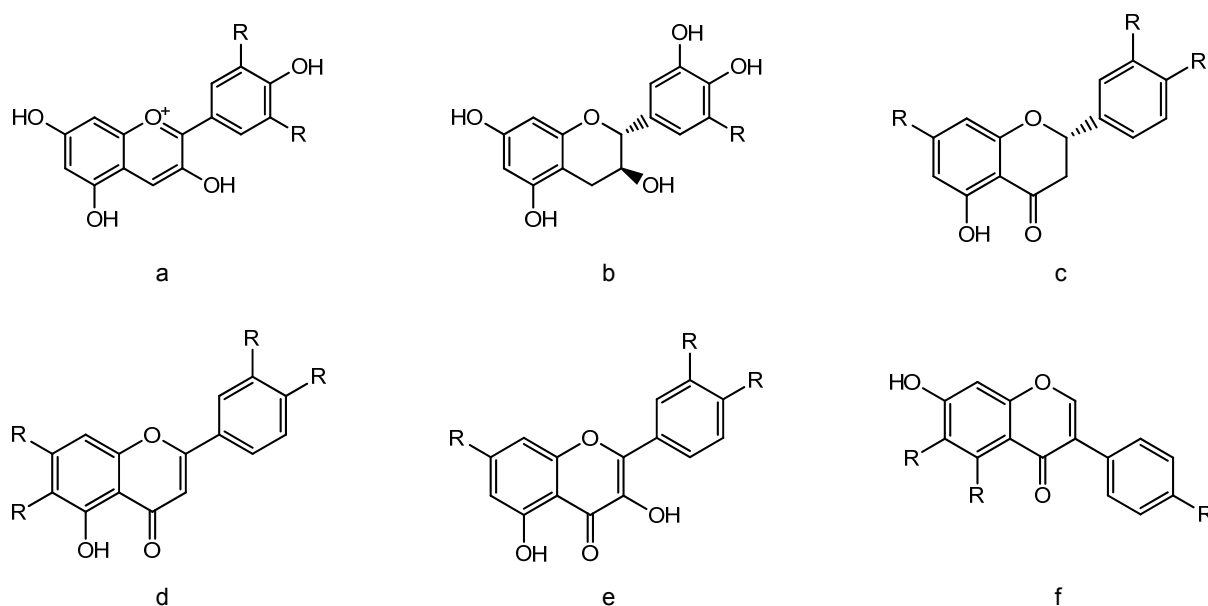
řena dřevnatými (kmen, kordonová ramena, dvouleté a jednoleté dřevo) a zelenými částmi. Jednoleté dřevo nebo také letorost na sobě nese pupeny (očka), ze kterých se později vytváří nové letorosty, dále listy, zálistky (fazochoy), květenství, úponky a hrozny se stopkou, třapinou a bobulemi (slupka, dužina, semena). Kořenový systém je tvořen kmenem, z něhož vystupují hlavní, vedlejší a povrchové kořeny.

2. Antioxidační sloučeniny *Vitis vinifera*

Reaktivní formy kyslíku a volné radikály hrají důležitou roli v buněčném poškození a onemocněních souvisejících s procesem stárnutí⁸. Bylo prokázáno, že antioxidační sloučeniny jsou hlavními činiteli, které významně snižují škodlivé účinky reaktivních forem kyslíku jejich neutralizací a mohou zabránit výskytu degenerativních procesů, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění či diabetes⁹. Antioxidační sloučeniny zahrnují vitaminy, fenoly, karotenoidy a flavonoidy. K flavonoidům řadíme: flavony, isoflavony, flavanony, flavonoly, anthokyanidiny a katechiny (obr. 1), které jsou svými účinky řazeny mezi nej důležitější sloučeniny s významnou antioxidační aktivitou¹⁰.

Obecně mohou být antioxidanty rozděleny do dvou hlavních skupin na syntetické a přírodní druhy. Zatímco syntetické antioxidanty jako butylhydroxyanisol (BHA) a butylhydroxytoluen (BHT) jsou běžně v potravinářství používány jako aditiva pro zvýšení trvanlivosti¹¹, přírodní antioxidanty mají především ochranné účinky proti určitým lidským chorobám¹². Jedná se hlavně o antioxidanty rostlinného původu – zdroji jsou plody a jejich dužina, semena nebo slupka¹³. Hlavními skupinami přírodních antioxidačních sloučenin v přírodě, zejména rostlinného původu, jsou flavonoidy a fenolové kyseliny. Tyto sloučeniny byly identifikovány a kvantifikovány u několika druhů ovoce a zeleniny a vykazovaly vysokou korelaci s antioxidační aktivitou¹⁴.

Hrozny *Vitis vinifera* obsahují značné množství různých fenolických sloučenin v listech, slupce, dužině a semenech, které mohou vykazovat biologické vlastnosti spojené s antioxidačním charakterem¹⁵. Kromě toho anthokyanidiny, patřící do jedné z hlavních skupin flavonoidů, jsou výhradně přítomny v buněčných stěnách a vakuolách hroznů (jejich slupek) a přímo předurčují barvu hroznů. Semena hroznů jsou bohatými zdroji monomerních fenolických sloučenin, jako jsou (+)-katechiny, (–)-epikatechin, (–)-epikatechin-3-gallát a dalších látek, které mají antimutagenní a antivirové účinky¹⁶. Koncentrace fenolických sloučenin v hroznech závisí na odrůdě révy a je též ovlivňována klimatickými a geografickými faktory, agrotechnickými po-



Obr. 1. Chemická struktura flavonoidů: a – anthokyanidiny, b – flavan-3-oly (katechiny), c – flavanony, d – flavony, e – flavonoly, f – isoflavony

stupy a fázi zralosti¹⁷. Při porovnávání fenolických sloučenin a antioxidačních profilů čínských odrůd révy a srovnání s evropskými hroznými a hroznými pocházejícími z Ameriky (muscadine) byl objeven významný rozdíl mezi celkovými fenoly a flavonoidy v semenech a slupce. Nejvíce fenolových sloučenin a antioxidačních vlastností měla semena *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon ($99,28 \pm 2,14 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{kg}_{\text{sušiny}}$) a *Vitis rotundifolia* (muscadine) ($68,29 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{kg}_{\text{sušiny}}$), zatímco orientální druhy *Vitis* jako Black Pearl ($40,20 \pm 0,97 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{kg}_{\text{sušiny}}$) a Sangye ($41,21 \pm 1,24 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{kg}_{\text{sušiny}}$) měly nejvyšší obsah fenolových sloučenin ve slupkách¹⁸. Také bylo potvrzeno, že rozdíly v celkovém obsahu fenolových sloučenin a flavonoidů mezi odrůdami závisí na barvě hroznů¹⁹.

3. Endofyty

Význam slova endofyt pochází z řeckých složenin *endo* (vnitřní) a *phyton* (rostlina)²⁰, avšak tyto mikroorganismy jsou charakterizovány rozličnými definicemi. Poměrně nedávná definice popisuje endofyty jako všechny mikroorganismy, které jsou schopny kolonizovat během celého nebo části svého života vnitřní rostlinné tkáň²¹. Další definice podle Hallmann a spol.²² endofyty vymezuje jako mikroorganismy žijící uvnitř pletiv rostlin, které nemají negativní vliv na rostlinný růst a po sterilování povrchu je lze z rostliny izolovat. Endofyty mohou být pro rostlinu buď neutrálními mikroorganismy, komenzály nebo také parazity. Jednotlivé typy vztahů mohou být

ovlivněny vnějšími vlivy, jako jsou např. klimatické změny^{23,24}. Tato rozsáhlá skupina obsahuje viry, bakterie a houby²⁵.

Endofyty mohou rostliny osidlovat proniknutím přes řízky, nebo jejich jiné vegetativní orgány, avšak především se jedná o vstup semen²⁶. Endofytické bakterie byly izolovány z odlišných rostlinných tkání, jako jsou kořeny, stonky, listy, květy a semena^{27,28}. Konkrétně rhizosférické bakterie jsou specifické, protože mohou proniknout, kolonizovat a přežít v kořenech, ze kterých se mohou přesunout do dalších částí rostliny, kde si nicméně stále zachovávají své endofytické chování^{29,30}.

3.1. Sekundární metabolity endofytů

Jako antagonisté mohou některé endofyty přispívat k omezení nebo potlačení růstu patogenů³¹, resp. značná část endofytů je schopna produkovat biotechnologicky významné látky, jako jsou protinádorová léčiva a antibiotika³². Endofyty hub byly primárně zkoumány pro jejich roli promotorů růstu rostlin, biokontrolních činitelů³³, aktivátorů bioremediace pomocí rostlin³⁴ a producentů enzymů³⁵ nebo nových sekundárních metabolitů³⁶.

Studie Schulz a spol.³⁷, při které bylo za 12 let studie izolováno 6500 endofytických hub, prokázala, že z testovaných sekundárních metabolitů endofytů bylo 51 % dosud neznámých bioaktivních látek, zatímco u 2800 půdních mikrobů bylo toto číslo jen 38 %.

Jedním ze známých sekundárních metabolitů je paclitaxel³⁸. Paclitaxel je vysoce oxidovaný diterpenoid, který

byl poprvé izolován z kůry pacifického tisů *Taxus brevifolia*. Pro své protinádorové účinky byl v 90. letech minulého století z tohoto tisů hojně izolován až do té míry, že rostlině hrozilo vymření. Pravděpodobným horizontálním přenosem genu z hostitele *Taxus brevifolia* na endofyty *Pestalotiopsis guepini*, *Seimatoantlerium tepuiense* a *Taxomyces andreanae* se u těchto hub prokazatelně objevila produkce bioaktivního paclitaxelu^{39,40}.

Dvouděložné rostliny z čeledi *Convolvulaceae* včetně obvyklých druhů *Ipomoea* jsou významné díky produkci námelových alkaloidů v semenech. Bylo zjištěno, že alkaloidy jsou produkovány endofyty hub z čeledi *Clavicipitaceae*⁴¹, protože rostliny, které byly ošetřeny fungicidními látkami, neobsahují ani vláknité houby, ani alkaloidy⁴².

Studie zaměřené na *Theobroma cacao* (kakao) prokázaly, že endofytické houby mohou snížit poškození patogeny *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri* a *Moniliophthora perniciosa*. Nejčastějším principem sledovaného mechanismu endofytických hub byla kompetice o substrát, kromě toho část zkoumaných mikroorganismů také vykazovala antibiózu (parazitismus *Trichoderma* na *M. roreri*) proti výše zmíněným patogenům *P. palmivora*, *M. roreri* a *M. perniciosa*^{43–45}.

Známými producenty sekundárních metabolitů jsou vláknité houby rodu *Monascus*, které produkují pigmenty, monakoliny a ankalaktony⁴⁶. Hledání přírodních potravinových barviv vedlo k znovuoobnovení zájmu o pigmenty hub *Monascus purpureus* a též *M. anka* nebo *M. kaoliang*. Tento mikroorganismus je v Asii používán k barvení a aromatizaci potravin a nápojů již mnoho staletí. *M. purpureus* produkuje strukturálně příbuzné pigmenty, které se barevně rozlišují od červené až po žlutou⁴⁷. Červená rýže fermentovaná druhem *Monascus purpureus* je ve východní Asii produktem, jenž se používá jako doplněk stravy pro podporu krevního oběhu snížením hladiny cholesterolu a triglyceridů v krvi. Neaktivnější sloučenina rýže, fermentované *M. purpureus*, monakolin K, dokáže v cestě biosyntézy cholesterolu inhibovat HMG-CoA reduktasu. Ve studiích se nicméně také ukázalo, že produkty fermentované červené rýže jsou sice prospěšné, ale nejsou úplně bez rizika. U několika pacientů, kteří lék z červené rýže užívali, se vyskytly problémy, jako je svalová myopatie, poškození ledvin či rabdomyolýza^{48–51}.

4. Endofyty *Vitis vinifera*

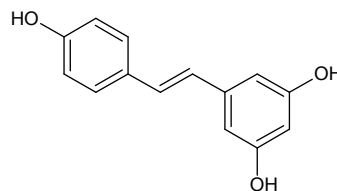
Réva vinná je hostitelem velmi rozmanitých endofytických bakterií patřících do rodů *Pseudomonas*, *Enterobacter* a *Bacillus*^{52,53}. Dosavadní hledání poznatků, které se zaměřovalo na společenství bakteriálních endofytů ve *Vitis vinifera*, popisuje citelné rozdíly mezi zdravými a nemocnými rostlinami^{54,55}, divokými a šlechtěnými odrůdami⁵⁶, odlišnými typy orgánů rostliny²⁸ a různými postupy ochrany proti škodlivým vlivům⁵⁷. Pokud jde o složení spektra houbové populace, jeho změna a možné patogenní působení často závisí na stáří rostliny a vegetačním období⁵⁸.

Mnoho studií prokázalo, že určité kmeny rhizobakterií podporují růst rostlin, zvláště ty, které patří do rodu *Bacillus* a *Pseudomonas*, se množí nejen na kořenech rostlin, ale také uvnitř kořenových tkání rostlinných druhů^{59–63}. Významnou skupinou rhizobakterií, u nichž se projevuje efekt pozitivní konkurence, jsou např. *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* nebo *Rhizobium*, kterým bylo rovněž dáno označení PGPR (z angl. „plant growth-promoting rhizobacteria“), neboť jsou přítomné v kořenových systémech, kde buď soutěží s patogeny o zdroje energie, nebo stimulují růst rostliny⁶⁴. Právě *Burkholderia phytofirmans* je pro *Vitis vinifera* důležitým endofytickým zástupcem, protože ji při interakci s buňkami révy chrání před *Botrytis cinerea* (plíseň šedá) tím, že vyvolá lokální imunitní odpověď rostliny⁶⁵.

4.1. Sekundární metabolity endofytů *Vitis vinifera*

Endofyty *Fusarium subglutinans* a *Tripterygium wilfordii*, které se nacházejí ve stoncích révy, produkují subglutininol A a diterpenové pyrony s imunosupresivní aktivitou^{66,67}. Další endofytní vláknitá houba rodu *Fusarium* produkuje metabolity, které mají aktivitu proti intravaskulární trombóze, která je hlavním důvodem kardiovaskulárního onemocnění⁶⁸.

Populárním antioxidantem, který můžeme nalézt kromě hroznů révy i v čokoládě a arašidech, je resveratrol (obr. 2). Jde o polyfenol a derivát stilbenů patřící mezi přírodní sekundární metabolity rostlin^{69,70}. V révě bylo prokázáno, že resveratrol mohou produkovat endofytické houby rodu *Botryosphaeria*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* a *Alternaria* jako vlastní sekundární metabolit⁷¹. Resveratrol existuje ve dvou isomerech *cis*- a *trans*-. Konkrétně u *trans*-resveratrolu bylo zjištěno hned několik příznivých účinků: při fyziologických koncentracích fungitoxické účinky proti *Botrytis cinerea*⁷², zvýšení odolnosti *Vitis vinifera* vůči ostatním patogenům, jako jsou *Plasmopara viticola*⁷³, *Phomopsis viticola*⁷⁴ a *Rhizopus stonifer*⁷⁵. Dále pozitivní korelace ve vzorcích vína (jižní Itálie) mezi ochratoxiny a celkovými stilbeny, stejně tak jako mezi ochratoxiny a celkovým resveratrolem, což pravděpodobně ukazuje na fakt, že produkce ochratoxinů nebo infekce danými fytopatogeny stimuluje syntézu stilbenů^{76,77}. Pro boj s patogeny révy je důležité nalézt takové aplikační látky, které by zamezily růstu a sporulaci a produkci mykotoxinů, stimulovaly sekundární metabolismus endofytů,



Obr. 2. Chemická struktura *trans*-resveratrolu (*trans*-3,4',5'-trihydroxystilben)

a zároveň neměly vliv na organoleptické vlastnosti hroznů. Proto právě resveratrol by mohl být potenciální látkou, která by svými fungicidními a antioxidačními vlastnostmi mohla vnést nové možnosti při výrobě přírodních pesticidů⁷⁸.

Vláknitá houba *Acremonium byssoides* osidluje *Vitis vinifera* bez viditelného účinku a byla popsána jako antagonist plísně *Plasmopara viticola*⁷⁴. Jde o schopnost *A. byssoides* inhibovat klíčení spor *P. viticola*, díky produkci sekundárních metabolitů (akreminy A-F)⁸⁰.

5. Závěr

Endofytické organismy žijí za určitých podmínek v rostlinných tkáních bez nežádoucího vlivu na jejich hostitele a jsou podstatnými částmi rostlinného mikrobiomu. Endofyty působí na další mikroorganismy, které osidlují rostlinné tkáně. Některé z houbových endofytů mohou ovlivňovat růst rostlin jako reakci na změny životního prostředí či patogeny, jiné produkují užitečné nebo neobvyklé sekundární metabolity. Právě *Vitis vinifera* se díky své rozšířené světové produkci stává vhodným a prospěšným modelem pro sledování diverzity endofytů. Endofyty révy vinné produkují množství sekundárních metabolitů s antioxidačními či antimikrobiálními účinky a je tedy možné uvažovat o jejich širším využití např. v zemědělství či farmacii.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (GAČR) 18-26463S.

LITERATURA

- Rossetto M., McNally J., Henry R. J.: Theor. Appl. Genet. 104, 61 (2002).
- Sefc K. M., Steinkellner H., Lefort F., Botta R., da Câmara Machado A., Borrego J., Maletić E., Glössl J.: Am. J. Enol. Vitic. 54, 15 (2003).
- Crespan M.: Theor. Appl. Genet. 108, 231 (2004).
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangel G., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F.: Theor. Appl. Genet. 109, 1448 (2004).
- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, staženo 08.11. 2018.
- International Organisation of Vine and Wine: 2017 Global Economic Vitiviniculture Data. <http://www.oiv.int/public/medias/5686/ptconj-octobre2017-en.pdf>, staženo 13.11. 2018.
- Smidrkal J., Filip V., Melzoch K., Hanzlikova I., Buckiova D., Kriza B.: Chem. Listy 95, 602 (2001).
- Lee J., Koo N., Min D. B.: Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 3, 21 (2004).
- Gengaihi S., Ella F., Emad M., Shalaby E., Doha H.: J. Food Process. Technol. 5, e1000296 (2014).
- Wang H., Cao G., Prior R. L.: J. Agric. Food Chem. 45, 304 (1997).
- Baydar N. G., Özkan G., Yaşar S.: Food Control 18, 1131 (2007).
- Orak H. H.: Sci. Hortic. 111, 235 (2007).
- Naczek M., Shahidi F.: J. Pharm. Biomed. Anal. 41, (2006).
- Einbond L. S., Reynertson K. A., Luo X. D., Basile M. J., Kennelly E. J.: Food Chem. 84, 23 (2004).
- Casazza A. A., Aliakbarian B., Mantegna S., Cravotto G., Perego P.: J. Food Eng. 100, 50 (2010).
- Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N.: J. Agric. Food Chem. 46, 1460 (1998).
- Obrique-Slier E., Pena-Neira A., Lopez-Solis R., Zamora-Marin F., Ricardo-da Silva J. M., Laureano O.: J. Agric. Food Chem. 58, 3591 (2010).
- Xu C., Zhang Y., Cao L., Lu J.: Food Chem. 119, 1557 (2010).
- Kedage V. V., Tilak J. C., Dixit G. B., Devasagayam T. P., Mhatre M.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47, 175 (2007).
- Maheshwari D. K. (ed.): *Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems*. Springer Science & Business Media, Berlin 2011.
- Hardoim P. R., Van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 293 (2015).
- Hallmann J., Quadl-Hallmann A., Mahaffee W., Kloepper J.: Can. J. Microbiol. 43, 895 (1997).
- Porras-Alfaro A., Bayman P.: Annu. Rev. Phytopathol. 49, 291 (2011).
- Menpara D., Chanda S. (ed.): *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*. Formatex Research Center, Badajoz 2013.
- Pancher M., Ceol M., Corneo P. E., Longa C. M. O., Yousaf S., Pertot I., Campisano A.: Appl. Environ. Microbiol. 78, 4308 (2012).
- Barka E. A., Gognies S., Nowak J., Audran J.-C., Belarbi A.: Biol. Control 24, 135 (2002).
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E.: Mol. Plant-Microbe Interact. 19, 827 (2006).
- Compant S., Mitter B., Colli-Mull J. G., Gangl H., Sessitsch A.: Microb. Ecol. 62, 188 (2011).
- Böhm M., Hurek T., Reinhold-Hurek B.: Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 526 (2007).
- Compant S., Clément C., Sessitsch A.: Soil Biol. Biochem. 42, 669 (2010).
- Larrán S., Mónaco C., v knize: *Management of fungal plant pathogens* (A. Arya and A.E. Perello, ed.) kap. 12. CABI Press, Preston, UK 2010.
- Musetti R., Polizzotto R., Grisan S., Martini M., Borselli S., Carraro L., Osler R.: Bull. Insectology 60, 293 (2007).
- Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F., Osler R.: Plant Dis. 93, 993 (2009).
- Russell J. R., Huang J., Anand P., Kucera K., Sando-

- val A. G., Dantzler K. W., Hickman D., Jee J., Kimovec F. M., Koppstein D.: *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6076 (2011).
35. Rajulu M. B. G., Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan T. S., Ravishankar J. P., El Gueddari N. E., Morschbacher B. M.: *Fungal Divers.* **47**, 43 (2011).
 36. Zhao J., Shan T., Mou Y., Zhou L.: *Mini-Rev. Med. Chem.* **11**, 159 (2011).
 37. Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. K., Krohn K.: *Mycol. Res.* **106**, 996 (2002).
 38. Strobel G., Daisy B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 491 (2003).
 39. Heinig U., Jennewein S.: *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 1370 (2009).
 40. Stierle A., Strobel G., Stierle D.: *Science* **260**, 214 (1993).
 41. Kucht S., Groß J., Hussein Y., Grothe T., Keller U., Basar S., König W. A., Steiner U., Leistner E.: *Planta* **219**, 619 (2004).
 42. Ahimsa-Müller M. A., Markert A., Hellwig S., Knoop V., Steiner U., Drewke C., Leistner E.: *J. Nat. Prod.* **70**, 1955 (2007).
 43. Arnold A. E., Herre E. A.: *Mycologia* **95**, 388 (2003).
 44. Arnold A. E., Mejía L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N., Herre E. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15649 (2003).
 45. Mejía L. C., Rojas E. I., Maynard Z., Van Bael S., Arnold A. E., Hebban P., Samuels G. J., Robbins N., Herre E. A.: *Biol. Control* **46**, 4 (2008).
 46. Jůzlová P., Martinková L., Křen V.: *J. Ind. Microbiol.* **16**, 163 (1996).
 47. Chen M.-H., Johns M. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 132 (1993).
 48. Bunnay A., Saenphet K., Lumyong S., Saenphet S., Chomdej S.: *BMC Complement. Altern. Med.* **15**, 88 (2015).
 49. Edwards C., Hart D., Spector T.: *Lancet* **355**, 2218 (2000).
 50. Jick H., Zornberg G. L., Jick S. S., Seshadri S., Drachman D. A.: *Lancet* **356**, 1627 (2000).
 51. Klimek M., Wang S., Ogunkanmi A.: *Pharm. Ther.* **34**, 313 (2009).
 52. Bell C., Dickie G., Harvey W., Chan J.: *Can. J. Microbiol.* **41**, 46 (1995).
 53. Thomas P.: *J. Appl. Microbiol.* **97**, 114 (2004).
 54. Bulgari D., Casati P., Brusetti L., Quaglino F., Brasca M., Daffonchio D., Bianco P. A.: *J. Microbiol.* **47**, 393 (2009).
 55. Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., Bianco P. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5018 (2011).
 56. Campisano A., Panher M., Puopolo G., Puddu A., López-Fernández S., Biagini B., Yousaf S., Pertot I.: *Am. J. Enol. Vitic.* **66**, 12 (2015).
 57. Campisano A., Antonielli L., Panher M., Yousaf S., Pindo M., Pertot I.: *PLoS One* **9**, e112763 (2014).
 58. Novotny D.: *Sborník příspěvků z workshopu MICRO-MYCO, 4.-5.9. 2007*. České Budějovice (A. Nováková ed.), str. 97, Praha, Česká republika 2007.
 59. Peer R. V., Schippers B.: *Can. J. Microbiol.* **35**, 456 (1989).
 60. Van Peer R., Punte H. L., de Weger L. A., Schippers B.: *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2462 (1990).
 61. Lalande R., Bissonnette N., Coutlée D., Antoun H.: *Plant Soil* **115**, 7 (1989).
 62. Pleban S., Ingel F., Chet I.: *Eur. J. Plant Pathol.* **101**, 665 (1995).
 63. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W.: *Can. J. Microbiol.* **43**, 895 (1997).
 64. Bouizgarne B., v knize: *Bacteria in agrobiolgy: Disease management* (Maheshwari D. K., ed.) kap. 2. Springer, Berlin 2013.
 65. Bordiec S. a 10 spoluatorů: *J. Exp. Bot.* **62**, 595 (2011).
 66. Lee J. C., Lobkovsky E., Pliam N. B., Strobel G., Clardy J.: *J. Org.* **60**, 7076 (1995).
 67. Strobel G. A., Pliam N. B.: US08375362.
 68. Wu B., Wu L., Ruan L., Ge M., Chen D.: *Curr. Microbiol.* **58**, 522 (2009).
 69. Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M. E., Crozier A.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, (2002).
 70. Poltronieri P., Burbulis N., Fogher C. (ed.): *From plant genomics to plant biotechnology*. Woodhead Publishing, Woodhead, UK 2013.
 71. Shi J., Zeng Q., Liu Y., Pan Z.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 369 (2012).
 72. Adrian M., Rajaei H., Jeandet P., Veneau J., Bessis R.: *Phytopathology* **88**, 472 (1998).
 73. Dai G. H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 177 (1995).
 74. Hoos G., Blaich R.: *J. Phytopathol.* **129**, 102 (1990).
 75. Sarig P., Zutkhi Y., Monjauze A., Lisker N., Ben-Arie R.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**, 337 (1997).
 76. Perrone G., Nicoletti I., Pascale M., De Rossi A., De Girolamo A., Visconti A.: *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6807 (2007).
 77. Ponsone M. L., Chiotta M. L., Palazzini J. M., Combina M., Chulze S.: *Toxins* **4**, 372 (2012).
 78. Marin S., Guynot M., Neira P., Bernado M., Sanchis V., Ramos A.: *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 203 (2002).
 79. Burruano S., Alfonzo A., Piccolo S. L., Conigliaro G., Mondello V., Torta L., Moretti M., Assante G.: *Phytopathol. Mediterr.* **47**, 122 (2008).
 80. Assante G., Dallavalle S., Malpezzi L., Nasini G., Burruano S., Torta L.: *Tetrahedron* **61**, 7686 (2005).
- A. Marková, L. Gharwalová, M. Vrublevskaya, and I. Kolouchová** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Endophytes from Grapevine (*Vitis vinifera*)**
- Endophytes are microorganisms that colonize the internal tissues of plants and may have beneficial effects on plants such as growth promotion or resistance to biotic and abiotic stress. Endophytic bacteria and microscopic fibrous fungi were also isolated from grapevine (*V. vinifera*).

era). These organisms may not only have a positive effect on the vitality of host plants and promote their growth but also be a source of new and interesting secondary metabolites that could find use in pharmaceutical and food industry or agriculture.

Keywords: endophytes, secondary metabolites, *Vitis vinifera*

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Czech Science Foundation (GACR) (Grant number: 18-26463S).

OXYTOCIN A DALŠÍ PEPTIDOVÁ UTEROTONIKA: JEJICH PRAŽSKÉ OSUDY

VLADIMÍR PLISKA^a, ANTONÍN PAŘÍZEK^b
a MARTIN FLEGEL^c

^a Collegium Helveticum, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich & Universität Zürich, Schmelzbergstrasse 25, CH-8092 Zürich, ^b Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, Perinatologické centrum, Apolinářská 18, 128 51 Praha 2, ^c Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6
vladimir.pliska@biol.ethz.ch, martin.flegel@vscht.cz, parizek@porodnice.cz

Došlo 26.2.19, přijato 15.8.19.

Klíčová slova: oxytocin, vasopressin, neurohypofýza, endokrinologie – neurohypofyzární hormony, I. P. Pavlov, sekretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginin vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger

Historická poznámka: Hormony neurohypofýzy a počátky endokrinologie

Endokrinologie jako autonomní obor biomediciny byla ustanovena na zlomu 19. a 20. století, převážně zásluhou britských fyziologů. Pojem *hormon* poprvé použil v přednášce (Croonian Lecture) pro Royal College of Physicians of London v červnu 1905 fyziolog Ernest Henry Starling (1866–1927)¹. Hormonem označil látku produkovanou sekretorickou tkání, a která je transportovaná krevním oběhem do cílové tkáně, kde vyvolává funkční změny^a.

Starling tuto definici doložil pokusy se sekrecí pankreatu, které spolu s dalším významným londýnským fyziologem, Williamem Maddockem Baylissem (1860–1924), publikovali v roce 1902 (cit.²). Prokázali, že sekrece pankreatu, kterou vyvolali stimulací tenkého střeva (duodena)

kyselinou chlorovodíkovou, trvá i po úplné denervaci střeva. Dále zjistili, že extrakt takto stimulované střevní tkáně vyvolá i po jeho intravenózním podání u pankreatu stejnou sekretorickou reakci jako stimulace kyselinou či postprandiální stimulace duodena potravou. Tento první přesný popis humorální regulace, jako alternativy nervové regulace, měl mnohem širší význam v dalších výzkumech fyziologických procesů. Hypotetickou, částečně ovšem už tehdy předčistěnou stimulující látku, označili jako sekretin. Sekretin se proto v literatuře označuje jako první prokázaný hormon^b.

Ne ovšem zcela právem. Biologické účinky látek, později podle Starlingovy a Baylissovy definice identifikované jako hormony, byly totiž známy už dříve. V roce 1888 popsali Oskar Minkowski (1858–1931) a Josef (též Joseph) Freiherr von Mering (1849–1908)³ glykosurii u psů po odstranění pankreatu a otevřeli tím i cestu k pozdější identifikaci a izolaci inzulinu. V souvislosti s tehdejší zájmou o tzv. organoterapii^c studovali o několik let později, v roce 1895, londýnský praktický lékař George Oliver (1841–1915) a fyziolog Edward Albert Schäfer (též Sir Edward Albert Sharpley-Schafer, 1850–1935), pozdější profesor fyziologie na univerzitě v Edinburghu, fyziologické účinky extraktů nadledvinek, štítné žlázy, sleziny a hypofýzy^{4,5}. Zajímaly je jejich centrální účinky, u extraktů hypofýzy a nadledvinek především na zvýšení arteriálního tlaku v důsledku vazokonstrikce. William Harry Howell (1860–1945)⁶, profesor fyziologie na John-Hopkins University, E. A. Schäfer a (Thomas) Swale Vincent^d (1868–1933)⁷ pak lokalizovali účinné složky extraktů zadního laloku hypofýzy (1898–1899). Lze tedy říci, že Oliver, Schäfer, Howell a Vincent zavedli jako první do endokrinologického výzkumu biochemicko-farmakologické postupy. Funkce jednotlivých orgánů či tkání byly doposud studovány jejich chirurgickým odnětím (-ektomie). Hormony produkované neurohypofýzou oxytocin a vasopresin (později označovaný jako antidiuretický hormon – AHD) se tak významně zařadily do dějin endokrinologie.

^a Citát v Lancet¹ (s. 340) „...These chemical messengers [...] or ‘hormones’ (from *ὁρμάω*, I excite or arouse), as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream ...“

^b Bayliss a Starling docházejí v tomto sdělení k opačným závěrům než Ivan Petrovič Pavlov (1849–1936), který deklaroval přímou a výhradní roli nervového impulsu a přítomnosti chymu v duodenu na pankreatickou sekreci. Jeho nálezy diskutují kontroverzně a poukazují na existenci humorální regulace. Příspěvek Pavlova (Nobelova cena za fyziologii či medicínu v roce 1904, tedy dva roky po publikaci jejich výsledků) citují autoři se značným, plně kolegiálním respektem a oceněním. Nicméně nadepisují příslušnou kapitolu ve své publikaci titulem VII. *The normal mechanism, chemical or nervous?*

^c Organoterapii se označovalo používání tkáňových extraktů k terapeutickým účelům.

^d Britský fyziolog, později profesor fyziologie (University of Manitoba in Winnipeg, Kanada).

Uterokinetický účinek extraktů hypofýzy pak poprvé popsal v roce 1906 londýnský biochemik Sir Henry Hallett Dale (1875–1968)⁸, laktační efekt Isaac Ott (1847–1916) a John C. Scott⁹ z Medico-Chirurgical College ve Philadelphii. Peptidový charakter uterokinetické složky extraktů z neurohypofýzy se snažil prokázat Harold Ward Dudley (1887–1935) jejich inaktivací proteolytickými enzymy¹⁰. Avšak z pohledu dnešní enzymologie šlo spíše o závěry pokusů typu „right-for-the-wrong-reason“. Čisté enzymové preparáty ještě nebyly ve dvacátých letech 20. století většinou dostupné, proto Dudley referuje o rychlé inaktivaci extraktu z neurohypofýzy trypsinem na krysí děloze. Ve svých pokusech používal ale Pankreatin firmy Merck, tedy extrakt pankreatických enzymů z různých živočišných druhů. Pozdější měření potvrdily, že oxytocin není enzymově čistým trypsinem štěpitelný. Dudleyovy výsledky by bylo možno vysvětlit enzymologicky netypickým štěpením oxytocinu mezi oběma koncovými aminokyselinami (leucinem v poloze 8 a glycinamidem v poloze 9) chymotrypsinem¹¹, neboť chymotrypsin byl totiž téměř jistě v použitém preparátu obsažen.

Tuto průkopnickou epochu pak uzavírá pečlivá práce výzkumníků z laboratoří firmy Parke, Davis and Co. v Detroitu (Michigan). Oliver Kamm se spolupracovníky¹² zde rozdělili v roce 1928 složitým pracovním postupem – opakovanou precipitací, vysolováním a extrakcí do organických rozpouštědel – neurohypofyzární extrakt na dvě frakce, jedna vykazovala převážně uterokinetickou a druhá více vazokonstrikční aktivitu. Dále odhadli (z rychlosti difuze) molekulovou hmotnost uterokinetické substance na 600 Da (později přesně potvrzená molekulová hmotnost oxytocinu činí 1007 Da) a naznačili, že vazokonstrikční komponenta vykazuje též antidiuretickou aktivitu. Patrně ještě vyšší čistoty obou frakcí dosáhli v polovině třicátých let R. M. Stehle a A. L. Fraser¹³. Protiprouděním vytřepáváním v systému voda/2-butanol (techniku zavedl Lyman C. Craig v roce 1944, cit.¹⁴) získal pak Arthur H. Livermore a Vincent du Vigneaud¹⁵ čistou substanci s vysokou uterokinetickou aktivitou. Tento preparát použil pak na počátku 50. let du Vigneaud (1901–1978) a jeho spolupracovníci tzv. Edmanovým odbouráváním¹⁶ k určení struktury a jako standard při syntéze oxytocinu^{17,18}.

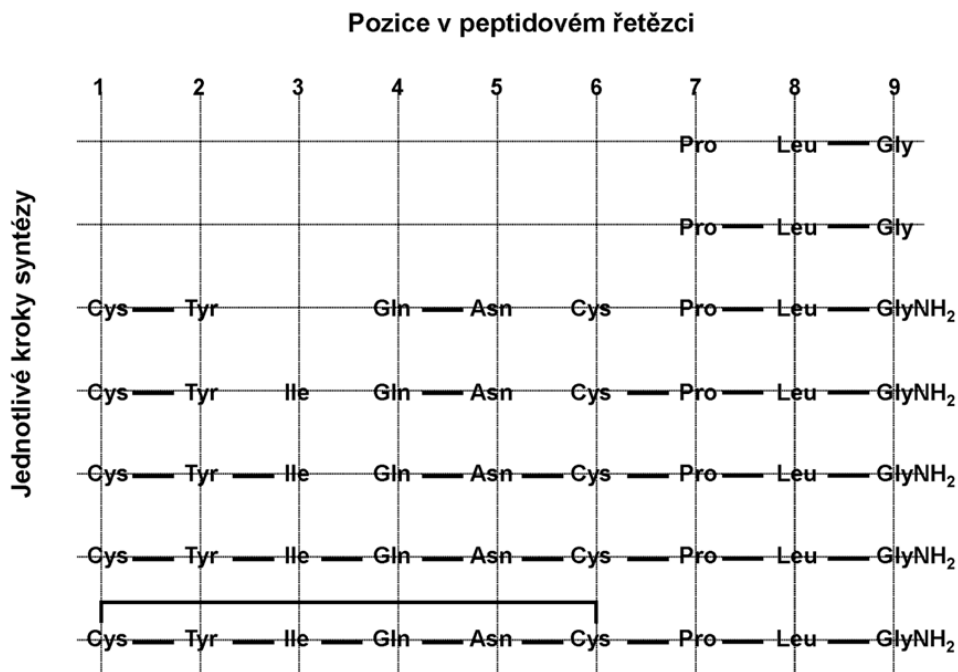
Du Vigneaud a jeho početný tým spolupracovníků z Cornell University Medical College (Ithaka, NY) má pak jednoznačnou zásluhu na první chemické syntéze vasopresinu a oxytocinu. Tato du Vigneaudova práce byla záhy, v roce 1955, oceněna Nobelovou cenou za chemii.

Laudatio Nobelovy komise plně vystihuje jeho zásluhy – a zároveň ovšem i zásluhy jeho spolupracovníků: „... *for his work on biochemically important sulphur compounds, especially for the first synthesis of a polypeptide hormone...*“ Pokud jde však o určení struktury, zvládl totéž v mnohem skromnějších technických a finančních podmínkách, než jaké měla k dispozici du Vigneaudova skupina, ve stejné době mladý rakouský biochemik Hans Tuppy (*1924) spolu se svým tehdejší spolupracovníkem H. Michlem. Stalo se tak téměř paralelně s du Vigneaudem. Určil sekvenci aminokyselin oxytocinu u méně čistého oxytocinového preparátu chromatografickou metodou^{19,20,e}. Zásluha o určení struktury oxytocinu, což byl ve své době unikátní vědecký výkon, nepatří tedy výhradně du Vigneaudovi, ale i H. Tuppymu. Du Vigneaud tento fakt ve zmíněné přednášce při přebírání Nobelovy ceny přešel pouze bagatelizující poznámkou^{22,f}.

V následujících letech uveřejnilo několik laboratoří alternativní metody syntézy oxytocinu, jejichž syntetická schémata shrnul do názorných diagramů R. A. Boissonas a St. Guttmann (Sandoz A. G., Basel)²³. Jednou z nich byla elegantní syntéza vypracovaná v roce 1956 v Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd (dále také ÚOCHB) Josefem Rudingerem (1924–1975) a jeho spolupracovníky Janem Honzlem a Milanem Zaoralem^{24,25}. Oproti du Vigneaudově syntéze se tato „pražská metoda“, spolu se syntézou oxytocinu z laboratoří Sandoz (R. A. Boissonas a spol.²⁶), projevila jako zvlášť metodicky výhodná a více uživatelsky praktická. „Stavebnicový“ postup, takzvané „trojkové“ schéma (obr. 1), pozůstávající ve spojování kratších peptidů (tripeptidů), navrhla jako alternativu k poněkud náročnému postupu du Vigneauda v následujících letech řada dalších autorů. Syntéza strukturních analogů neurohypofyzárních peptidů tím byla usnadněna a zrychlena. Diagram její verze použité Rudingerem a spolupracovníky je na obr. 1. Tato strategie ve farmakologii peptidů rovněž velice usnadnila studium vztahu závislosti mezi strukturou látky a jejími biologickými aktivitami. Endokrinologické charakteristiky, izolace a syntetické práce na obou hlavních hormonech neurohypofýzy – oxytocinu a arginin- či lysin-vasopresinu – probíhaly paralelně. I projekty syntézy analogů vycházely ze stejných či velmi podobných strategií. V době po publikaci prvních syntéz se jejich autoři převážně soustředili na izolované změny struktury jednotlivých pozic peptidového řetězce. Kombinace aminokyselin v jednom peptidovém řetězci vedly později k přípravě klinicky pozoruhodných farmak.

^e Hans Tuppy měl již v tomto oboru nejen zkušenosti, ale i významné výsledky: Na roční stáži v roce 1949 určil v laboratoři F. Sanger v Cambridge strukturu B-řetězce inzulínu. Frederick Sanger jeho podstatný příspěvek ke struktuře inzulínu s uznáním zdůraznil ve své první nobelovské přednášce²¹ (cena za chemii 1958): „... *the work on fraction B progressed so favourably and Tuppy worked so hard that by the end of the year we were virtually able to deduce the whole of the sequence of its 30 residues.*“

^f Cit. ²²: „*It is of considerable interest that Tuppy, on the basis of data we had published along with some data of his own, arrived at the same structure independently. Tuppy's proposal was based on the data from our laboratory on composition, molecular weight, terminal groups, as worked out by our use of the Sanger dinitrophenyl end group procedure ...*“



Obr. 1. Postup syntézy oxytocinu použitý skupinou Josefa Rudingera v roce 1954. Naznačeno je v jednotlivých stupních syntézy (svislá osa) postupné propojení jednotlivých komponent daného stupně (aminokyselin a peptidů ze stupně předcházejícího). Předposlední stupeň je „lineární“ oxytocin s cysteinem v poloze 1 a 6. Aktivní oxytocin je získán jeho oxidací (uzavření disulfidového můstku). Chránící skupiny v jednotlivých stupních nejsou znázorněny, jsou znázorněny ve schématu v cit.²³

Strukturní analogy neurohypofyzárních peptidů a farmakologické strategie

Pražská „stavebnicová“ syntéza oxytocinu a strukturně obměněných molekul v oxytocinu „v roztoku“ je v průmyslové výrobě používána často dodnes. Po zavedení pozdější a dnes široce používané syntézy v „pevné fázi“ Brucem R. Merrifieldem (1921–2006), který obdržel Nobelovu cenu za chemii roku 1984, byla u některých léčivých látek tohoto typu zvolena pak tato metoda z hlediska správné výrobní praxe jako výhodnější. Problém dostupnosti a strategie volby analogů se později přesunuly do oblasti farmakologie a biochemie. Při studiu závislosti mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR – structure-activity relationships) neurohypofyzárních peptidů se v následujících „pionýrských“ letech jednotlivé výzkumné laboratoře zaměřily na různé cíle.

1. Vliv jednotlivých funkčních skupin či vazeb v peptidickém řetězci

„Intuitivní“ postup („trial-and-error“) použila především du Vigneaudova skupina. Cílem bylo zjistit vliv jednotlivých funkčních skupin či vazeb v peptidovém řetězci

pomocí jejich modifikace či jejich vypuštěním. Tak byly získány první zajímavé analogy – jako příklad uveďme 2-*O*-methyltyrosin-oxytocin²⁷ a 2-*D*-tyrosin-oxytocin (substituce enantiomeru *L*-tyrosinu za *D*-formu). Především tak ale vznikly podklady pro další racionální postupy pro analýzu SAR.

2. Biologická aktivita jednotlivých analogů

Dalším cílem bylo studium spekter biologických aktivit jednotlivých analogů. Pro neurohypofyzární peptidy je typické, že vykazují pluripotentní aktivitu. Mají v různých proporcích uterokinetické, laktační, vazopresorické a anti-diuretické účinky (a další, spíše farmakologicky zajímavé, účinky). Změna spektra aktivity biologických účinků se stala zájmem i základního výzkumu. Posun aktivit ve prospěch jedné z nich je často klinicky žádaný.

Dva příklady:

1) Analoga se zvýšeným poměrem vazopresorického/anti-diuretického účinku (analoga vasopresinu) syntetizovali R. A. Boissonnas, W. Doerpfner, St. Guttman, K. Saameli a E. Stürmer ve výzkumných laboratořích firmy Sandoz v Basileji^{28,29}. Klinicky významný byl svého času Octapressin® (2-fenylalanin-8-lysin-vasopresin),

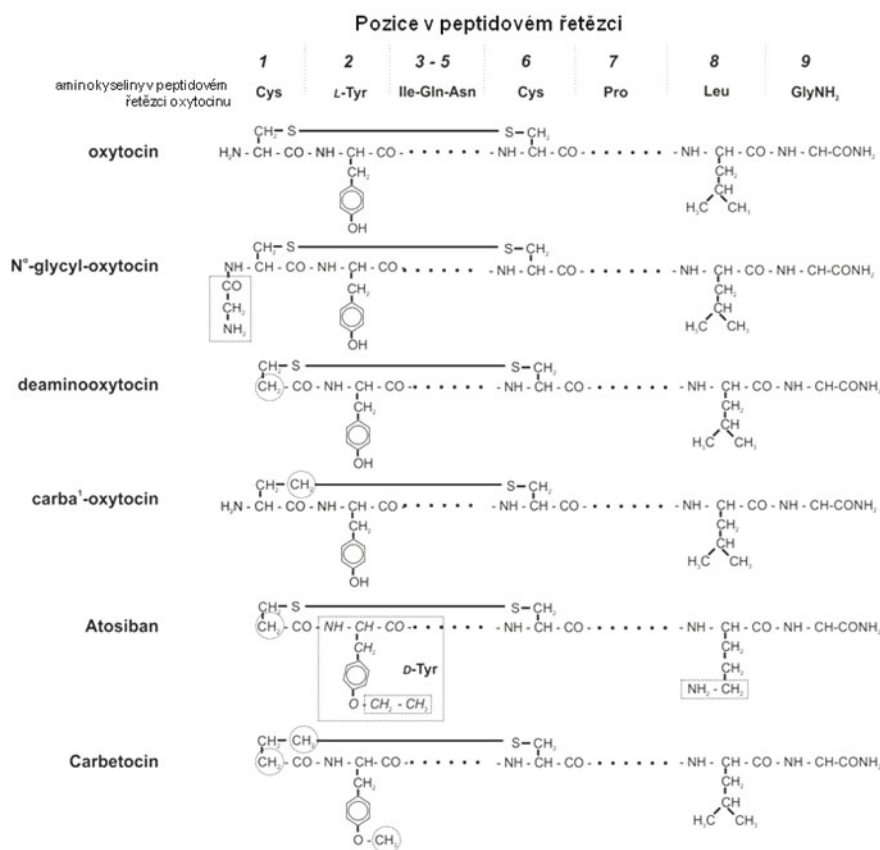
vykazující poměr vazopresorická/antidiuretická aktivita 2,5[§], užívaný při lokální anestezii. Přidání této látky k lokálnímu anestetiku způsobilo vazokonstrikci a tím prodloužený anestetický účinek a nižší potřebu anestetika. Pro úpravu hemodynamiky, zejména u hemoragického šoku, byl navrhován 8-ornitin-vasopresin (Ornipressin), případně jeho analog (2-fenylalanin-8-ornitin)-vasopresin (poměr aktivit 4,0). Tyto látky, ve srovnání s jinými vazomotorickými aminy, byly výrazně výhodnější³⁰.

2) Mezi klinicky používanými analogy byl nejúspěšnější vasopresinový analog pražské skupiny, 1-deamino-8-D-arginin-vasopresin (DDAVP, Desmopressin, Minirin), syntetizovaný v laboratořích ÚOCHB (Milan Zaoral, Jaroslav Kolc, František Šorm)³¹. Extrémně zvýšená antidiuretická aktivita při minimální aktivitě vazopresorické tento analog předurčila být téměř výhradním lékem pro substi-

tuční terapii *diabetes insipidus*. Později bylo náhodně zjištěno, že tento analog zvyšuje hladinu koagulačního faktoru VIII jako hematostatikum při menších chirurgických (např. stomatologických) zásazích u osob s lehou formou hemofilie a osob se sklonem k hemoragické diatéze.

3. Metabolická stabilita neurohypofyzárních hormonů

Specifickým cílem biochemické skupiny na ÚOCHB byla metabolická stabilita (inaktivace a clearance) neurohypofyzárních hormonů v souvislosti s jejich enzymovým odbouráváním *in vivo*. Tento záměr vedl chemiky k syntéze analogů s obměněnými místy potenciálních enzymových atak v molekulách nativních hormonů. Vzniklo tak několik velice pozoruhodných analog (obr. 2).



Obr. 2. Modifikované pozice v molekule oxytocinu potenciálně vedoucí k prodlouženému biologickému účinku, schematické zobrazení. Sekvence oxytocinu je naznačena v horním řádku, ve schematických vzorcích jsou neobměněné pozice vyznačeny silnou tečkovanou čarou. Obměněné pozice jsou označeny tenkou přerušovanou čarou (kruhy a čtyřúhelníky)

[§] Test na kryse. Poměr aktivit pro arginin-vasopresin (standard) je 1,0.

Předně byl učiněn pokus o chránění peptidové vazby na N-konci peptidu, tedy mezi koncovým cysteinem a následujícím tyrosinem. Již v padesátých letech zjistili Tuppy a Nesvadba³², že oxytocin je v průběhu těhotenství štěpen enzymem aminopeptidasového charakteru; později byl označen jako sérová či těhotenská oxytocinasa. Za částečně empiricky potvrzeného předpokladu, že aminopeptidasy tuto vazbu neštěpí, není-li aminoskupina přítomna, byl již du Vigneaudovou skupinou syntetizovaný – plně aktivní 1-deaminoxytocin rezistentní vůči enzymům tohoto typu. Později bylo, opět v laboratořích ÚOCHB, objeveno, že všechny oxytocinové a vasopresinové analogy s vypuštěnou či modifikovanou aminoskupinou skutečně vykazují prodloužené účinky. Podobná strategie byla použita i pro další místa možného enzymového štěpení, či *vice versa* k zodpovězení otázky, zda projektivní modifikace takových míst ve struktuře peptidu vede k prodloužení účinku a tím k identifikaci dalších inaktivujících enzymů. Tak se na příkladu dalo prokázat, že tyrosinasa^{33,h}, jiný možný inaktivační enzym neurohypofyzárních peptidů, je bez podstatného vlivu na kinetiku inaktivace: alkylace hydroxylové skupiny na druhé aminokyselině oxytocinu či vasopresinu délku účinku výrazně nezvyšuje. Protekční zásahy na karboxylovém, resp. karboxamidovém, konci řetězce nemají vliv na kinetiku biologických účinků, i když farmakologové z Mount Sinai University v New Yorku existenci enzymů štěpících oxytocin na tomto konci popsali^{34,35,i}.

Disulfidový můstek mezi oběma cysteinovými řetězci v pozici 1 a 6 zaručuje aktivní cyklickou konformaci molekuly oxytocinu a s výjimkou zmíněné sérové oxytocinasy patrně i resistenci vůči aminopeptidasám. Redukce, resp. odstranění, disulfidického můstku vede k téměř neaktivnímu „lineárnímu“ oxytocinu. Zdá se, že specifická redukta oxytocinového můstku, která by vedla k inaktivaci tohoto hormonu, neexistuje, i když byla v biochemických laboratořích na ÚOCHB dlouho hledána. J. Rudinger a K. Jošt navrhli řešení otázky významu disulfidového můstku pro aktivitu a inaktivaci oxytocinu zcela unikátním způsobem. Navrhli náhradu jednoho nebo obou atomů síry neredukovatelnou „izosterní“ methylenovou skupinou ($-\text{CH}_2-$) o zhruba stejném molekulárním objemu jako má atom síry (obr. 2). Tak vznikly pozoruhodné sloučeniny s biologickými aktivitami řádově srovnatelnými s nativní molekulou, označené jako „carba“-oxytociny³⁷. Pod tímto jménem jsou dnes známy v chemickém a farmakologickém názvosloví mezinárodně. Kupodivu

však nevykazují zvlášť prodloužené účinky, takže fyziologický význam inaktivace neurohypofyzárních peptidů redukcí disulfidického můstku byl tímto přinejmenším zpochybněn³⁸.

„Chráněné“ analogy umožnila nadto reverzní strategii tzv. enzymových sond (enzyme probes), tedy analýzu farmakokinetických procesů v blízkosti receptorů neurohypofyzárních peptidů, tedy v tzv. receptorovém kompartmentu³⁹. Výsledky, stručně shrnuté, svědčí o tom, že stabilita peptidu, a tím i poločas účinku, souvisí převážně se strukturou aminokyseliny na jeho aminovém konci (na N- α -koncové aminokyselině). Kritický inaktivující enzym je tedy aminopeptidasa typu oxytocinasy popsané již výše zmíněnými autory Tuppym a Nesvadbou³². Snaha o prodloužení účinku, zvláště pro klinické využití, vedla k syntéze další významné skupině oxytocinových a vasopresinových analogů, k tzv. „syntetickým“ hormonogennům, u nichž byla na N-koncovou aminoskupinu připojena další aminokyselina či krátký peptid^{40,41} (obr. 2). Předpokládalo se, že takto upravené molekuly se budou *in vivo* v prvním kroku enzymově štěpit aminopeptidasami, a teprve pak že dojde k uvolňování účinného hormonu. Farmakologické a imunologické podklady tento předpoklad u oxytocinových a lysin-vasopresinových hormonogennů plně potvrdily. Dva zvláště názorné příklady – časové profily antidiuretického a vazopresorického účinku analogů lysin-vasopresinu – přináší obr. 3. Klinicky se uplatnil jako akutní prostředek při krvácivých stavech 1-N- α -triglycyl-8-lysin-vasopresin (TGLVP, Terlipressin, Glypressin), především v případě krvácení z jícnových varixů, a to kvůli svému vazokonstrikčnímu/hemostatickému účinku^j. O podobných oxytocinových analogích, především 1-N- α -triglycyl-oxytocinu a 1-N- α -leucyl-glycyl-glycyl-oxytocinu, existuje sice řada sdělení v literatuře, v gynekologicko-porodnické praxi se ale příliš neujaly. Výhody ve srovnání s oxytocinem se nezdaří být výrazné.

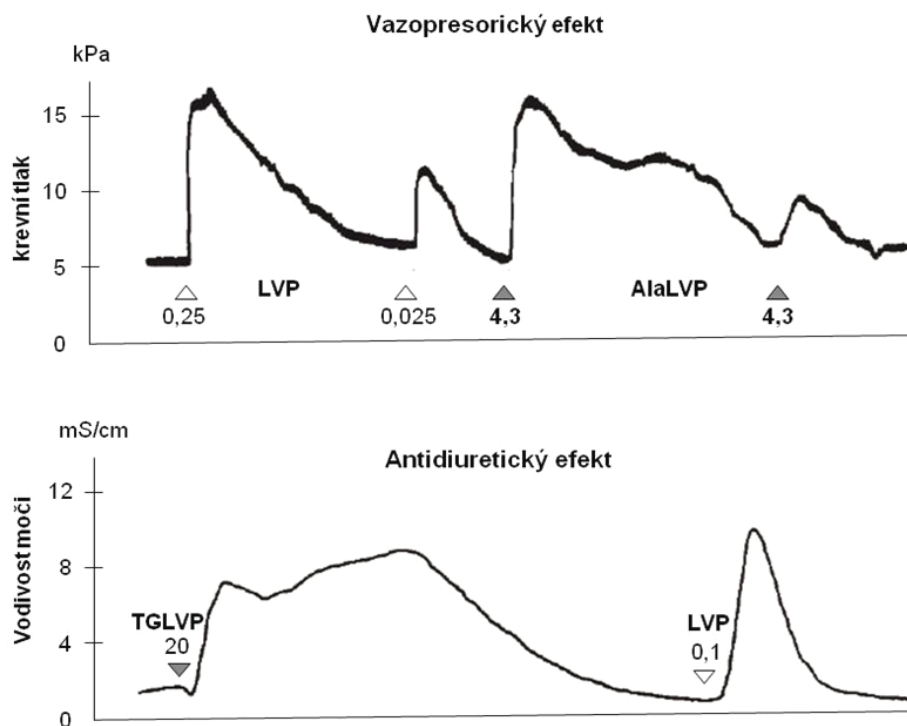
4. Inhibice biologických aktivit neurohypofyzárních hormonů

Výzkum strukturních analogů působících jako inhibitory biologických aktivit neurohypofyzárních hormonů se datuje od rovněž spíše náhodného nálezu inhibice vazopresorického účinku 8-arginin-vasopresinu 2-O-methyltyrosin-oxytocinem na krysách. Jako první publikovali syntézu tohoto analogu v roce 1960 Law a du Vigneaud²⁷; stalo se

^h Enzym katalyzující oxidaci fenolů v *ortho*-pozici k hydroxylové skupině tyrosinu (oxytyrosinasa), či – za přítomnosti exogeního kyslíku – na chinony. Lze předpokládat, že takto modifikovaná molekula oxytocinu je biologicky neaktivní.

ⁱ Peptidy vzniklé odštěpením koncového glycnamidu zmíněnými enzymy (karboxamidopeptidasami) – zvláště desglycinamid-8-lysin-vasopresin – mohou mít četné účinky na různá mozgová centra³⁶. Dlouhá léta se jimi zabýval David de Wied (1925–2004) se spolupracovníky (zvláště B. Bohus, T. B. van Wimersma Greidanus) na univerzitě v Utrechtu (Rudolf Magnus Institut). Jde ovšem o účinky sekundární; jejich regulační fyziologická funkce není dostatečně doložena.

^j Podle neověřených sdělení byl jako akutní protišokový prostředek zajímavý pro sanitní sbory některých armád. Další testovanou farmakologickou možností bylo použití Terlipressinu jako kontracepčního prostředku v prvním trimestru.



Obr. 3. **Prodloužený účinek syntetických vasopresinových analogů.** Horní část: vazopresorický efekt 1-*N*- α -triglycyl-8-lysin-vasopresinu (TGLVP) na kryse (tlak v kPa, arteria carotis). Dolní část: antidiuretický efekt TGLVP na hydratované kryse v alkoholické anestezii (stav vodní diurézy). Ordináta: konduktivita kontinuálně vyměšované moči (mS/cm). Na profilu TGLVP znázorňuje první vrchol vlastní antidiuretický efekt analogu, z něhož se postupně uvolňuje LVP (druhý vrchol). Dávky (v nmolech) substance injikovány do kanylované femorální žíly. Bílé trojúhelníky: lysin vasopresin (LVP), tmavé: hormonogen

tak krátce před publikací stejné látky v laboratořích ÚOCHB⁴². Časový rozdíl obou publikací byl velmi krátký. Obě skupiny pracovaly na syntéze nezávisle a téměř současně. Pražská skupina však přesto v tomto případě ztratila primát^k. Avšak brzy nato publikovali biochemici z ÚOCHB mnohem systematictější studii inhibice uterotonického účinku oxytocinu tímto a dalšími analogy modifikovanými v pozicích aminokyselin 2, 3 a 4 (cit.⁴³, obr. 2). Popsané objevy dosvědčují, že tento typ strukturní modifikace byl na ÚOCHB již dříve ve středu zájmu. Z pražských výzkumných pracovišť pocházejí pak další studie těchto analogů. Týkající se farmakologicky významného jevu, a to změny antagonismu v parciální a plný agonismus změnou pokusných podmínek⁴⁴. Dodnes jsou vztahy mezi strukturou analogů a jejich inhibičními vlastnostmi celosvětově předmětem studií v četných laboratořích. Již

na zlomu šedesátých a sedmdesátých let shrnul Josef Rudinger výsledky dosavadních studií v několika přehledech^{45,46}. Přehled novějších prací, zaměřený převážně na význam antagonisticky působících analogů neurohypofyzárních peptidů a jejich možné léčebné využití, publikoval nedávno Maurice Manning (University of Toledo College of Medicine) se spolupracovníky z různých laboratoří⁴⁷.

5. Syntéza analogů s kombinacemi změn na různých pozicích peptidového řetězce

Období izolovaných obměn, které vedly k již známým změnám biologických aktivit, vystřídaly zhruba od 70. let pokusy s kombinacemi změn na různých pozicích peptidového řetězce, motivované převážně snahou připravit klinicky použitelná farmaka. K tomu dvě poznámky.

^k Jeden z autorů tohoto sdělení (V. P.) si vzpomíná, že Josef Rudinger se ihned po uveřejnění syntézy skupinou du Vigneaud vyjádřil, že na primátu nezáleží, hlavně že analog byl syntetizován. To je přesvědčivý příklad vysoké vědecké morálky Josefa Rudingera.

První se týká kumulace strukturních změn v jednotlivých analogích. Tato nevede zpravidla ke kumulaci biologických vlastností spojených se stavem jednotlivých pozic v molekule. Vedla ovšem k syntéze řady pozoruhodných farmak. V případě oxytocinu takto vznikly dnes klinicky v porodnictví hojně používané léky carbetocin (Duratocin®/Pabal®) a (dnes již generikum) atosiban (Tractocile® a další generické názvy jeho lékových forem).

Poznámka druhá, biologický fenomén charakterizovaný farmakologicky se nemusí nutně v podobné formě projevit klinicky. Výrazně se to týká farmakokinetických vlastností konkrétních látek, když poločasy účinků měřených v pokusech *ex vivo* se liší od pozorování *in vivo*. V klinické praxi používaný analog vasopresinu, 1-deamino-8-D-arginin-vasopresin (Desmopressin, DDAVP), vykazoval v antidiuretickém testu při aplikaci ekvipotentních dávek odpovídajících 8-arginin-vasopresinu jen mírně prodloužený poločas (nejspíše vlivem vypuštění aminoskupiny na N-konci), ale téměř dramaticky prodloužený účinek při intranazálním podání pacientům s *diabetes insipidus*. Příčinou ovšem může být i vznik depotních forem, například vazbou peptidu ve velké dávce na bílkoviny a jeho postupného uvolňování. Podobný efekt lze pozorovat u carbetocinu, 1-deamino-carba¹-2-O-methyltyrosin-oxytocinu. Carbetocin se v dnešní době používá v porodnictví pro prevenci a/nebo léčbu peripartálního život ohrožujícího krvácení. Jak již bylo zmíněno, samotná substituce -S- atomu skupinou -CH₂- neprodloužuje poločas rozpadu oxytocinu, avšak v klinické situaci výrazně prodlouženě působí. Klinický význam carbetocinu pak spočívá v uterotonickém účinku. Oproti oxytocinu navozuje silnější a dlouhodobější retrakci myometria při porodu placenty člověka, tedy ve III. době porodní. Proto je vedle preventivního podání používán i léčebně, a to při poporodní hypotonii a/nebo atonii hladké svaloviny dělohy.

Dva protagonisté ve výzkumu neurohypofyzárních peptidů v Praze

Od poloviny 50. do konce 60. let minulého století byl český výzkum obou hormonů neurohypofýzy zcela nerozlučně spojen s osobnostmi Josefa Rudingera a Františka Šorma (1913–1980) (obr. 4). První z nich byl už od počátku své akademické kariéry především světově uznávaný chemik v oblasti peptidů. Byl spíše konstruktivní teoretik než experimentátor. Kvůli svému neobyčejnému jazykovému nadání byl současně vynikající organizátor; dovedl pohotově shrnout pohledy odborníků různých oborů a formulovat z nich vědecké závěry. Byl proto také vítaným hostem na nejrůznějších vědeckých shromážděních. Jako první přišel s myšlenkou inovativní syntézy oxytocinu v Ústavu organické chemie a biochemie Československé akademie věd. Avšak vzhledem ke své rodinné historii



Obr. 4. Josef Rudinger a František Šorm (sedící), 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. Snímek patrně z archivu jednoho z účastníků, prof. Dr. Maxe Brennera (Basel) zapůjčil a s reprodukcí souhlasil prof. Dr. Alex N. Eberle (Basel)

(otec odsouzen v procesech na počátku 50. let k dlouhému trestu odnětí svobody) by své myšlenky v raných létech komunistické diktatury neuskutečnil bez jednoznačné podpory druhého jmenovaného, profesora Františka Šorma, tehdejšího ředitele ÚOCHB a pozdějšího prezidenta Československé akademie věd.

Několik slov k F. Šormovi. Byl přesvědčený (snad?) komunist, člen ústředního výboru KSČ, v době komunistického režimu poslanec Národního shromáždění. V tehdejší totalitní státě se tedy jednalo o pevně zakotvenou osobnost. V první řadě byl ale profesor a vědec. Jednal přímo, energicky a svoje tehdejší postavení nezneužíval v neprospěch vědy a sotva kdy k vlastnímu prospěchu. „Kádrové“ záležitosti ho nezajímaly, kritériem pro výběr spolupracovníků byl, snad jen s malými výjimkami, vědecký talent. Tím lze i vysvětlit, že jedním z prvních jím vybraných spolupracovníků byl Josef Rudinger, a to i přes jeho již zmíněnou rodinnou historii. Obsáhlý životopis Josefa Rudingera publikoval jako *editorial* v roce 2004 John Jones⁴⁸.

Zásluhou obou byla založena tradice dodnes se rozvíjejících Evropských peptidových symposií¹: V době, kdy komunistický režim naprosto zabraňoval stykům se Západem, se právě první Evropské peptidové symposium konalo v roce 1958 v Praze. Toto svým stranickým vlivem, z podnětu Josefa Rudingera, umožnil František Šorm.

¹ Jsou do dnešního dne organizovány prostřednictvím European Peptide Society vždy v sudých letech v jednotlivých evropských státech.

Snad nejlépe bude tento počín charakterizovat pasáž z knihy *The World of Peptides* dvou významných chemiků, Theodora Wielanda a Mikloše Bodanszkyho, spolupracovníka Vincenta du Vigneauda⁴⁹: „We cannot enumerate here Rudinger's many valuable contributions to the methodology of peptide synthesis or to the design of molecules for specific pharmacological studies. It seems to be more important to recall one of his ideas, that had and still has a major impact on peptide chemistry. In 1958 he invited the handful of European investigators active in peptide research to participate in a symposium in Prague. This first European Peptide Symposium was followed [...] by meetings held in various locations in Europe. Their excellence acted as a stimulus or perhaps as catalyst and led to an unprecedented growth in research and understanding of peptide chemistry. Not less important are the friendships and collaborations formed at the Symposia. Their example was followed in the United States and also Japan ...“

Po sovětské okupaci, již koncem srpna 1968, odešel Josef Rudinger z Československa do Švýcarska. Jako světově známý vědec se stal na jedné z nejlepších evropských univerzit, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) v Zürichu, jedním z prvních profesorů molekulární biologie. Věnoval se, vedle četných dalších úkolů spadajících do povinností vysokoškolského profesora, spolu se svojí skupinou až do své předčasné smrti v roce 1975 nadále chemii a biologii peptidů. Avšak vědecky nejproduktivnější bylo bezesporu jeho životní období na pražském Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Výzkum peptidů ovšem na tomto ústavu pokračoval dále, přesto že Rudingerova nepřítomnost zanechala nepřekonatelnou mezeru. Jeho roli převzalo několik vynikajících chemiků, z nich je na místě zmínit alespoň Karla Jošta (1932–1986), Karla Podušku (†1974, datum neověřeno) a Milana Zaorala (1926–2011) (obr. 5). První dva rovněž předčasně zemřeli, ve stejné době jako Josef Rudinger^m. M. Zaoral se pak od původní „peptidové skupiny“, vedené po odchodu Josefa Rudingera Karlem Bláhou (1926–1987), odpojil a vedl vlastní nezávislou laboratoř.

Oxytocin a vasopresin v laboratořích a na klinikách v Praze

Dostupností analog, které pocházely z prací Rudingerovy skupiny, iniciovala pozdější farmakologický, biochemický a klinický výzkum neurohypofyzárních hormonů na různých pracovištích v Praze. V 60. letech existovala již v Praze, zásluhou Františka Šorma, rozsáhlá komunikace se západními a středoevropskými pracovišti, především v Maďarsku, v Polsku, v NDR, ve Švýcarsku, ve Velká



Obr. 5. 1st European Peptide Symposium, Prague 1958. Snímek účastníků. Označení jsou příslušníci peptidové skupiny ÚOCHB (identifikace: VP a MF). (Archiv M. Brenner, viz obr. 4)

Británii a v Německé spolkové republice. I v této době již existovala mezinárodní výměna informací a často i preparátů. Centrální osobou byl v úloze jakéhosi vyslance opět Josef Rudinger. V té době se stal pražský výzkum peptidů součástí světového výzkumu.

Biochemický a zčásti též farmakologický výzkum byl na **Ústavu organické chemie a biochemie** soustředěn v oddělení molekulární biologie, zpočátku v laboratoři vedené Ivanem Rychlíkem (Ivan Rychlík, Zdenka Beránková-Ksandrová, Ivan Bartošek, Vladimír Pliška, Tomislav Barth, Tomáš Douša), poslední tři jmenovaní spolu s dalšími spolupracovníky v oddělené laboratoři biochemie a farmakologie peptidů. Kromě metabolických a farmakokinetických studií byl zájem zaměřen na anti-diuretické a natriferické účinky analogů vasopresinu a oxytocinu. Farmakokinetická charakteristika peptidů a originální anti-diuretický test na kryse pocházející z této laboratoře se rozšířily ve farmakologickém výzkumu a farmaceutickém průmyslu⁵⁰.

Z ÚOCHB rovněž pocházejí jedny z prvních konformačních studií oxytocinu a jeho carba-analogů (Ivo Frič, Milan Kodíček, Karel Jošt, Karel Bláha⁵¹).

Velkou část farmakologického výzkumu převzal pražský **Výzkumný ústav přírodních léčiv** (Ivan Krejčí, Ivo Poláček, Běla Kupková, Alena Machová a řada dalších). Odtud pochází většina dat k uterotonickým a vazopresorickým aktivitám peptidů z ÚOCHB. Ivan Krejčí se spolupracovníky se nadto zabýval základními otázkami farmakologie peptidů. Studovali inhibici uterotonického efektu oxy-

^m V 70. letech zemřelo několik peptidových chemiků v Praze a v zahraničí (Itálie, USA) před dosažením padesáti let nebo krátce po padesátce, nejméně tři z pěti nám známých s onkologickou diagnózou. Podle nepotvrzené domněnky mohlo jejich onemocnění souviset s dlouhodobou expozicí dicyclohexylcarbodiimidem (DCC), běžně používaného v chemii peptidů jako kondenzační činidlo. Jeho kancerogenitu deklaruje National Institute of Health (NIH Publication No. 07-4426).

tocinu, přechody mezi plným agonismem a antagonismem, a vlivem vápníku a hořčíku na tyto procesy. Jeho skupina přešla koncem 60. let do Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii. I tam přetrvávala tematika oxytocinových analog 70. léta a končila až v novém tisíciletí. Rovněž, avšak snad v menší míře, spolupracovali v tomto ústavu s biochemickou skupinou ÚOCHB Karel Řežábek, Evžen Kasářík a Jaroslav Kynčl na syntéze, především však na farmakologické charakteristice vazopresinových hormonogonů.

Projekty z oboru kardiovaskulární farmakologie a fyziologie vasopresinu byly až do počátku 70. let součástí programu **Ústavu pro choroby oběhu krevního v Praze-Krči** (Jiří Heller, nějaký čas také Joseph H. Cortⁿ).

To je ovšem pouze stručný výčet pražských farmakologických a fyziologických pracovišť, která se na výzkumu „pražských“ analog oxytocinu a vasopresinu podílela. Do tohoto proudu byla zapojena i řada pražských klinických zařízení, především z oboru gynekologie a porodnictví. Zde patří zmínit **Ústav pro péči o matku a dítě** (Vladimír Brotánek, Stanislav Kazda, J. Hodr, Č. Jungmannová, J. Židovský) a **Gynekologicko-porodnická klinika fakulty dětského lékařství Univerzity Karlovy**, dnes Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. V té době byl přednostou Alfréd Kotásek, po něm Miroslav Břešťák. Farmakologický a klinický výzkum byl také předmětem endokrinologické laboratoře **III. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze** pod vedením profesorů Vladimíra Holečka, Josefa Marka a Vratislava Schreibera.

V roce 1968 započala spolupráce se švédskou firmou Ferring Läkemedel AB, Malmö. Pokračovala pak prodejem licence na dDAVP/Desmopressin (později i prodejem dalších patentů), čímž tato společnost získala právo vyrábět Desmopressin, Carbetocin/Pabal a Terlipressin v západní Evropě a USA. Firma Léčiva, n. p., jako součást trustu Spofa pak vyráběla v jednom ze svých závodů v Praze-Komořanech stejné peptidy pro státy východní Evropy a Sovětský svaz.

Pražský výzkum později změnil svůj charakter a orientoval se více na klinickou farmakologii. Řada chemicko-syntetických a farmakologických projektů se pak soustředila nejprve v Malmö, později v dalších pobočkách této rychle rostoucí a zvětšující se firmy ve světě. Pražský „Gründerzeit“ má zde svůj přirozený, přesto velmi úspěšný konec.

Autoři jsou zavázáni díky paní Mgr. Olze Štajnrtové z Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze za pečlivé jazykové a věcné korektury rukopisu, zvláště pak za ověření a opravu citovaných údajů.

LITERATURA

1. Starling E. H.: Lancet 2, 339 (1905).
2. Bayliss W. M., Starling E. H.: J. Physiol. 28, 325 (1902).
3. von Mering J., Minkowski O.: Arch. Exp. Path. Pharm. 26, 371 (1890).
4. Oliver G., Schäfer E. A.: J. Physiol. 18, 230 (1895).
5. Oliver G., Schäfer E. A.: J. Physiol. 18, 277 (1895).
6. Howell W. H.: J. Exp. Med. 3, 245 (1898).
7. Schäfer E. A., Vincent S.: J. Physiol. 25, 87 (1899).
8. Dale H. H.: J. Physiol. 34, 163 (1906).
9. Ott I., Scott J. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 8, 48 (1910).
10. Dudley H. W.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 14, 295 (1919).
11. Pliška V., Barth T.: Collect. Czech. Chem. Commun. 35, 1576 (1970).
12. Kamm O., Aldrich T. B., Grote I. W., Rowe L. W., Bugbee E. P.: J. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928).
13. Stehle R. L., Fraser A. M.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 55, 136 (1935).
14. Craig L. C.: J. Biol. Chem. 155, 519 (1944).
15. Livermore A. H., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. 180, 365 (1949).

ⁿ Poznámka k osobě Josepha H. Corta, jehož jméno se často objevuje mezi autory pražských publikací v 60. a 70. letech. Cort emigroval v 50. letech z USA, údajně před hrozbou žaloby ze strany komise McCarthyho, do Anglie a brzy poté nejprve do Polska a pak do Československa. Jako údajná oběť pronásledování komunistů na Západě byl oficiální Prahou vítán. (Nutno podotknout, že před kolegy v Praze používal zcela jiný, vůči komunismu satiricko-kritický postoj.) Jako absolvent Yale University se připojil k výzkumným pracím Josefa Rudingera, s kterým se úzce přátelil. Mimo zmíněný ústav je v publikacích uváděn jako jeho pracoviště též Fyziologický ústav ČSAV v Krči (laboratoř biologie peptidů). Byl bezesporu nadaným experimentátorem, měl řadu originálních návrhů, hlavně se týkaly vlivu neurohypofyzárních hormonů na iontový metabolismus. O jeho morálním profilu, alespoň pokud šlo o vědu, existovaly již tehdy v zasvěcených kruzích značné pochyby. Mimo jiné byly výsledky jeho pokusů často nereprodukovatelné. V roce 1976 se vrátil do Spojených států, kde působil nejprve na Mount Sinai Medical Center v New Yorku, později ve firmě Vega Biotechnologies, Tucson (Arizona). Koncem roku 1982 veřejně přiznal, že jeden z analogů vasopresinu, který údajně farmakologicky testoval a na který mu byl udělen americký patent, ve skutečnosti nebyl nikdy syntetizován. O dalších jím deklarovaných podobných peptidech rovněž neexistují doklady, zda vůbec kdy syntetizovány byly. Tento vyslovený podvod okamžitě vzbudil veřejný skandál a zřejmě ukončil Cortovu kariéru (viz např. *New Scientist*, January 6, 1983, *New York Times*, December 27, 1982 atd.). Naštěstí nevrhla tato historie dlouhé stíny na práci pražských výzkumníků. Pokud víme, Cort si pak otevřel firmu ve Wiesbadenu, kde se pokoušel mimo jiné vyrábět také carbetocin.

16. Edman P.: Arch. Biochem. 22, 475 (1949).
17. du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S.: J. Biol. Chem. 205, 949 (1953).
18. du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G.: J. Am. Chem. Soc. 76, 3115 (1954).
19. Tuppy H.: Biochim. Biophys. Acta 11, 449 (1953).
20. Tuppy H., Michl H.: Monatsh. Chem. 84, 1011 (1953).
21. Sanger F., v knize: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, str. 544. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
22. du Vigneaud V., v knize: *Nobel lectures – chemistry 1942–1962. Including presentation speeches and laureates' biographies*, str. 446. Nobel Foundation by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
23. Boissonnas R. A., Guttman S., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 2, str. 40. Springer Verlag, Berlin 1968.
24. Rudinger J., Honzl J., Zaoral M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 21, 202 (1956).
25. Honzl J., Rudinger J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 20, 1190 (1955).
26. Boissonnas R. A., Guttman S., Jaquenoud P.-A., Waller J.-P.: Helv. Chim. Acta 28, 1491 (1955).
27. Law, H. D., du Vigneaud V.: J. Am. Chem. Soc. 82, 4579 (1960).
28. Berde B., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 16, str. 802. Springer Verlag, Berlin 1968.
29. Jošt K., v knize: *Handbook of Neurohypophyseal Hormone Analogs*, Vol. II/2 (K. Jošt, M. Lebl, F. Brtník ed.), str. 94. CRC Press, Inc., Boca Raton (FL) 1987.
30. Altura B. M.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 187 (1976).
31. Zaoral M., Kolc J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1250 (1967).
32. Tuppy H., Nesvadba H.: Monatsh. Chem. 88, 977 (1957).
33. Chang T.-S.: Int. J. Mol. Sci. 10, 2440 (2009).
34. Walter R., Havran R. T., Schwartz I. L.: J. Med. Chem. 19, 328 (1976).
35. Walter R., Schlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerenyi T. D.: Science 173, 827 (1971).
36. van Wimersma Greidanus T. B., Van Ree J. M., v knize: *Behavioral Aspects of Neuroendocrinology* (D. Ganten, D. Pfaff, ed.), kap. 3, str. 61. Springer Verlag, Berlin 1990.
37. Rudinger J., Jošt K.: Experientia 20, 570 (1964).
38. Pliška V., Rudinger J., Douša T., Cort J. H.: Am. J. Physiol. 215, 916 (1968).
39. Pliška V., Jutz G., Beck S., v knize: *PEPTIDES: Structure and Function. Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium* (C. M. Deber, V. J. Hruby, K. D. Kopple, ed.), str. 603. Pierce Chemical Company, Tucson (AR) 1985.
40. Beránková-Ksandrova Z., Bisset G. W., Jošt K., Krejčí I., Pliška V., Rudinger J., Rychlík I., Šorm F.: Brit. J. Pharmacol. 26, 615 (1966).
41. Kynčl J., Řežábek K., Kasářík E., Pliška V., Rudinger J.: Eur. J. Pharmacol. 28, 294 (1974).
42. Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: Collect. Czech. Chem. Commun. 26, 2496 (1961).
43. Beránková Z., Rychlík I., Jošt K., Rudinger J., Šorm F.: Coll. Czech. Chem. Commun. 26, 2673 (1961).
44. Krejčí I., Kupková B., Rudinger J.: Brit. J. Pharmacol. 30, 506 (1967).
45. Rudinger J., Krejčí I., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 15, str. 748. Springer Verlag, Berlin 1968.
46. Rudinger J., Pliška V., Krejčí I.: Recent Prog. Horm. Res. 28, 131 (1972).
47. Manning M., Misicka A., Olma A., Bankowski K., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B., Corbani M., Guillon G.: J. Neuroendocrinol. 24, 609 (2012).
48. Jones J.: J. Pept. Sci. 10, 393 (2004).
49. Wieland T., Bodanszky M.: *The World of Peptides. A Brief History of Peptide Chemistry*, str. 156. Springer Verlag, Berlin 1991.
50. Thorn N. A., Niels A., v knize: *Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides* (B. Berde, ed.), kap. 7, str. 372. Springer Verlag, Berlin 1968.
51. Frič I., Kodíček M., Jošt K., Bláha K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 39, 1271 (1974).

V. Pliška^a, A. Pařízek^b, and M. Flegel^c ^aCollegium Helveticum, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich & The University of Zürich, Zürich, Switzerland, ^bGynecology and Obstetrics Department, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^cDepartment of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic): **Oxytocin and Further Uterotonic Peptide Agents: Their Early Research in Prague**

Amino acid sequence of oxytocin, identified already in 1906 as the uterotonic component of neurohypophyseal extracts, was established in 1953 by Vincent du Vigneaud in New York and Hans Tuppy in Vienna. Its structure was verified by the total synthesis one year after in the du Vigneaud laboratory. In the following years, simplified synthetic strategies elaborated in a number of laboratories worldwide enabled structural modifications of individual sites in the peptide chain, aiming at a detailed elucidation of their influence upon pharmacologic features of oxytocin. Frequently, these peptide analogues opened the way to new, clinically useful drugs. The research on vasopressin, the other main peptide hormone of posterior pituitary, underwent a similar development.

Among the first who elaborated a more flexible alternative to du Vigneaud protocol was the peptide group at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences (ÚOCHB) in Prague, chaired by Josef Rudinger. Its research activities were broadly supported – sometimes even enabled – by Fran-

tišek Šorm, director of the Institute. This opened a way to an easier synthesis of oxytocin analogues. Design strategy in Prague was focused on oxytocin analogues with an enhanced metabolic stability (prolongation of half-life *in vivo*), and on analogues acting as inhibitors to its uterotonic/galactobolic response. In the former case, design strategy has originated from studies of enzymatic stability of oxytocin, accomplished in the biochemical laboratories at the ÚOCHB, or reported in earlier communications. Dose-response and time-response behaviour of analogues in which potential sites of enzymatic attacks were replaced by resistant sequences, and modified peptides investigated in a number of *in situ* and/or *ex vivo* pharmacological experiments. Of particular interest were analogues in which one or both sulphur atoms in the –S–S– bridge were replaced by the methylene group (–CH₂–), the so-called carba-analogues. Individual analogues of this series possessed, in various degrees, biological activities of oxytocin but not a prolongation of their responses in pharmacological models or in their physiological clearance. Thus, the carba analogues document, firstly, that the integrity of the disulfide bridge is not a necessary condition of oxytocin (or vasopressin) activity, and secondly, that the –S–S– bridge is not the rate determining site of neurohypophyseal hormone inactivation *in vivo*. In an attempt to prolong the action of oxytocin, its *N*-α-group was acylated by an additional amino acid or a short peptide, in expectation that such analogues would act as prohormones: splitting of additional substituent by tissue aminopeptidases would *in vivo* produce “free” oxytocin (therapeutically, the ana-

logues would act as oxytocin depots). A number of *in vivo* experiments verified this “hormonogen” model and brought forth some clinically interesting substances; some of them are in use until now. In the latter case, the search for structural modifications potentially leading to antagonism indeed brought some new antagonists but, in particular, contributed to the notion of continuous change from “full” agonism via partial agonism to antagonism, according to the tissue conditions. Such a change could have been achieved for uterotonic response of several analogues by changing calcium and magnesium concentrations in the tissue medium.

Ideas originated by Rudinger’s group brought about several clinically useful peptides like Carbetocin, Atosiban, Glypressin, Terlipressin. Very successful was the Prague vasopressin analogue dDAVP (Desmopressin) licensed to the Swedish pharmaceutical company Ferring Läkemedel AB.

Josef Rudinger left Czechoslovakia in 1968 and became a professor of molecular biology at the Swiss Federal Institute of Technology (ETH). He passed away, 51 years old, in 1975.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: oxytocin, vasopressin, neurohypophysis, endocrinology – neurohypophysial hormones, I. P. Pavlov, secretin, carbetocin, dDAVP, deamino-D-arginine vasopressin, desmopressin, atosiban, František Šorm, Josef Rudinger

PROLYLOLIGOPEPTIDASA VE FYZIOLOGII A PATOLOGII

PAVLA FAJTOVÁ a MARTIN HORN

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

Došlo 8.7.19, přijato 8.10.19.

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

Klíčová slova: proteolytické enzymy, serinová peptidasa, prolyloligopeptidasa, fyziologická role

Obsah

1. Úvod
2. Prolyloligopeptidasa
 - 2.1. Struktura a katalytický mechanismus prolyloligopeptidas
 - 2.2. Aktivita a specifita prolyloligopeptidas
 - 2.3. Biologická role prolyloligopeptidas
3. Inhibitory prolyloligopeptidas
4. Závěr

1. Úvod

Proteolytické enzymy (zvané též proteasy nebo peptidasy) hydrolyzují peptidové vazby bílkovin a peptidů. Peptidasy se objevily již v raných fázích biologické evoluce, jelikož i ty nejprimitivnější organismy je využívají pro zpracování vnějších proteinových potravních zdrojů a pro štěpení vlastních bílkovin. Analýzy genomů ukazují, že až 2 % všech genových produktů připadají na peptidasy, což je řadí mezi největší funkční skupiny proteinů.

Peptidasy je možné podle katalytického mechanismu a katalytických aminokyselinových zbytků v aktivním místě dělit do sedmi tříd: na aspartátové, asparaginové, cysteinové, serinové, threoninové, glutamátové, metalopeptidasy a dosud nezařazené peptidasy s neznámým mechanismem. Podle databáze peptidas MEROPS¹ jsou peptidasy rozděleny na základě strukturní a evoluční příbuznosti do rodin a klanů. Rodiny obsahují peptidasy, které vykazují evoluční a sekvenční příbuznost. Klany jsou skupiny peptidas, které mají podobné terciární struktury¹. Podle lokalizace štěpené peptidové vazby v substrátu se peptidasy dělí na endopeptidasy, štěpící uvnitř polypeptidového řetězce, a na exopeptidasy, štěpící z N-konce

(aminopeptidasy) nebo C-konce (karboxypeptidasy) peptidového řetězce. Dipeptidylaminopeptidasy odštěpují dipeptidy z N-konce, peptidyldipeptidasy z C-konce peptidového řetězce substrátu. Oligopeptidasy jsou enzymy, které štěpí peptidy, ale nikoliv proteiny.

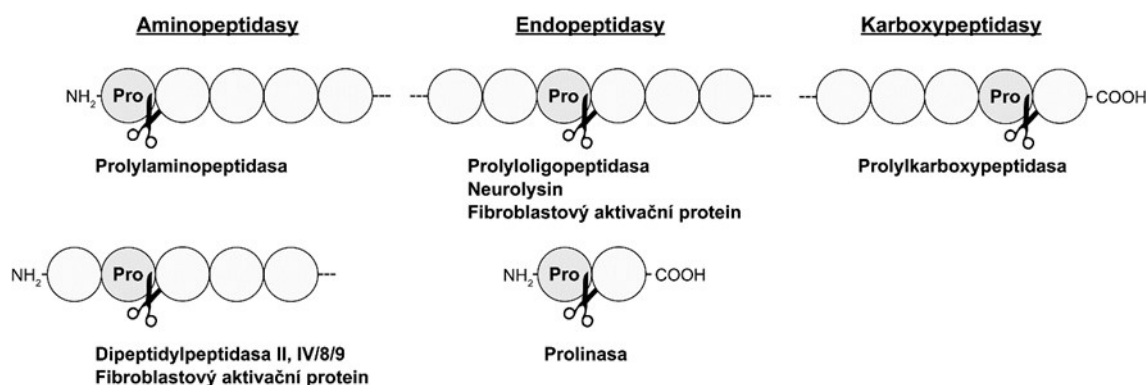
Specifita peptidas je definována vazebnými podmínkami, která se nacházejí po obou stranách katalytického centra, ve kterém je štěpena peptidová vazba. Do těchto podmínek, označovaných S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4' se vážou aminokyselinové zbytky polypeptidového řetězce substrátu značené od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci P1-P4 a k C-konci P1'-P4'. Počet definovaných vazebných podmínek se u jednotlivých peptidas liší. U endopeptidas umožňuje aktivní místo vazbu do všech podmínek, zatímco u exopeptidas je počet podmínek omezen pomocí strukturních prvků, které některá vazebná podmínka blokují.

Schopnost štěpit za zbytkem Pro v pozici P1 je pozorována u peptidas relativně vzácně. Peptidová vazba tvořená prolinovým zbytkem je vůči peptidasám velmi odolná a mnoho peptidas (včetně těch, které nejsou specifické) ji není schopno hydrolyzovat. Prolin je přirozená proteino-gení aminokyselina s unikátními vlastnostmi: neobsahuje primární aminoskupinu (často se proto nazývá iminokyselina) a má postranní řetězec v podobě cyklu (pyrrolidinového kruhu), který omezuje stupeň konformační volnosti. Tyto vlastnosti chrání proteiny a peptidy obsahující prolin před obecnou proteolytickou degradací. Zároveň se v průběhu evoluce u většiny organismů vyvinuly vysoce specifické peptidasy štěpící za prolinem pro regulaci funkce bioaktivních peptidů obsahujících prolin². Podle katalytického mechanismu tyto peptidasy patří mezi metalopeptidasy a serinové peptidasy, podle polohy štěpené vazby v peptidovém řetězci substrátu mezi nimi najdeme endopeptidasy, exopeptidasy a dipeptidasy (obr. 1).

Cílem tohoto přehledného referátu je podat souhrn aktuálních znalostí o prolyloligopeptidase, serinové endopeptidase štěpící peptidovou vazbu za prolinem uvnitř peptidového řetězce substrátu. S ohledem na evoluční konzervovanost prolyloligopeptidas (enzymy z různých organismů mají obdobné strukturně-funkční vlastnosti) se referát zaměřuje především na lidský enzym a jeho biologickou roli ve fyziologii a patofyziologii.

2. Prolyloligopeptidasa

Prolyloligopeptidasa, též nazývaná prolylendopeptidasa (EC 3.4.21.26), patří do rodiny S9 serinových peptidas, pro kterou je charakteristická katalytická triáda v pořadí Ser-Asp-His (cit.³). Tato rodina dále zahrnuje oligopeptidasu B, dipeptidyldipeptidasy IV/8/9, fibroblastový



Obr. 1. Variabilita peptidas štěpících peptidovou vazbu za zbytkem prolinu. Prolyloligopeptidasa a neurolysin jsou endopeptidasy, které štěpí uprostřed peptidového řetězce substrátu. Jiné peptidasy působí jako exopeptidasy – prolylaminopeptidasa odštěpuje zbytek prolinu z N-konce peptidového řetězce, dipeptidylpeptidasy II, IV, 8 a 9 dipeptidy, prolylkarboxypeptidasa specificky rozpoznává prolin v předposlední pozici z C-konce řetězce a odštěpuje C-terminální aminokyselinový zbytek. Fibroblastový aktivací protein má jak dipeptidylaminopeptidasovou, tak i endopeptidasovou aktivitu. Prolinasa je dipeptidasa hydrolyzující dipeptidy, které obsahují prolin na N-konci dipeptidu.

aktivační protein, acylaminoacylpeptidasu a glutamylpeptidasu¹. Dalšími obecnými rysy peptidas této rodiny je strukturní α/β hydrolasový motiv katalytické domény, jejíž aktivní místo je blokováno vrtulovou doménou cylindrického tvaru zvanou „ β -propeler“, a schopnost štěpit substrát mezi aminokyselinovými zbytky Pro-Xaa, kde Xaa je jakákoliv aminokyselina.

Prolyloligopeptidasa byla poprvé identifikována v roce 1971 v lidské děloze jako enzym degradující oxytocin⁴. Popsány byly tři typy savčí prolyloligopeptidasy (v cytoplazmě⁵, séru⁶ a v buněčných membránách⁷), které se lišily některými fyzikálními a enzymologickými vlastnostmi, nicméně se později prokázalo, že se jedná o produkt stejného genu⁸. Ačkoliv je prolyloligopeptidasa velmi dobře charakterizována strukturně a enzymologicky, její přesná fyziologická funkce nebyla dosud objasněna.

2.1. Struktura a katalytický mechanismus prolyloligopeptidas

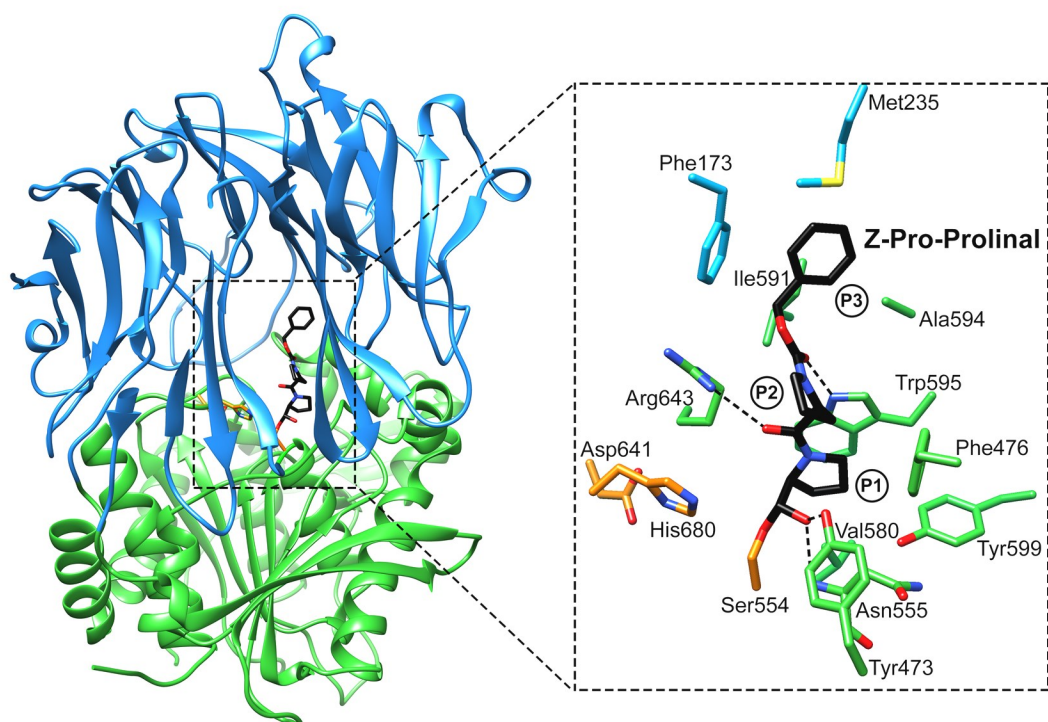
Prostorová struktura byla vyřešena pro dvě savčí (lidskou a prasečí) prolyloligopeptidasy a pro enzymy z bakterií a hub. U většiny savčích druhů je sekvence prolyloligopeptidas tvořena 710 aminokyselinovými zbytky a neobsahuje žádnou signální sekvenci. Prostorová struktura enzymu má tvar válce o průměru 50 Å a výšce 60 Å. Jedná se o jednořetězcový multidoménový protein složený z peptidasové domény s aktivním centrem, na kterou axiálně navazuje kovalentně vázaná nekatalytická doména β -propeler (obr. 2).

Katalytická peptidasová doména je tvořena N- a C-koncem peptidového řetězce (aminokyselinové zbytky 1-72 a 428-710). Katalytická doména se skládá z osmi vláken středově stočených β -listů obklopených na obou stranách celkem osmi α -helixy⁹. Tento typ strukturního motivu se obecně nazývá α/β hydrolasový motiv, protože

mnoho proteinů s touto doménou má hydrolasovou aktivitu⁹. β -Propeler je doména specifická pro peptidasy rodiny S9. V případě prolyloligopeptidasy má strukturu složenou ze čtyř antiparalelních β -listů sedmkrát se opakujících. Listy jsou paprscitě stočeny okolo osy proteinu a vytvářejí ve svém středu tunel. β -Propeler funguje jako brána ke katalytickému místu enzymu, která propouští substráty do velikosti maximálně 30 aminokyselinových zbytků a chrání tak větší peptidy a proteiny před proteolýzou v cytosolu⁹.

Aktivní místo obsahující katalytickou triádu (aminokyselinové zbytky Ser554, Asp641, His680) je uloženo v prostorné dutině na rozhraní obou domén. Hydroxylová skupina Ser554 je vystavena do prostoru, kde je snadno přístupná pro imidazolovou skupinu His680, která zbytek serinu deprotonuje. Na druhé straně deprotonovaný Ser554 nukleofilně atakuje karbonylovou skupinu peptidové vazby mezi zbytkem prolinu a následujícím aminokyselinovým zbytkem štěpeného substrátu. Asp641 je v rovině s imidazolovým kruhem His680, se kterým tvoří vodíkovou vazbu, a tím ho polarizuje. Analogický katalytický mechanismus byl popsán i pro některé další serinové peptidasy, například pro peptidasy rodiny S1 (rodiny chymotrypsinu).

Krystalová struktura prolyloligopeptidasy v komplexu s peptidomimetickým inhibitorem Z-Pro-Prolinelem (Z = benzyloxykarbonyl), reaktivním aldehydem odvozeným od struktury malých syntetických substrátů používaných pro stanovení aktivit prolyloligopeptidas², umožnila analyzovat vazbu inhibitorů a substrátů do aktivního místa prolyloligopeptidasy. Nukleofilní skupina Ser554 tvoří kovalentní hemiacetálový adukt s aldehydem inhibitoru. Hydrofobní vazebné podmísto S1, tvořené zbytky Phe476, Val580, Trp595, Tyr599 a Val644 poskytuje nepolární prostředí pro vazbu prolinového zbytku (obr. 2). Specifita vazby je zvýšena stohováním (tzv. „stacking“) mezi zbytkem prolinu a indolovým kruhem Trp595. Vazebné podmísto S2,



Obr. 2. **Prostorový strukturní model prolyloligopeptidasy v komplexu s inhibitorem Z-Pro-Prolinalem (PDB kód: 1QFS).** Prolyloligopeptidasa se skládá ze dvou domén: peptidasové domény (zeleně) s aktivním centrem, ve kterém se nachází katalytická triáda Ser554, Asp641 a His680 (žlutě) a kovalentně vázaný inhibitor (černě), a z β -propeleru (modře), který stéricky blokuje přístup ke katalytickému místu, kam propouští pouze oligopeptidové substráty. Výřez: Detail aktivního místa prolyloligopeptidasy ukazuje interakci se Z-Pro-Prolinalem (černě). Zobrazeny jsou postranní řetězce katalytických zbytků (oranžově) a zbytků tvořících vazebná podmísta P1, P2 a P3 (zeleně a modře podle umístění v peptidasové doméně respektive v β -propeleru). Heteroatomy dusík, kyslík a síra jsou zobrazeny tmavě modře, červeně a žlutě.

tvořené převážně Arg643, je méně specifické a podmísto S3 je tvořeno postranními řetězci nepolárních zbytků (Phe173, Met235, Ile591 a Ala594), což vytváří relativně hydrofobní prostředí.

Substrát přistupuje do aktivního místa prolyloligopeptidasy bočním otvorem mezi β -propelerem a katalytickou doménou. Prolyloligopeptidasa má aktivní konformační dynamiku, nachází se v rovnováze mezi uzavřenou a otevřenou konformací. Vazbou substrátu nebo kompetitivního inhibitoru se posunuje konformace proteinu z otevřené na uzavřenou formu. V blízkosti předpokládaného vstupu do katalytického místa jsou umístěny pružné mobilní smyčky, které regulují vstup do tohoto místa.

2.2. Aktivita a specifita prolyloligopeptidas

Prolyloligopeptidasa je endopeptidasa štěpící pouze oligopeptidové substráty, ve kterých hydrolyzuje vazby Pro-Xaa (Xaa je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu)¹⁰. Substrátová specifita prolyloligopeptidas byla studována pomocí sady syntetických substrátů^{10,11}. Tyto studie ukázaly, že aktivní místo enzymu je tvořeno pěti vazebnými podmísty S3, S2, S1, S1' a S2'. V substrátové pozici

P1 preferuje prolyloligopeptidasa kromě prolinu také alainin, ovšem rychlost hydrolyzy vazby Ala-Xaa je o jeden až dva řády nižší než u vazby Pro-Xaa^{12,13}. V pozici P2 preferuje bazické, hydrofobní a alifatické aminokyseliny¹⁴, v P1' hydrofobní aminokyseliny, v pozicích P3 a P2' nebyla pozorována výrazná preference pro žádnou aminokyselinu¹⁵. Prolyloligopeptidas z různých druhů nevykazují podstatné rozdíly v substrátové specifitě¹⁶. Pro stanovení katalytické aktivity prolyloligopeptidas se používají malé syntetické chromogenní a fluorogenní substráty, nejčastěji dipeptid Gly-Pro s blokovaným N-koncem a připojenou detekční skupinou. pH optimum aktivity prolyloligopeptidas z různých druhů je mezi pH 7 a 8.

Prolyloligopeptidasa *in vitro* fragmentuje hormony obsahující prolin jako např. vasopresin, oxytocin, bradykinin, angiotensin, neuropeptidy ovlivňující paměť a učení jako substanci P, hormon uvolňující thyreotropin a opioidní neurotransmitery endorfiny a endomorfiny. Detailní seznam biologických peptidů fragmentovaných prolyloligopeptidasou *in vitro* lze nalézt v přehledném článku Garcia-Horsman a spol. (cit.¹⁷).

Prolyloligopeptidasa neštěpí proteinové substráty jako jsou např. lidský gastrin, kolagen, albumin, imunoglobuli-

ny, elastin nebo hemoglobin. Jedinou známou výjimkou jsou enzymy z parazitů rodu *Trypanosoma* (nazývané Tc80 a Tb80), které degradují fibronectin a kolageny typu I a IV (cit.¹⁸).

2.3. Biologická role prolyloligopeptidas

Prolyloligopeptidasa je široce rozšířena v mikroorganismech, houbách, rostlinách i u živočichů včetně člověka¹⁶. Ačkoliv jsou savčí prolyloligopeptidas velmi dobře charakterizovány jak strukturně, tak i enzymologicky, jejich fyziologické funkce nebyly dosud plně pochopeny.

U člověka je prolyloligopeptidasa přítomna ve všech orgánech a tkáních, nejvíce v mozku, ledvinách, varlatech a brzlíku¹⁹. V lidském mozku byla prolyloligopeptidasa lokalizována výhradně v neuronech v mozkové kůře, oblastech, které jsou spojené s učením a dlouhodobou pamětí²⁰. Enzymová aktivita prolyloligopeptidas byla také nalezena v tělních tekutinách (v krvi a spermatu), v proliferujících buňkách a různých nádorech¹⁹.

Prolyloligopeptidasa *in vitro* degraduje řadu biologicky aktivních peptidů, hormonů a neuropeptidů¹⁷, které jsou úzce spojovány s neurodegenerativními a neurologickými chorobami (s poruchami paměti, depresemi²¹, s kognitivní disfunkcí u osob trpících stařeckou demencí, Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou²²), nebo se podílí na regulaci krevního tlaku²³. Nicméně modulace aktivit bioaktivních peptidů prolyloligopeptidasou byla prokázána *in vivo* pouze pro substanci P, vasopresin a hormon uvolňující thyreotropin^{24,25}. Podle jedné z hypotéz mají inhibitory prolyloligopeptidas pozitivní vliv při léčbě poruch paměti, učení a mozkových poruch a obnovují sníženou hladinu neuropeptidů spojovanou s procesem stárnutí nebo mají příznivý vliv na progresi neurodegenerativních poruch²⁶.

Prolyloligopeptidasa by mohla mít prospěšné účinky při léčbě pacientů s celiakií, neboli glutenovou enteropatií, zánětlivým onemocněním sliznice tenkého střeva způsobeným nestráveným lepem (glutenem), který je bohatý na prolin^{27,28}. Momentálně je jedinou léčbou přísná dieta bez glutenových proteinů obsažených v pšenici, žitě a ječmeni. Za výše zmíněný zánět tenkého střeva jsou zodpovědné na prolin bohaté peptidy vzniklé neúplným štěpením lepku pepsinem a pankreatickými peptidasami²⁹. Jelikož prolyloligopeptidasa degraduje tyto imunogenní peptidy, mohla by být použita k účinné detoxifikaci lepku.

Mnoho funkcí prolyloligopeptidas je zprostředkováno nikoliv její aktivitou, ale interakcemi s jinými proteiny. Nejvíce studovaná interakce je s α -synukleinem (přehledně shrnuta v článku³⁰). Prolyloligopeptidasa *in vitro* akceleruje rychlost agregace α -synukleinu, což je jeden z klíčových faktorů patologie Parkinsonovy nemoci. Ačkoliv proces agregace není spojen s aktivitou enzymu, je možné jej blokovat prostřednictvím inhibitorů prolyloligopeptidas. Ty pravděpodobně indukují změnu terciární struktury prolyloligopeptidas a znemožňují tak interakci s α -synukleinem. *In vivo* byly prolyloligopeptidasa a α -synuklein kolokalizovány v buněčných liniích nadměrně produkujících α -synuklein a posmrtně v černé substantii (*substantia*

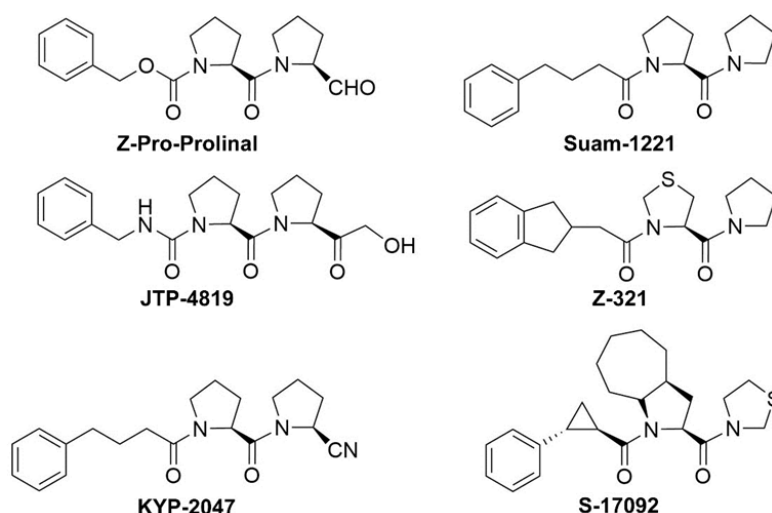
nigra) mozku osob trpících Parkinsonovou nemocí³¹. U buněčného modelu inhibitory prolyloligopeptidas zabránily kolokalizaci s α -synukleinem a výrazně snížily množství agregovaného α -synukleinu³². Prolyloligopeptidas proto představují potenciální cíl pro léčbu tohoto onemocnění.

Dále je prolyloligopeptidasa považována za potenciální cíl pro léčbu parazitárních chorob: schistosomózy, Chagasovy choroby a spavé nemoci^{14,33}. U krevničky, původce schistosomózy, je prolyloligopeptidasa lokalizovaná na povrchu parazita a je zapojena do interakce s hostitelem. Přispívá k modulaci nebo deregulaci homeostatických systémů řízených peptidovými hormony, a tím napomáhá přežití parazita v krevním systému hostitele. Anti-schistosomální účinek inhibitorů prolyloligopeptidas byl testován na živých larvách krevničky (tzv. schistosomulách). Při kultivování v médiích tyto inhibitory způsobily silnou degeneraci až mortalitu schistosomul¹⁴. Prolyloligopeptidasa krevničky je proto kritická pro přežití tohoto parazita a řadí se mezi potenciální cílové molekuly pro vývoj antischistosomálních terapeutik na bázi malých inhibitorů³⁴.

Oproti ostatním prolyloligopeptidasám mají trypanosomální enzymy z protozoálních parazitů *Trypanosoma cruzi* a *T. brucei* (Tc80 a Tb80), původců Chagasovy a spavé nemoci, odlišné fyziologické funkce. Jako jediné prolyloligopeptidas jsou schopné degradovat proteiny, konkrétně složky extracelulární matrix hostitele, jako jsou kolageny typu I a IV. Jsou vylučovány parazity do hostitele, kde napomáhají degradovat tyto proteiny extracelulární matrix a bazální laminy a přispívají tak k invazi do dalších hostitelských buněk^{18,33}.

3. Inhibitory prolyloligopeptidas

Připraveny a testovány byly stovky účinných syntetických inhibitorů prolyloligopeptidas, několik z nich bylo aplikováno i v klinických studiích (detailně jsou zpracovány v přehledných referátech^{26,35}). Většina těchto inhibitorů jsou analoga malých syntetických substrátů a jsou charakteristické reaktivními deriváty prolinu nebo pyrrolidinovým kruhem v pozici P1. Karboxylová skupina tohoto prolinu je často nahrazena elektrofilní skupinou, jako je např. nitril, aldehyd nebo keton (obr. 3). Prolin nebo jeho deriváty jsou preferovány i v pozici P2 a hydrofobní aromatické cykly v pozici P3. Jedním z prvních syntetických inhibitorů byl aldehyd Z-Pro-Prolinal³⁶, který se používá jako kanonická sloučenina pro vývoj nových peptidomimetik. Dalšími, často používanými inhibitory jsou reverzibilní kovalentní inhibitory JTP-4819, KYP-2047 a nekovalentní inhibitory jako SUAM-1221, Z-321 a S-17092 (obr. 3). Tyto specifické inhibitory byly navrženy k objasnění funkce prolyloligopeptidas v biologických a patologických procesech. V klinických testech byly jako terapeutická činidla pro léčbu kognitivních deficitů testovány tři inhibitory prolyloligopeptidas (S-17092, Z-321 a JTP-4819), nicméně klinické studie byly zastaveny



Obr. 3. Vybrané syntetické nízkomolekulární inhibitory prolyloligopeptidasy

z důvodu nízké účinnosti při podávání lidem – aplikace inhibitorů neprokázala výrazné kognitivní zlepšení.

4. Závěr

Prolyloligopeptidasa je cytoplasmatická serinová peptidasa, která štěpí biologicky aktivní peptidy (hormony a neuropeptidy) za prolinovým zbytkem. Tento enzym je u savců přítomný téměř ve všech tkáních, relativně vysoká koncentrace se nachází ve tkáních centrálního nervového systému. Přepokládá se proto, že prolyloligopeptidasa je zapojena do neurologických procesů a inhibitory prolyloligopeptidasy by mohly zlepšovat kognitivní vlastnosti a mít neuroprotektivní účinek. Nicméně přesná biologická role prolyloligopeptidasy je stále nejasná, a proto není stále dobře definovaným terapeutickým cílem. Pro objasnění její biologické úlohy a pro ověření terapeutického účinku inhibitorů v kognitivních procesech jsou nutné další studie.

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a grantového projektu 19-17269S Grantové agentury České republiky.

LITERATURA

1. Rawlings N. D., Barrett A. J., Thomas P. D., Huang X., Bateman A., Finn R. D.: *Nucleic Acids Res.* 46, D624 (2018).
2. Cunningham D. F., O'Connor B.: *Biochim. Biophys. Acta* 1343, 160 (1997).
3. Barrett A. J., Rawlings N. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247 (1995).
4. Walter R., Shlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerenyi T. D.: *Science* 173, 827 (1971).
5. Kato T., Okada M., Nagatsu T.: *Mol. Cell. Biochem.* 32, 117 (1980).
6. Dresdner K., Barker L. A., Orlowski M., Wilk S.: *J. Neurochem.* 38, 1151 (1982).
7. Gotoh H., Hagihara M., Nagatsu T., Iwata H., Miura T.: *Clin. Chem.* 34, 2499 (1988).
8. Tenorio-Laranga J., Venäläinen J. I., Männistö P. T., García-Horsman J. A.: *FEBS J.* 275, 4415 (2008).
9. Fülöp V., Böcskei Z., Polgár L.: *Cell* 94, 161 (1998).
10. Wilk S.: *Life Sci.* 33, 2149 (1983).
11. Nomura K.: *FEBS Lett.* 209, 235 (1986).
12. Walter R., Yoshimoto T.: *Biochemistry* 17, 4139 (1978).
13. Yoshimoto T., Fischl M., Orlowski R. C., Walter R.: *J. Biol. Chem.* 253, 3708 (1978).
14. Fajtová P. a 10 spoluautorů: *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9, e0003827 (2015).
15. Koida M., Walter R.: *J. Biol. Chem.* 251, 7593 (1976).
16. Venäläinen J. I., Juvonen R. O., Männistö P. T.: *Eur. J. Biochem.* 271, 2705 (2004).
17. García-Horsman J. A., Männistö P. T., Venäläinen J. I.: *Neuropeptides* 41, 1 (2007).
18. Bastos I. M., Motta F. N., Charneau S., Santana J. M., Dubost L., Augustyns K., Grellier P.: *Microbes Infect.* 12, 457 (2010).
19. Goossens F., De Meester I., Vanhoof G., Scharpé S.: *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 17 (1996).
20. Myöhänen T. T., Venäläinen J. I., Tupala E., García-Horsman J. A., Miettinen R., Männistö P. T.: *Neurochem. Res.* 32, 1365 (2007).
21. Maes M., Goossens F., Scharpe S., Calabrese J., Desnyder R., Meltzer H. Y.: *Psychiatry Res.* 58, 217 (1995).

22. Toide K., Shinoda M., Iwamoto Y., Fujiwara T., Okamiya K., Uemura A.: *Behav. Brain Res.* 83, 147 (1997).
23. Welches W. R., Santos R. A., Chappell M. C., Brosnihan K. B., Greene L. J., Ferrario C. M.: *J. Hypertens.* 9, 631 (1991).
24. Toide K., Okamiya K., Iwamoto Y., Kato T.: *J. Neurochem.* 65, 234 (1995).
25. Bellemère G., Vaudry H., Morain P., Jégou S.: *J. Neuroendocrinol.* 17, 306 (2005).
26. Lawandi J., Gerber-Lemaire S., Juillerat-Jeanneret L., Moitessier N.: *J. Med. Chem.* 53, 3423 (2010).
27. Hausch F., Shan L., Santiago N. A., Gray G. M., Khosla C.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G996 (2002).
28. Shan L., Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G. M., Sollid L. M., Khosla C.: *Science* 297, 2275 (2002).
29. Piper J. L., Gray G. M., Khosla C.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 213 (2004).
30. Lambeir A. M.: *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* 10, 349 (2011).
31. Hannula M. J., Myöhänen T. T., Tenorio-Laranga J., Männistö P. T., García-Horsman J. A.: *Neuroscience* 242, 140 (2013).
32. Myöhänen T. T., Hannula M. J., Van Elzen R., Gerard M., Van Der Veken P., García-Horsman J. A., Baekelandt V., Männistö P. T., Lambeir A. M.: *Br. J. Pharmacol.* 166, 1097 (2012).
33. Bastos I. M., Motta F. N., Grellier P., Santana J. M.: *Curr. Med. Chem.* 20, 3103 (2013).
34. Jílková A., Horn M., Mareš M.: *Chem. Listy* 112, 3 (2018).
35. Lopez A., Tarrago T., Giralt E.: *Expert Opin. Ther. Pat.* 21, 1023 (2011).
36. Yoshimoto T., Kawahara K., Matsubara F., Kado K., Tsuru D.: *J. Biochem.* 98, 975 (1985).

P. Fajtová and M. Horn (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague*): **Prolyl Oligopeptidase in Physiology and Pathology**

Prolyl oligopeptidase is an atypical serine peptidase which digests bioactive peptides, including hormones and neuropeptides. Prolyl oligopeptidase cleaves internal peptide bonds on the C-terminal side of proline residues. Orthologous enzymes are found in plants, bacteria, fungi, protozoa, invertebrates and vertebrates. This review provides an update on function and structure of prolyl oligopeptidase; it is also focused on its biological role and implication in physiological processes and disorders.

Keywords: proteolytic enzymes, serine peptidase, prolyl oligopeptidase, physiological role

Acknowledgements

This work was supported by the project InterBioMed LO1302 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by grant 19-17269S from the Czech Science Foundation.

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

ANALÝZA OBSAHU ANTOKYÁNOV
V BOBULIACH *Vaccinium corymbosum*,
Vitis vinifera A *Aronia melanocarpa*
Z VÝCHODNÉHO SLOVENSKAONDREJ RAGAČ^a, JANKA PORÁČOVÁ^b,
JANKA VAŠKOVÁ^c, MARTA MYDLÁROVÁ
BLAŠČÁKOVÁ^b a VINCENZO DE FEO^d^a AtB Pharma s.r.o., 970 00 Slovenská Ľupča, Slovenská republika, ^b Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika,^c Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika, ^d Katedra farmácie, Univerzita v Salerne, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano Salerno, Taliansko
janka.vaskova@upjs.sk

Došlo 27.6.19, prijaté 29.8.19.

Kľúčové slová: antokyány, čučoriedka, arónia, hrozno, MeOH extrakcia, lyofilizácia

Úvod

Antokyány, podskupina flavonoidov, sú široko distribuovanou skupinou vo vode rozpustných rastlinných pigmentov. Sú to glykozidy alebo acylglykozidy antokyanidínov odvodených z flavyliového iónu a tvoria polyhydroxy- a polymetoxyderiváty, kde stupeň ich chemickej modifikácie poskytuje vyššiu stabilitu a rozpustnosť^{1–3}. Najčastejšie prirodzene sa vyskytujúce antokyány sú kyanidín, delfidín, pelargonidín, malvidín, petunidín a peonidín⁴. Antioxidačná aktivita flavonoidov v živých systémoch bola dokázaná niekoľkými štúdiami, pričom táto aktivita silne koreluje s obsahom antokyánov^{5,6}. Uvádza sa, že táto vlastnosť závisí, okrem iných faktorov, od druhu rastliny, zemepisného pôvodu a času zberu^{7,8}.

Niektoré výhody príjmu antokyánov sa týkajú znížovania rizika „ochorenia životného štýlu“⁹. Ich priaznivé účinky na znížovanie metabolických rizikových faktorov a rozvoj mŕtvice, srdcových ochorení a diabetu sú pripisované schopnosti zlepšiť antioxidačný stav, dyslipidémiu, zníženiu postprandiálnej glykémie, sekrécie inkretínu a inzulínu^{10–12}. Ich potenciál v prevencii ako aj v liečbe rakoviny je odvodený zo schopnosti modulovať mitochondriálne funkcie, čím ovplyvňujú energetický metabolizmus

buniek a potenciálne indukujú vnútorné cesty apoptózy^{13,14}. Okrem vnútorného použitia sa zistili aj priame foto-protéktívne účinky antokyánov, pri priamom topickom použití¹⁵.

Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott patrí do čeľade Rosaceae a pochádza zo Severnej Ameriky, kde sa plody tradične používajú v ľudovom liečiteľstve na liečbu prechladnutia^{16,17}. V 20. storočí, okolo roku 1946, sa zaviedla ako odroda v Sovietskom zväze a vo východnej Európe^{16,18}. Bobule arónie majú najvyššiu antioxidačnú kapacitu spomedzi bobuľovitých a iných plodov, ktoré boli doteraz preskúmané¹⁹. Bobule arónie sa vyznačujú vysokým obsahom antokyánov, prokyanidínov a fenolových kyselín^{20,21}. Kultivary boli pestované pre získanie väčšieho ovocia alebo ako okrasné rastliny. Medzi najvýznamnejšie kultivary v Európe patria „Nero“, „Rubina“, „Viking“, „Hugin“, „Fertödi“ a „Aron“¹⁷. *Vaccinium corymbosum* L. (syn. *V. coveleanum* Butkus et Pliszka) patrí do čeľade Ericaceae. Čučoriedky sú spomínané pre vysoký obsah antokyánov, fenolových kyselín (benzoovej a škoricovej), flavanolov, flavonolov, prokyanidínov a stilbénov²². Špecifický obsah účinných látok je zaujímavý z hľadiska záhradníctva a pre ľahkú dostupnosť pre spotrebiteľov. Hrozno je jednou z najstarších rastlín pestovaných človekom²³. S cieľom zvýšiť odolnosť viniča voči určitým chorobám sa získali viaceré nové medzidruhové hybridy spätným krížením s európskymi odrodami *Vitis vinifera* L.²⁴. Antokyány sú hlavné flavonoidy zodpovedné za červenú farbu odrôd viniča vzhľadom na umiestnenie v koži bobúľ. Je dobre známe, že koncentrácia antokyánu sa môže medzi rôznymi ročníkmi daného kultivaru značne líšiť v dôsledku environmentálnych a agronomických faktorov²⁵.

Vzhľadom na potenciálne zdravotné prínosy má analýza obsahu antokyánov kľúčový význam, najmä pre ich použitie v potravinárskej a doplnkovej výrobe. V Európe sú predávané mnohé potravinové doplnky obsahujúce extrakty z týchto troch plodov, získané rôznymi postupmi. Cieľom tohto výskumu bolo porovnať dve metódy prípravy s ohľadom na obsah antokyánov v troch komerčných kultivároch týchto plodov.

Materiály a metódy

Rastlinný materiál a chemikálie

Zobieralo sa desať kilogramov z každého druhu bobúľ: *V. corymbosum* 'Berkeley' z Krivá na Orave (N49° 28'13", E19°47'34"); *A. melanocarpa* 'Nero', z Pozdišovce, (N48°71'83", E21°84'41"); *V. vinifera* 'Lemberger', z územia Prešovskej univerzity (N48°59'22", E21°13'35") na Slovensku. Chemikálie analytickej kvality boli zakúpené od Sigma-Aldrich (Nemecko).

Postup lyofilizácie a extrakcie

Po odstránení stoniek a iných častí rastlín sa plody rozmleli a homogenizovali. Do zásobníkov z nehrdzavejúcej ocele sa umiestnilo 187 g každého homogenátu a potom sa skladovalo v lyofilizátore GEA Lyophil SMART® SL 2 (Kolín, Nemecko). Parametre lyofilizačného procesu sú uvedené v tab. I, podľa postupu Michalczyka a spol.²⁶ Lyofilizáty a homogenáty čerstvého ovocia boli pripravené na extrakciu nasledovne: pomer extrahovateľného materiálu/rozpúšťadla bol 1:10; proces extrakcie rozpúšťadlom prebiehal počas jednej hodiny za stáleho miešania v zmesi metanol: voda: kyselina mravčia (70:29:1, v/v/v). Zmes sa potom ochladila na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, nasledovala filtrácia a kvantitatívny prenos s 10 ml metanolu do odparovacej banky. Konečný objem extraktu z rotačnej odparky bol 2 ml. Na kvantitatívny prenos výsledného zvyšku sa použili 3 ml 1% kyseliny mravčej v metanole a extrakty sa uskladnili v mrazničke pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Postup sa opakoval trikrát. Koncentrovanie extraktov sa uskutočnilo na rotačnej odparovačke: odparovanie sa začalo pri tlaku 10 až 15 kPa. Následne sa tlak znížil na asi 5 kPa. Konečné odparenie rozpúšťadla sa uskutočnilo pri zvyškovom tlaku asi 2,5 kPa.

Kvantitatívna a kvalitatívna analýza

ESI-LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Japonsko) prístroj bol použitý na kvalitatívne a kvantitatívne sledovanie antokyánov za nasledujúcich podmienok: HPLC: Shimadzu HPLC systém, systémový kontrolér: CMB – 20A, binárne čerpadlo LC – 20AB, automatický dávkovač SIL – 20A, stojan na vzorky – 1,5 ml /105 injekčných liekoviek, rúra:

Tabuľka I
Parametre lyofilizačného procesu

Krok	Teplota produktu [$^{\circ}\text{C}$]	Tlak v komore [kPa]	Čas [min]
Nakladanie	5	100	–
Zmrazovanie	-23	100	60
Zmrazovanie	-23	100	120
Evakuácia	-23	20	30
Primárne sušenie	0	20	120
Primárne sušenie	0	20	615
Primárne sušenie	15	20	60
Primárne sušenie	15	20	555
Sekundárne sušenie	35	10	60
Sekundárne sušenie	35	10	540
Prevzdušňovanie		100	–
Trvanie procesu lyofilizácie			2160

CTO – 20A, LCMS: kolóna C18 ($150 \times 3\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), pH v rozmedzí 2–7, prietok: $0,8\text{--}1,2\text{ ml min}^{-1}$. MS: Shimadzu LCMS-IT-TOF®, softvér: LCMS Solution®, Formula predictor®.

Separácia antokyánov sa uskutočnila gradientovou chromatografiou na kolóne s reverznou fázou s použitím externého štandardu modifikovanou metódou pôvodne podľa Kšonžekovej a spol.²⁷ Vzhľadom k tomu, že medzi potenciálne zisťovanými antokyánmi sa vyskytuje viacero látok s identickou mólovou hmotnosťou, ako napr. kyanidín-3-*O*-galaktozid a kyanidín-3-*O*-glukozid, ktoré majú identickú hodnotu m/z iónov $[\text{M}+\text{H}]^{+}$, bolo nutné prispôbiť podmienky HPLC analýzy tak, aby tieto látky eluovali v odlišných časoch. Zloženie mobilnej fázy bolo nasledovné: A: acetonitril, B: kyselina mravčia vo vodnom roztoku (pH 2,35) $0,19\text{ mol dm}^{-3}$, prietok: $0,3\text{ ml min}^{-1}$, injekčný objem: $20\text{ }\mu\text{l}$, teplota kolóny: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, doba: 40 min ; priebeh gradientovej elúcie (čas A/B): $0,0\text{--}10,0\text{ min }10/90$, $10,0\text{--}20,0\text{ min }20/80$, $20,0\text{--}33,0\text{ min }50/50$, $33,0\text{--}40,0\text{ min }10/90$. Parametre kvalitatívnej analýzy pomocou hmotnostnej spektrofotometrie s elektrosprejovou ionizáciou boli nasledovné: teplota CDL: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, prietok N_2 (nebulizér): $1,50\text{ l min}^{-1}$, N_2 (sušiaci plyn), tepelný blok: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, čas analýzy: 40 min , MS s manuálnym skenovaním a rozsah analýzy: m/z $150,0000\text{--}800,0000$. Komerčne čisté antokyány (kyanidín-3-*O*-galaktozid, kyanidín-3-*O*-glukozid, malvidín-3-*O*-galaktozid, malvidín-3-*O*-glukozid, kyanidín-3,5-di-*O*-glukozid, kyanidín-3-*O*-glukozid, 3-*O*-rutinozid a pelargonidín-3-*O*-glukozid v koncentráciách $13,34\text{ mg l}^{-1}$, $95,2\text{ mg l}^{-1}$ a 667 mg l^{-1}) sa použili na overenie úplnej separácie na HPLC kolóne a tiež k informáciám o MS a MS^2 počas experimentu. Celkový obsah stanovených antokyánov bol vyjadrený ako mg ekvivalentov kyanidín-3-glukozidu na kg čerstvej hmotnosti (fresh weight, FW) zo spektrofotometricky stanovených koncentrácií vzoriek pri rozdielnom pH podľa nasledujúceho prepočtu: $(A \times Mw \times DF \times 10^3)/(\epsilon \times a)$. A predstavuje rozdiel absorbancií meraných pri 520 a 700 nm $(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$. Mw – molekulová hmotnosť kyanidín-3-glukozidu ($449,2\text{ g mol}^{-1}$), DF – faktor riedenia, a – optická dĺžka kvety, ϵ – molárny absorpčný koeficient pre kyanidín-3-*O*-glukozid ($26900\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$).

Štatistická analýza

Na štatistické vyhodnotenie účinnosti lyofilizačného procesu a porovnanie výťažnosti extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie boli použité neparametrické Kruskal-Wallisove a Wilcoxonove testy (STATISTICA, Ver. 10 StatSoft, USA).

Výsledky

Kvalitatívna analýza

Rôzne antokyány boli identifikované pomocou LC-MS analýzy s použitím potvrdzovacieho algoritmu.

Hmotnostné spektrá antokyánov boli získané ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom móde. V priebehu celého experimentálneho procesu v žiadnych bobuliach nebol nájdený ani kyanidín-3-*O*-rutinozid ani pelargonidín-3-*O*-glukozid (tab. II).

Kvantitatívna analýza

Stanovenie antokyánov sa uskutočnilo pomocou HPLC v reverznej fáze s gradientovou elúciou s použitím externej štandardnej kalibračnej krivky (obr. 1). Výsledný obsah pevnej látky po lyofilizácii bol $23,49 \pm 1,16$ g pre *V. corymbosum*, $34,29 \pm 0,36$ g pre *A. melanocarpa* a $40,59 \pm 0,79$ g pre *V. vinifera*, z počiatočnej celkovej hmotnosti 187 g homogenátu.

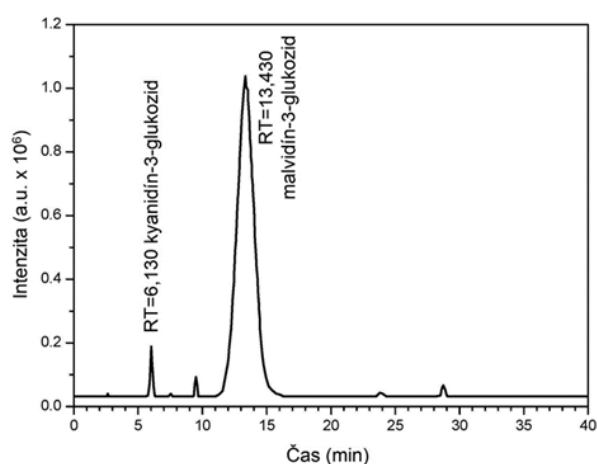
Výsledky ukazujú priemerný celkový obsah antokyánov v metanолоvom extrakte z hrozna $1576,3 \pm 132,5$ mg kg⁻¹ FW a s 2,1-násobným zvýšením, teda $3325,3 \pm 156,7$ mg kg⁻¹ FW v lyofilizáte. Pre antokyány čučoriedky bol priemerný obsah v metanолоvom extrakte $364,3 \pm 49,35$ mg kg⁻¹ FW na rozdiel od $2840,4 \pm 123,8$ mg kg⁻¹ FW v lyofilizovanom stave, s 7,8-násobným zvýšením pri lyofilizácii. Najvyššie množstvá antokyánov sme získali v extrakte z čučoriedok s hodnotami $3963,2 \pm 140,2$ mg kg⁻¹ FW a s 3,7-násobným zvýšením pri lyofilizácii ($14758,8 \pm 235,2$ mg kg⁻¹ FW).

Koncentrácie jednotlivých antokyanínov zistené v metanолоvých a lyofilizovaných extraktoch z troch typov bobúľ sú uvedené v tab. III. Najvyšší obsah antokyánu malvidín-3-*O*-glukozidu bol detegovaný v lyofilizátoch

Tabuľka II

Kvalitatívna analýza antokyánov v bobuliach – *Vaccinium corymbosum* L., *Vitis vinifera* L., *Aronia melanocarpa* L.

Antokyán	Retenčný čas [min]	Molekulárny ión	Fragmentačný ión
<i>V. corymbosum</i>			
Delfinidín + 3 hexózy	3,105	627,16	465,10 303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -galaktozid	3,118	465,10	303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -glukozid	3,905	465,10	303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinozid	5,067	435,09	303,05
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	5,290	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,023	449,11	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -galaktozid	6,083	479,12	317,07
Petunidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,267	479,12	317,07
Kyanidín-3- <i>O</i> -arabinozid	7,334	419,09	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinozid	8,954	449,11	317,07
Peonidín-3- <i>O</i> -galaktozid	9,233	463,13	301,07
Malvidín-3- <i>O</i> -galaktozid	10,91	493,13	331,08
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	13,22	493,13	331,08
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinozid	16,39	463,12	331,08
<i>V. vinifera</i>			
Delfinidín-3- <i>O</i> -glukozid	4,216	465,10	303,05
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,130	449,11	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -glukozid	7,156	479,12	317,07
Peonidín-3- <i>O</i> -glukozid	11,45	463,13	301,07
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	13,43	493,13	331,08
<i>A. melanocarpa</i>			
Kyanidín-3,5- <i>O</i> -diglukozid	4,305	611,16	449,11 287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	5,290	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,023	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -arabinozid	7,188	419,09	287,06
Kyanidín + pentóza	12,57	419,09	287,06



Obr. 1. Ukážka HPLC analýzy obsahu antokyánov v čerstvých bobuliach viniča. Podmienky uvedené v texte

V. corymbosum a *V. vinifera*. Podobne vysoký obsah kyanidín-3-*O*-galaktozidu a kyanidín-3-*O*-glukozidu bol nájdený v metanolovom extrakte z plodov *A. melanocarpa*. Zďaleka najvyšší obsah antokyánov, kyanidín-3-*O*-glukozidu a kyanidín-3-*O*-galaktozidu bol nájdený v lyofilizovaných čučoriedkach. Hodnoty kyanidín-3-*O*-glukozidu sa použili na kvantitatívne hodnotenie lyofilizovaných a metanolových extraktov Kruskal-Wallisovým testom^{28–30} vo všetkých extraktoch. Jeho obsah sa výrazne líšil v extraktoch ($df = 2$, $N = 15$, $12,3750$, $p = 0,0021$) po viacnásobnom porovnaní hrozno/arónia, ako aj po viacnásobnom porovnaní čučoriedky/arónia ($df = 2$, $N = 15$, $12,5000$, $p = 0,0019$).

Extrakt z arónie, buď metanolové extrakty alebo lyofilizáty, vykazovali najvyšší obsah kyanidín-3-*O*-glukozidu. Priemerná hodnota metanolových extraktov bola $1488,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a lyofilizátov $5492,7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$, čo predstavuje 3,7-násobné zvýšenie (tab. III). Pre čučoriedky bol nárast obsahu kyanidín-3-*O*-glukozidu v lyofilizátoch približne 1,6-násobný, s priemernými hodnotami pre extrakty metanolu $33,76 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a $54,01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ pre lyofilizáty (tab. III). Najvyššie množstvá boli zistené v hrozne, kde obsah kyanidín-3-*O*-glukozidu v metanolovom extrakte bol $12,71 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a $178,8$

Tabuľka III

Štatistické vyhodnotenie obsahu antokyánov (mg/kg FW) v extraktoch z procesu extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie

Antokyány	MeOH extrakcia			Lyofilizácia		
	stredná hodnota (min-max)	SD	CV [%]	stredná hodnota (min-max)	SD	CV [%]
<i>Vaccinium corymbosum</i> 'Berkeley'						
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	64,46 (61,15–71,46)	4,77	7,40	537,7 (485,7–586,3)	44,03	8,18
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	33,76 (28,74–39,00)	4,74	14,05	54,01 (30,89–64,87)	14,20	26,30
Malvidín-3- <i>O</i> -galaktozid	230,0 (200,1–282,3)	36,57	15,90	2071,4 (1870,0–2266,2)	161,9	7,81
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	36,05 (32,99–38,10)	2,38	6,62	177,3 (151,3–204,9)	18,98	10,70
<i>Vitis vinifera</i> 'Lemberger'						
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	12,71 (10,53–16,04)	2,17	17,06	178,8 (89,40–308,9)	85,05	47,57
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	536,2 (436,8–721,5)	122,9	21,81	3146,5 (2283,1–3674,1)	521,5	16,57
<i>Aronia melanocarpa</i> 'Nero'						
Kyanidín-3,5- <i>O</i> -diglukozid	13,37 (12,61–14,55)	0,69	5,16	76,51 (74,61–78,36)	1,47	1,92
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	2461,7 (2170,3–2666,3)	169,1	6,86	9189,6 (8930,9–9662,6)	276,8	3,01
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	1488,2 (1306,0–1687,9)	147,8	9,92	5492,7 (4849,5–6797,5)	770,0	14,01

mg kg⁻¹ FW v lyofilizáte, čo predstavuje približne 14,06-násobné zvýšenie (tab. III). Wilcoxonov test ukázal závislosť medzi obsahom antokyánov a extrakčnou metódou z arónie a hrozna ($p = 0,043$).

Napriek tomu, že proces lyofilizácie vedie k zvýšeniu obsahu antokyánov vo všetkých extraktoch. Výsledky ukázali, že počas lyofilizačného procesu dochádza k degradácii významného množstva kyanidín-3-glukozidu. Potvrďuje to relatívne vysoký variačný koeficient (tab. III) pre obsah kyanidín-3-O-glukozidu v metanolových extraktoch a lyofilizátoch (14,05–26,30 % pre čučoriedky, 17,6–47,58 % pre hrozno a 9,92–2,14 % pre arónie). Koeficienty variácie pre ostatné antokyány boli v rozpätí od 1,925 do 9,928 % pre arónie, 16,57–21,82 % pre hrozno a 7,407–15,90 % pre čučoriedky.

Diskusia

Antokyány sú veľmi dobre rozpustné v polárnych rozpúšťadlách, ľahko sa extrahujú vodou, metanolom a etanolom². Konkrétne sa zistilo, že metanol je vo všeobecnosti účinnejší pri extrakcii polyfenolov s nižšou molekulovou hmotnosťou, pričom sa dosiahli najlepšie výťažky extrakcie antokyánov pridaním slabých organických kyselín, ako je kyselina mravčia, kyselina octová atď., ktoré zabráňujú ich oxidácii³¹. Hua a spol.³² a Thao a spol.³³ určili pre extrakciu antokyánov najlepšie pomery rozpúšťadla/suroviny v pomere 1:10 a 1:20. V našej štúdii bola taktiež dodržaná odporúčaná doba extrakcie 60 min (cit.³⁴). Účelom štúdie bolo porovnať účinnosť extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie pre tri druhy bobúľ stanovením obsahu celkových antokyánov.

Výsledky niekoľkých štúdií zhrnutých Jovančevićom a spol.³⁵ sa zhodujú, že čučoriedky sú charakteristické 15 antokyánovými glykozidmi (5 antokyánov je kombinovaných s galaktózou, glukózou a arabinózou). Koncentrácie antokyánov môžu byť ovplyvnené podmienkami prostredia a genetickými rozdielmi. Stupeň ich akumulácie však závisí predovšetkým od svetelných podmienok a nízkych teplôt. U *V. corimbosum* sme zistili prítomnosť piatich antokyánov v kombinácii s vyššie uvedenými sacharidmi. Obsah antokyánov súhlasí so zisteniami Diaconeas a spol.³⁶, pričom ich množstvo sa líši medzi odrodami. V porovnaní so štúdiou Pereira a spol.³⁷ bol obsah malvidínu-3-O-galaktozidu najvyšší (tab. III); avšak peonidín-3-O-arabinóza zistená nebola. Naše výsledky potvrdzujú úspešnosť metódy extrakcie rozpúšťadlom. Celkový obsah antokyánov v lyofilizovaných extraktoch predstavoval 7,8-násobné zvýšenie obsahu v porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom.

Najvyšší obsah jednotlivých antokyánov bol zistený v bobuliach arónie 'Nero'. Extrakty vykazovali najvyšší obsah nielen v metanolovom extrakte (3963,2 mg kg⁻¹ FW), ale aj v lyofilizovanom stave (14758,8 mg kg⁻¹ FW), kde sa celkový obsah zvýšil až na 3,7-násobok. Arónie patria k najbohatším rastlinným zdrojom antokyánov, ktoré obsahujú najmä glykozidy, predstavujúce približne

25 % celkového obsahu polyfenolov^{38,39}. V našej štúdii sme našli len kyanidínové glykozidy. Hoci množstvo antokyánov z extrakcie rozpúšťadlom (3963,2 mg kg⁻¹ FW) je nižšie ako množstvo stanovené pre kultivar 'Nero' z rôznych oblastí, ako je uvedené v Hwang a Thi⁴⁰, vysoký obsah kyanidínu-3-O-galaktozidu je totožný s údajmi uvádzanými pre koncentrát šťavy z arónie⁴¹. V našej štúdii však bolo zistené množstvo kyanidín-3-O-galaktozidu v lyofilizovaných extraktoch oveľa vyššie ako najvyššie množstvá detegované Hwangom a Thi⁴⁰ z oblasti Sangju. Najvyšší obsah bol pozorovaný pre kyanidín-3-O-glukozid. Bolo ho len asi trojnásobne menej ako kyanidín-3-O-galaktozidu, ale v uvedených štúdiách bol obsah až 15 až 20× nižší.

Podobne sme zistili prítomnosť kyanidín-pentóz. Hoci Brazdauskas a spol.⁴² identifikovali iné antokyaníny, ako je napríklad delfinidín arabinozid, petunidín *p*-kumaroylglykózid alebo peonidín-glukozid, rozdiel je v množstve diglukozidu. Identifikovali sme antokyány glykozylované iba glukózou (tab. III) a nižším množstvom kyanidínu v hrozne cv 'Lemberger', ako už bolo uvedené v extraktoch z celých bobúľ z rôznych odrôd červeného hrozna²⁵. Podľa zistených profilov antokyánov v tejto štúdii, antokyány s kyanidínom sa vyskytovali v odrodách *V. vinifera* v nižších množstvách. Priemerné množstvá jednotlivých pigmentov boli 49 % malvidín-3-O-glukozidu, 12 % malvidín-3-O-(6'-O-kumaroyl)glukozidu, 10 % peonidín-3-O-glukozidu, 6 % petunidínu-3-O-glukozidu a 6 % delfinidín-3-O-glukozidu, s významným obsahom malvidín-3-O-glukozidu. Po procese lyofilizácie sa v porovnaní s metanolovým extraktom pozoroval viac ako 5-násobný nárast (tab. III). Výsledky našej štúdie sú podobné zisteniam Lukića a spol.⁴³. V porovnaní s kvantifikovaným obsahom tej istej odrody sa zistili vyššie hladiny kyanidín-3-O-glukozidu⁴⁴.

Výťažok lyofilizácie sa medzi plodmi líšil. Ako vyplýva zo štatistického spracovania, táto skutočnosť bola ovplyvnená viacerými faktormi; najmä zložením lyofilizovaných plodov. Plody čučoriedky sa skladajú najmä z pokožky a dužiny, pričom podstatná časť matrix je voda. Bobule hrozna však obsahuje okrem pokožky a dužiny aj jadierka, ktoré zvyšujú hmotnosť lyofilizačného produktu, čím ovplyvňujú účinnosť lyofilizačného procesu. Lyofilizáty však tiež vykazovali niekoľkokrát vyššie množstvá antokyánov. Bolo pozorované, že zahrievanie na 40–60 °C významne neovplyvňuje celkovú koncentráciu antokyánov⁴⁵, naopak, ohrev na teploty nad 60 °C celkovú koncentráciu antokyánov môže ovplyvniť. Dokonca bolo preukázané, že nižší tlak pri procese sušenia vymrazovaním zvyšuje degradáciu⁴⁶.

Záver

Množstvo a zloženie antokyánov ukázané v predchádzajúcich štúdiách sa líši aj v rámci odrôd. Z výsledkov štúdie vyplýva, že aj keď je celkový obsah antokyánov v lyofilizovaných extraktoch niekoľkonásobne vyšší

v porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom, hodnoty štandardnej odchýlky a variačného koeficientu zo štatistického vyhodnotenia a tiež z relatívnych pomerov koncentrácií jednotlivých antokyánov v metanolových extraktoch v porovnaní s lyofilizátmi poukazujú na fakt, že degradácia významného množstva glukozidov (najmä kyanidín-3-O-glukozidu) počas procesu lyofilizácie je zrejmalá.

Radi by sme sa poďakovali doc. prof. R. Mariychukovi za jeho skúsenosti a cenné pripomienky k procesu extrakcie.

Tento výskum bol podporený projektom KEGA 018PU-4/2018: Inovácia metód a foriem vyučovania predmetu biochémie.

LITERATÚRA

1. Dia V. P., Wang Z., West M., Singh V., West L., Gonzalez de Mejia E.: *J. Agric. Food Chem.* **64**, 3205 (2015).
2. Lima A. B., Corrêa A. D., Saczk A. A., Martins M. P., Castilho R. O.: *Rev. Bras. Frutic.* **33**, 877 (2011).
3. Zhao C. L., Yu Y. Q., Chen Z. J., Wen G. S., Wei F. G., Zheng Q., Wang C. D., Xiao X. L.: *Food Chem.* **214**, 119 (2017).
4. Trouillas P., Sancho-Garcia J. C., De Freitas V. A., Gierschner J., Otyepka M., Dangles O.: *Chem. Rev.* **116**, 4937 (2013).
5. Domoráková I., Burda J., Mechírová E., Feriková M.: *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 1193 (2006).
6. Kucharska A. Z., Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Piórecki N., Fecka I.: *Molecules* **22**, E045 (2017).
7. Kapci B., Neradová E., Čížková H., Voldřich M., Rajchl A., Capanoglu E.: *J. Food Nutr. Res.* **52**, 219 (2013).
8. Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J. A., Bagchi D.: *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 675 (2007).
9. Cassidy A., Bertoia M., Chiuve S., Flint A., Forman J., Rimm E. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* **104**, 587 (2016).
10. Alvarez-Suarez J. M. a 12 spoluautorov: *J. Nutr. Biochem.* **25**, 289 (2014).
11. Castro-Acosta M. L., Smith L., Miller R. J., McCarthy D. I., Farrimond J. A., Hall W. L.: *J. Nutr. Biochem.* **38**, 154 (2016).
12. Liu C., Sun J., Lu Y., Bo Y.: *PLoS One* **11**, e0162089 (2016).
13. Forbes-Hernandez T. Y., Giampieri F., Gasparrini M., Mazzoni L., Quiles J. L., Alvarez-Suarez J. M., Battino M.: *Food Chem. Toxicol.* **68**, 154 (2014).
14. Pistollato F., Giampieri F., Battino M.: *Food Chem. Toxicol.* **75**, 58 (2015).
15. Gasparrini M., Forbes-Hernandez T. Y., Afrin S., Alvarez-Suarez J. M., González-Paramás A. M., Santos-Buelga C., Bompadre S., Quiles J. L., Mezzetti B., Giampieri F.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 17870 (2015).
16. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M.: *J. Med. Food* **13**, 255 (2010).
17. Kulling S. E., Rawel H. M.: *Planta Med.* **74**, 1625 (2008).
18. Valcheva-Kuzmanova S. V., Belcheva A.: *Folia Med.* **48**, 11 (2006).
19. Zapolska-Downar D., Bryk D., Małecki M., Hajdukiewicz K., Sitkiewicz D.: *Eur. J. Nutr.* **51**, 563 (2012).
20. Skrovankova S., Sumczynsk D., Mice J., Jurinkov T., Sochor J.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 24673 (2015).
21. Yamane T., Kozuka M., Yamamoto Y., Nakano Y., Nakagaki T., Ohkubo I., Ariga H.: *Funct. Foods Health Dis.* **6**, 144 (2016).
22. Contreras R. A., Köhler H., Pizarro M., Zúñiga G. E.: *Antioxidants* **4**, 281 (2015).
23. Vanini L. S., Hirata T. A., Kwiatkowski A., Clemente E.: *Braz. J. Food Technol.* **12**, 213 (2009).
24. Kozma P. Jr.: *Acta Hort.* **528**, 505 (2000).
25. Balík J., Kumšta M., Rop O.: *Chem. Pap.* **67**, 1285 (2013).
26. Michalczyk M., Macura R., Matuszak I.: *J. Food Process. Preserv.* **33**, 11 (2009).
27. Kšonžeková P., Mariychuk R., Eliašová A., Mudroňová D., Csank T., Király J., Marcincáková D., Pistl J., Tkáčiková L.: *J. Sci. Food Agric.* **96**, 1093 (2016).
28. Aschenbach J. R., Borau T., Gäbel G.: *J. Nutr.* **132**, 1254 (2002).
29. Chan Y., Walmsley R. P.: *Phys. Ther.* **77**, 1755 (1997).
30. Ostertagova E., Ostertag O.: *Appl. Mech. Mat.* **611**, 115 (2014).
31. Dai J., Mumper R. J.: *Molecules* **15**, 7313 (2010).
32. Hua Z., Yuesheng D., Ge X., Menglu L., Liya D., Li Jia A., Zhilong X.: *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **4**, 167 (2013).
33. Thao N. L. T., Thoa D. T. K., Thang L. P., Xi T. T. U., Mai D. S., Tram N. T. N.: *J. Food Nutr. Sci.* **3**, 45 (2015).
34. Michiels J. A., Kevers C., Pincemail J., Defraigne O., Dommes, J.: *Food Chem.* **130**, 986 (2012).
35. Jovančević M., Balijagić J., Menković N., Šavikin K., Zdunić G., Janković T., Dekić-Ivanković M.: *J. Med. Plants Res.* **5**, 910 (2011).
36. Diaconeasa Z., Leopold L., Rugină D., Ayvaz H., Socaciu C.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 2352 (2015).
37. Pereira S. R., Pereira R., Figueiredo I., Freitas V., Dinis T. C. P., Almeida L. M.: *PLoS One* **12**, e0174116 (2017).
38. Jakobek L., Seruga M., Medvidovic-Kosanovic M., Novak I.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **103**, 58 (2007).
39. Oszmiański J., Wojdylo A.: *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 809 (2005).
40. Hwang E. S., Thi N. D.: *Prev. Nutr. Food Sci.* **25**, 255 (2016).
41. Baum J. I., Howard L. R., Prior R. L., Lee S. O.: *J. Berry Res.* **6**, 203 (2016).
42. Brazdauskas T., Montero L., Venskutonis P. R., Ibañez E., Herrero M.: *J. Chromatogr. A* **1468**, 126 (2016).

43. Lukić I., Budić-Leto I., Bubol M., Damijanić K., Staver M.: Food Chem. 224, 251 (2017).
44. Kumšta M., Pavloušek P., Kárník P.: Food Technol. Biotechnol. 52, 383 (2014).
45. Khanal R. C., Howard L. R., Prior R. L.: Food Res. Int. 43, 1464 (2010).
46. Buckow R., Kastell A., Terefe N. S., Versteeg C.: J. Agric. Food Chem. 58, 10076 (2010).

O. Ragač^a, J. Poráčová^b, J. Vašková^c, M. Mydlárová Blaščáková^b, and V. de Feo^d (^a*AtB Pharma Ltd., Slovenská Lupča, Slovak Republic*, ^b*Department of Biology, Faculty of Humanities and Natural Sciences, University of Prešov, Prešov, Slovak Republic*, ^c*Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Košice, Slovak Republic*, ^d*Department of Pharmacy, University of Salerno, Fisciano Salerno, Italy*): **Analysis of Anthocyanin Content of *Vaccinium corymbosum*, *Vitis vinifera* and *Aronia melanocarpa* from East Slovakia**

Biologically active natural compounds (e.g., isoprenoids, flavonoids, anthocyanins, alkaloids, organic acids,

coumarins, etc.) have proven significant preventive and curative effects in various diseases. In the present study, we have provided a qualitative and quantitative monitoring of anthocyanins in a methanolic extract and a freeze-dried extract of three fruits rich in anthocyanin: blueberries of *Vaccinium corymbosum* “Berkeley”, grapes of *Vitis vinifera* “Lemberger” and chokeberries of *Aronia melanocarpa* “Nero”. The identification of anthocyanins was carried out by the reverse phase liquid chromatography and mass spectrometry. The results indicated that the average content of anthocyanins in the methanolic extract was lower than in the freeze-dried extract. The highest content of anthocyanins was obtained in chokeberry extracts. The process of freeze-drying, however, leads to changes that probably affect the biological activity via changes in the ratio of biologically active compounds.

Keywords: anthocyanins, blueberry, aronia, grape, MeOH extraction, lyophilisation

Acknowledgments

This study was supported by project KEGA 018PU-4/2018: Innovation of methods and forms of teaching the subject biochemistry.

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

DLOUHODOBÁ STABILITA
ALKALOIDŮ V PEVNÝCH LÉKOVÝCH
FORMÁCH

Článek je věnován 100. výročí založení Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

KAREL NESMĚRÁK^a, KAREL KUDLÁČEK^a,
PETR KOZLÍK^a, MARTIN ŠTÍCHA^b, PAVLA
VAŠÍČKOVÁ^a a JAN BABICA^c

^a Katedra analytické chemie, ^b Sekce chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^c České farmaceutické muzeum, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hospitál Kuks, 544 43 Kuks
nesmerak@natur.cuni.cz

Došlo 31.8.19, přijato 30.9.19.

Klíčová slova: HPLC-MS, dlouhodobá stabilita, degradace, doba použitelnosti

Úvod

Ačkoliv je stabilita účinných látek pro účely stanovení doby použitelnosti léčivých přípravků obvykle studována v rozsahu jednotek let, v poslední době se v literatuře diskutují otázky degradace účinných látek takových přípravků v řádu desítek let¹. To by v případě některých látek mohlo vyústit v podstatné prodloužení doby použitelnosti daného léčivého přípravku, což by mělo nezanedbatelné ekonomické i ekologické dopady². Možné prodloužení doby použitelnosti léčivého přípravku obecně závisí jak na chemické struktuře účinné látky, tak na použité lékové formě³. Léčivé látky mohou na základě své chemické struktury podléhat nejrozličnějším degradačním reakcím⁴. Nejčastěji se jedná o hydrolýzu, dehydrataci, isomerizaci a racemizaci, eliminaci, oxidaci, nebo o interakci s přítomnými pomocnými, nebo jinými účinnými látkami. Tyto reakce mohou být ovlivněny řadou faktorů, jako je světlo, teplota, vlhkost, přístup vzduchu (vzdušná oxidace), pH, nebo kontaminace mikroorganismy. Hlavní pozornost dosud publikovaných studií o dlouhodobé stabilitě účinných látek v řádu desítek let je věnována převážně injekčním formám léčivých přípravků, zřetelně méně často jsou studovány pevné lékové formy (tablety, dražé, čípky)¹. Zřejmou výhodou injekčních forem léčivých přípravků je jejich hermetické oddělení od okolí, které může přispět k větší stabilitě přípravku^{5–9}. Dosud nejstaršími pevnými formami léčivých přípravků, u nichž byla studována jejich

stabilita, nebo lépe řečeno složení po dlouhé době od jejich přípravy, byly tablety o stáří 40 let (cit.²).

V této práci jsme studovali stabilitu pevných forem léčivých přípravků s obsahem alkaloidů jako účinných látek, přičemž stáří přípravků bylo v rozmezí 23 až 73 let. Struktury účinných látek a obaly studovaných vzorků léčivých přípravků jsou uvedeny na obr. 1. K analýze byla použita metoda HPLC-MS, konkrétní podmínky byly modifikací v literatuře popsanych metod. Analýza vzorků proběhla v roce 2014, jeden přípravek byl analyzován v roce 2016.

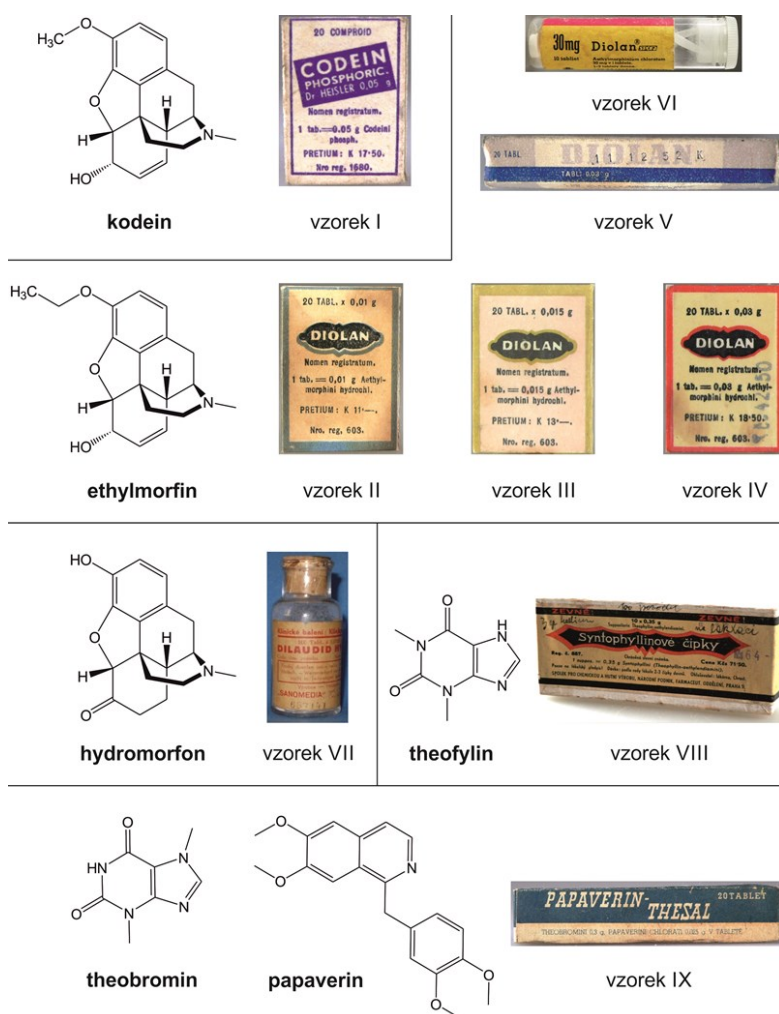
Experimentální část

Analyzované vzorky

Studované vzorky léčivých přípravků (obrázky 1) pocházely z Českého farmaceutického muzea v Kuksu, nebo sbírek Katedry analytické chemie PŘF UK. Podmínky skladování vzorků nejsou známy, předpokládá se jejich uložení v temnu při laboratorní, resp. pokojové, teplotě. Datace vzorků byla provedena buď na základě vytištěné šarže, nebo v některých případech jen přibližně podle informací na obalu (podle názvu firmy a udané ceny).

Vzorek I byly perorální tablety „Codein phosphoric. Dr. Heisler 0,05 g“, vyrobené firmou Dr. Robert Heisler v Chrastí u Chrudimi v rozmezí let 1944–1945 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří okolo 70 let), s deklarovaným obsahem fosforečnanu kodeinu 0,05 g v jedné tabletě. Tablety byly volně uloženy v originálním papírovém obalu.

Vzorkem II–VI byly tablety s hydrochloridem ethylmorfinu jako účinnou látkou, které byly k dispozici v několika šaržích. První tři šarže představovaly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Spolek pro chemickou a hutní výrobu v rozmezí let 1944–1945 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří okolo 70 let), deklarovaný obsah byl 0,01 g (vzorek II), 0,015 g (vzorek III) nebo 0,03 g (vzorek IV) hydrochloridu ethylmorfinu v jedné tabletě. Tablety byly volně uloženy v originálních papírových obalech. Čtvrtou šarží (vzorek V) byly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Slovafarma Hlohovec v roce 1952 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří 62 let), deklarovaný obsah hydrochloridu ethylmorfinu byl 0,03 g v jedné tabletě. Tablety byly uloženy v originálním skleněném obalu opatřeném plastovou zátkou. Pátou šarží (vzorek VI) byly perorální tablety „Diolan“ vyrobené firmou Spofa v roce 1991 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří 23 let), deklarovaný obsah hydrochloridu ethylmorfinu byl 30 mg v jedné tabletě. Tablety byly uloženy v originálním skleněném obalu opatřeném plastovou zátkou.



Obr. 1. Struktury účinných látek a obaly studovaných vzorků léčivých přípravků

Vzorek VII byly perorální tablety „Dilaudid hydr.“ vyrobené jako klinický vzorek firmou Sanomedia (Praha) v roce 1941 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří 73 let), deklarovaný obsah hydrochloridu hydromorfonu byl 0,0025 g v jedné tabletě. Tablety byly uloženy v originálním skleněném obalu opatřeném korkovou zátkou.

Vzorek VIII byly čípky „Syntophyllin“ vyrobené firmou Spolek pro chemickou a hutní výrobu v roce 1948 (v době analýzy v roce 2016 tedy ve stáří 68 let), deklarovaný obsah aminofylinu dihydrátu 0,35 g v jednom čípku. Čípky byly jednotlivě obaleny originálním obalem z hliníkové fólie.

Vzorek IX byly perorální tablety „Papaverin-Thesal“ vyrobené firmou Spofa v roce 1954 (v době analýzy v roce 2014 tedy ve stáří 60 let), deklarovaný obsah účinných látek byl 0,3 g theobrominu a 0,025 g hydrochloridu papaverinu v jedné tabletě. Tablety byly uloženy v originálním skleněném obalu opatřeném plastovou zátkou.

Chemikálie

Ke kvantifikaci účinných látek v analyzovaných vzorcích byly použity standardy: hemihydrát fosforečnanu kodeinu Ph. Eur. 2012 97 % (Zentiva), ethylmorfin > 99 % (Sigma-Aldrich), theofylin > 99 % (Sigma-Aldrich), theobromin ≥ 99 % (Sigma-Aldrich) a papaverin hydrochlorid ≥ 98 % (Sigma-Aldrich).

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Lach-Ner), amoniak 25% vodný roztok (Lach-Ner), mravenčan amonný (Sigma-Aldrich), mravenčí kyselina 86% (Lachema), octan amonný (Lach-Ner) a octová kyselina 80% (Lach-Ner).

Příprava vzorků k analýze

V případě analýzy vzorků ve formě tablet byly odváženy dvě tablety analyzovaného přípravku, následně homogenizovány v třecí misce a odvážen podíl, který byl rozpuštěn v odměrné baňce v příslušné mobilní fázi. Roztok byl přefiltrován pomocí stříkačkového filmu pórovitosti 0,2 μm (Whatmann). V případě vzorku VIII byl odvážený čípek rozpuštěn v 250 ml mobilní fáze v odměrné baňce v ultrazvukové lázni a následně přefiltrován skleněnou fritou S3. Získaný filtrát byl dále naředěn mobilní fází v poměru 1:25.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí probíhala na přístroji UHPLC Nexera XR (Shimadzu) ve spojení s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies). Hmotnostní detekce probíhala za použití elektrosprejové ionizace v pozitivním módu (ESI+). Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (380 kPa). Jako sušící plyn byl použit dusík o průtoku 11 $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$, teplotě 350 $^{\circ}\text{C}$ a napětí na kapiláře 4 kV. Rozsah měření byl 50–700 m/z . Ke kvantifikaci byla použita metoda kalibračních závislostí. Statistické vyhodnocení bylo provedeno z trojnásobné analýzy vzorku.

Výsledky a diskuse

Bylo studováno devět vzorků pevných forem historických léčivých přípravků s obsahem benzoisochinolinových, xantinových a isochinolinových alkaloidů. Přehled dosažených výsledků podává souhrnně tab. I.

Vzorek I

Vzorek I obsahoval jako účinnou látku kodein, benzoisochinolinový alkaloid využívaný pro antitusivní vlastnosti, méně pro účinky analgetické. K analýze vzorku I byla modifikována metoda z literatury^{10,11}. Separace vzorku I rozpuštěného v acetonitrilu probíhala na koloně Pronosil C18 (200 $\times$ 2,0 mm, 3,0 μm ; Bischoff Chromatography) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,01 mol dm^{-3} vodný mravenčanový tlumivý roztok (HCOOH/HCOONH_4) o pH 3,00 v poměru 50:50 (v/v) při průtoku 0,20 ml min^{-1} . Retenční čas kodeinu byl 2,6 min, jeho identita byla potvrzena změřením ESI+ hmotnostních spekter a jejich porovnáním s literaturou^{10,12} a spektrem získaným změřením standardu. V analyzovaném vzorku I nebyly nalezeny žádné degradační produkty, čemuž odpovídá i nalezený obsah kodeinu $98,0 \pm 0,7\%$ deklarovaného obsahu. Z hlediska stability byla v literatuře popsána dlouhodobá stabilita kodeinu ve 20–40 let starých tabletách, v nichž bylo nalezeno > 95 % deklarovaného obsahu látky^{2,3}. Podle stabilitních studií přispívají

Tabulka I

Výsledky identifikace a stanovení účinných látek v analyzovaných vzorcích pevných forem léčivých přípravků

Vzorek	Stáří / let	Účinná látka, CASRN	m/z		Nalezeno ^a / %
			$[\text{M}+\text{H}]^+$	dceřiné ionty	
I	70	kodein, 76-57-3	300,3	282,3; 243,1; 225,1; 215,1; 199,1; 183,1	$98,0 \pm 0,7$
II	70	ethylmorfin, 76-58-4	314,3	296,2; 257,1; 239,1; 229,1; 213,1; 201,1; 183,2	$98,4 \pm 0,2$
III	70	ethylmorfin, 76-58-4	314,3	296,2; 257,1; 239,1; 229,1; 213,1; 201,1; 183,2	$114,6 \pm 0,7$
IV	70	ethylmorfin, 76-58-4	314,3	296,2; 257,1; 239,1; 229,1; 213,1; 201,1; 183,2	$100,0 \pm 0,9$
V	62	ethylmorfin, 76-58-4	314,3	296,2; 257,1; 239,1; 229,1; 213,1; 201,1; 183,2	$117,9 \pm 0,4$
VI	23	ethylmorfin, 76-58-4	314,3	296,2; 257,1; 239,1; 229,1; 213,1; 201,1; 183,2	$109,3 \pm 0,3$
VII	73	hydromorfon, 466-99-9	286,2	268,1; 255,1; 243,0; 229,0; 211,0; 199,0; 185,0; 157,0	— ^b
VIII	68	theofylin, 58-55-9	181,1	124,0	$104,9 \pm 0,3^c$
IX	60	theobromin, 83-67-0	181,3	163,0; 138,0; 110,0	$93,1 \pm 0,4$
		papaverin, 58-74-2	340,6	324,2; 296,1; 250,1 202,0; 171,0	$53,7 \pm 0,8$

^a Vztaženo k deklarovanému obsahu. ^b Nestanovení pro nedostupnost standardu. ^c Přepočítáno na čistý theofylin.

k degradaci kodeinu zejména neutrální a alkalické pH a vyšší teplota, degradačními reakcemi jsou především oxidace a isomerizace^{13,14}.

Vzorky II–VI

Účinnou látkou ve vzorcích II–VI byl ethylmorfin, syntetický derivát morfinu produkovaný alkylací morfinu, čímž se dosáhne snížení analgetického a zvýšení antitusického účinku. K analýze vzorků II–VI byla použita modifikace v literatuře popsané metody^{11,15}. Separace vzorku rozpuštěného v acetonitrilu probíhala na koloně Watrex RP C18 (250 × 4,0 mm, 5 μm) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ vodný mravenčanový tlumivý roztok (HCOOH/HCOONH₄) o pH 3,00 v poměru 40:60 (v/v) při průtoku 0,65 ml min⁻¹. Retenční čas ethylmorfinu byl 6,3 min, jeho identita byla potvrzena změřením ESI+ hmotnostních spekter a jejich porovnáním s literaturou^{16,17} a spektrem získaným změřením standardu. V analyzovaných vzorcích II–VI nebyly nalezeny žádné degradační produkty, nalezený obsah ethylmorfinu odpovídal obsahu deklarovanému. U vzorků III, V a VI byly nalezeny vyšší obsahy ethylmorfinu, což lze vysvětlit chybou při výrobě, resp. nedokonalostí kontrolních metod v době výroby daných léčivých přípravků. Z hlediska stability byla v literatuře popsána pouze stabilita ethylmorfinu v roztocích, kde k degradaci přispívá neutrální pH a přítomnost kyslíku¹⁸, hlavní degradační reakcí je hydrolyza.

Vzorek VII

Vzorek VII obsahoval jako účinnou látku hydromorfon, hydrogenovaný keton morfinu s asi pětkrát vyšším analgetickým účinkem než má samotný morfin. Vzhledem ke strukturální podobnosti hydromorfonu s ethylmorfinem byla pro analýzu vzorku VII použita metoda popsaná výše u analýzy vzorků II–VI. Retenční čas hydromorfonu byl 5,8 min, jeho identita byla potvrzena změřením ESI+ hmotnostních spekter a jejich porovnáním s literaturou^{19,20}. Protože nebyl k dispozici standard hydromorfonu, nebylo možné kvantifikovat jeho obsah ve vzorku. Vzhledem k tomu, že ve vzorku nebyly detegovány žádné degradační produkty hydromorfonu, lze usuzovat na jeho dlouhodobou stabilitu v tomto léčivém přípravku. Tento závěr lze podpořit výsledky rozsáhlých studií o stabilitě strukturálně příbuzného morfinu v léčivých přípravcích, které ukazují, že degradace morfinu je urychlována přítomností kyslíku a při vyšším pH roztoku, zatímco teplota a světlo mají na degradaci jen malý vliv²¹.

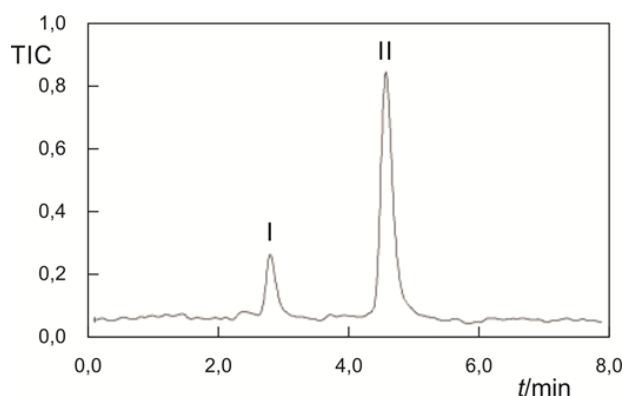
Vzorek VIII

Účinnou látkou vzorku VIII byl aminofylin, směs xantinového alkaloidu theofylinu (užíván pro bronchodilatační účinky při léčbě respiračních onemocnění) a ethylen-diaminu v poměru 2:1. Účelem ethylen-diaminu je zvyšovat rozpustnost theofylinu. K analýze vzorku VIII byla modifikována metoda z literatury²², separace vzorku roz-

puštěného v mobilní fázi probíhala na koloně Zorbax Eclipse C18 (150 × 4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,02 mol dm⁻³ vodný acetátový tlumivý roztok (CH₃COOH/CH₃COONH₄) o pH 4,00 v poměru 20:80 (v/v) při průtoku 0,50 ml min⁻¹. Retenční čas theofylinu byl 3,9 min. Identita theofylinu byla potvrzena změřením ESI+ hmotnostních spekter a porovnáním s literaturou^{23,24} a spektrem získaným změřením standardu. Analýzou vzorku VIII nebyly nalezeny žádné degradační produkty, čemuž odpovídá i nalezený obsah theofylinu 104,9 ± 0,3 % deklarovaného obsahu (po přepočítání na čistý theofylin). Z hlediska stability byla v literatuře popsána dlouhodobá stabilita a účinnost theofylinu ve 35 let starých tabletách, ve kterých bylo nalezeno 90 % deklarovaného obsahu látky²⁵. Za stresové faktory zvyšující degradaci theofylinu byly určeny zejména kyselé pH a vyšší teplota^{22,26}.

Vzorek IX

Vzorek IX obsahoval jako účinné látky dva alkaloidy. Prvním byl xantinový alkaloid theobromin, pocházející ze semen kakaovníku pravého, dříve užívaný pro vasodilatační a diuretické účinky. Druhým pak isochinolinový alkaloid papaverin, získávaný z opia, s účinky spasmolytickými a vasodilatačními. K analýze vzorku IX byla použita metoda navržená na základě literatury^{10,27–29}, separace vzorku rozpuštěného ve směsi acetonitril–voda v poměru 50:50 (v/v) probíhala na koloně Watrex RP C18 (250 × 4,0 mm, 5 μm) izokratickou elucí s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ vodný mravenčanový tlumivý roztok (HCOOH/HCOONH₄) o pH 3,00 v poměru 50:50 (v/v) při průtoku 0,65 ml min⁻¹. Retenční čas theobrominu byl 2,9 min, papaverinu 4,7 min (obr. 2). Identita obou alkaloidů byla potvrzena změřením ESI+ hmotnostních spekter a jejich porovnáním s literaturou



Obr. 2. HPLC/MS chromatogram analyzovaného vzorku IX (perorální tablety „Papaverin-Thesal“) v ESI+ módu. Píky (I) theobromin, (II) papaverin. Měřeno na koloně Watrex RP C18 (250 × 4 mm, 5 μm) s mobilní fází obsahující acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ vodný mravenčanový tlumivý roztok (HCOOH/HCOONH₄) o pH 3,00 v poměru 50:50 (v/v) při průtoku 0,65 ml min⁻¹.

(pro theobromin^{23,24,30}, pro papaverin^{10,29,31}) a spektrem získaným změřením standardu. Analýzou vzorku IX nebyly nalezeny žádné degradační produkty, stanovený obsah theobrominu odpovídá $93,1 \pm 0,4$ % deklarovaného obsahu. V případě papaverinu bylo ale ve vzorku IX stanoveno pouze $53,7 \pm 0,8$ % deklarované hodnoty, což vzhledem k neprokázané degradaci látky (nepřítomnosti možných degradačních produktů papaverinaldinu ani papaverinolu³²), lze pravděpodobně vysvětlit jako chybu při výrobě. Pro stabilitu theobrominu neposkytuje literatura podstatné údaje, je nicméně známo, že jeho roztoky se rozkládají za varu³³, případně v alkalickém pH (cit.³⁴). U papaverinu je z hlediska dlouhodobé stability popsána jeho oxidace na papaverinaldin a papaverinol, která probíhá pouze v roztocích³².

Závěr

Analýzou devíti historických vzorků pevných léčivých forem (tablety a čípky) byla zjištěna dlouhodobá stabilita účinných látek ze skupiny alkaloidů. Z pohledu účinné látky by tedy studované přípravky vyhověly ustanovením lékopisů, které požadují obsah v rozmezí 95–105 % deklarovaného obsahu. Na druhou stranu je třeba upozornit, že k použitelnosti konkrétního přípravku patří i mnohé další parametry. Jedná se o první studii stability pro pevné léčivé formy ve stáří okolo 70 let. Zjištěná stabilita účinných látek koresponduje s dlouhodobou stabilitou jiných molekul se skupiny alkaloidů (alkaloidy ipecacuanhy) ve farmaceutických vzorcích z 18. století³⁵.

LITERATURA

1. Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: J. Pharm. Biomed. Anal. 166, 222 (2019).
2. Cantrell L., Suchard J. R., Wu A., Gerona R. R.: Arch. Intern. Med. 172, 1685 (2012).
3. Lyon R. C., Taylor J. S., Porter D. A., Prasanna H. R., Hussain A. S.: J. Pharm. Sci. 95, 1549 (2006).
4. Yoshioka S., Stella V. J.: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer, New York 2002.
5. Nesměrák K., Štícha M., Čvančarová M.: Anal. Lett. 43, 2572 (2010).
6. Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Monatsh. Chem. 148, 1613 (2017).
7. Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Monatsh. Chem. 149, 1555 (2018).
8. Zilker M., Sörgel F., Holzgrabe U.: J. Pharm. Biomed. Anal. 150, 318 (2018).
9. Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Kozlík P., Babica J.: Monatsh. Chem. 150, 1611 (2019).
10. Zhang Z., Yan B., Liu K., Bo T., Liao Y., Liu H.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 2851 (2008).
11. Berg T., Lundanes E., Christophersen A. S., Strand D. H.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 877, 421 (2009).
12. Zayed M. A., Hawash M. F., Fahmey M. A.: Spectrochim. Acta, Part A 64, 363 (2006).
13. Gundermann P., Pohloudek-Fabini R.: Pharmazie 35, 296 (1980).
14. Powell M. F.: J. Pharm. Sci. 75, 901 (1986).
15. Concheiro M., de Castro A., Quintela Ó., Cruz A., López-Rivadulla M.: Anal. Bioanal. Chem. 391, 2329 (2008).
16. Thörngren J. O., Östervall F., Garle M.: J. Mass Spectrom. 43, 980 (2008).
17. Bijlsma L., Sancho J. V., Hernández F., Niessen W. M. A.: J. Mass Spectrom. 46, 865 (2011).
18. Kulesh K. F., Bugrim N. A.: Farmatsiya (Moscow, Russ. Fed.) 17, 27 (1968). Chem. Abstr. 69:30100.
19. Jeong E. S., Kim S. H., Cha E. J., Lee K. M., Kim H. J., Lee S. W., Kwon O. S., Lee J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 29, 367 (2015).
20. Liu H. C., Liu R. H., Ho H. O., Lin D. L.: Anal. Chem. 81, 9002 (2009).
21. Vermeire A., Remon J. P.: Int. J. Pharm. 187, 17 (1999).
22. Maithani M., Singh R.: J. Anal. Bioanal. Tech. 2, 1000116 (2011).
23. Bartella L., Di Donna L., Napoli A., Siciliano C., Sindona G., Mazzotti F.: Food Chem. 278, 261 (2018).
24. Porcelli B., Marinello E., Pagani R., Curcuruto O., Fontana S., Traldi P.: Org. Mass Spectrom. 27, 1225 (1992).
25. Regenthal R., Stefanovic D., Albert T., Trauer H., Wolf T.: Hum. Exp. Toxicol. 21, 343 (2002).
26. Brower J. F., Juenge E. C., Page D. P., Dow M. L.: J. Pharm. Sci. 69, 942 (1980).
27. Ptolemy A. S., Tzioumis E., Thomke A., Rifai S., Kellogg M.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878, 409 (2010).
28. Song M., Wang T., Li Q., Zhao L., Fang H., Li D., Bi K.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 903, 23 (2012).
29. Peng Z., Song W., Han F., Chen H., Zhu M., Chen Y.: Int. J. Mass Spectrom. 266, 114 (2007).
30. Liguori A., Mascaro P., Porcelli B., Sindona G., Uccella N.: Org. Mass Spectrom. 26, 608 (1991).
31. Wood G. W., Mak N., Hogg A. M.: Anal. Chem. 48, 981 (1976).
32. Hermann T. W., Girreser U., Michalski P., Piotrowska K.: Arch. Pharm. (Weinheim Ger.) 335, 167 (2002).
33. Lorant B.: Nahrung 12, 351 (1968).
34. Jang J. H., Park Y. D., Ahn H. K., Kim S. J., Lee J. Y., Kim E. C., Chang Y. S., Song Y. J., Kwon H. J.: Chem. Pharm. Bull. 62, 328 (2014).
35. Nesměrák K., Kudláček K., Štícha M., Červený V., Kunešová J., Yildiz I.: Monatsh. Chem. 149, 1535 (2018).

K. Nesměrák^a, K. Kudláček^a, P. Kozlík^a, M. Štícha^b, P. Vašíčková^a, and J. Babica^c (^a*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague;* ^b*Section of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague;* ^c*Czech Pharmaceutical Museum, Faculty of Pharmacy, Charles University, Kuks*): **Long-Term Stability of Alkaloids in Solid Dosage Forms**

There are only few studies showing that shelf-lives of pharmaceutical preparations are often longer than expiration dates (which usually range from 3 to 5 years). The objective of the study was to determine the content of nine solid dosage forms of pharmaceutical preparations with the alkaloid content ranging in age from 23 to 73 years by means of HPLC-MS/MS. Codeine, ethylmorphine, hydro-

morphone, aminophylline, theobromine, and papaverine were the active pharmaceutical ingredients of the analyzed preparations. The conditions for analysis on the reverse phase C18 of the preparations under study were modified according to literature and optimized. The compounds were identified by ESI+ tandem mass spectrometry. The quantification of the active pharmaceutical ingredient in a particular preparation was based on calibration dependence. There was no evidence of any alkaloid degradation in the pharmaceutical preparations analyzed, and the found content ranged from 93 to 113 % of that declared (with the exception of the papaverine preparation, where the found content of 53.8 % is interpretable by a manufacturing error).

Keywords: HPLC-MS, long-term stability, degradation, shelf-life, alkaloid

ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – POLYFENOLY, AKO POTENCIÁLNE INHIBÍTORY LIPOXYGENÁZ

LÝDIA BEZÁKOVÁ^a, ANDREA BALAZOVÁ^a,
IVANA HOLKOVÁ^a, MAREK OBLOŽINSKÝ^a,
KATARÍNA BAUEROVÁ^c a PETER MIKUŠ^b

^a Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, ^b Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, ^c Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava bezakova@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.7.19, prijaté 23.3.20.

Kľúčové slová: živočíšne lipoxygenázy, polynenasýtené mastné kyseliny, inhibitory lipoxygenáz, rastlinné sekundárne metabolity, polyfenoly, biologická aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Význam izoenzýmov lipoxygenáz pri vyhľadávaní potenciálnych inhibítorov
3. Polyfenoly – východisko pre výber molekúl s protizápalovým účinkom
 - 3.1. Klasifikácia a biologická aktivita
 - 3.2. Štruktúrne črty polyfenolov vo vzťahu k protizápalovej aktivite
4. Inhibícia lipoxygenáz polyfenolmi – vzťah štruktúry a účinku
 - 4.1. Mechanizmy inhibície
 - 4.2. Redoxné inhibitory
 - 4.3. Inhibitory viažuce Fe
 - 4.4. Analógy substrátov/produktov
 - 4.5. Alosterické inhibitory
 - 4.6. FLAP (aktivátor 5-lipoxygenázy) a jeho inhibitory
 - 4.7. Duálne inhibitory
 - 4.8. Inhibitory cysteinylových receptorov
5. Záver

1. Úvod

Lipoxygenázy (LOX, EC 1.13.11.x) patria do rodiny enzýmov peroxidujúcich lipidy, ktoré katalyzujú dioxygenáciu polynenasýtených mastných kyselín (PNMK) s obsahom *cis,cis*-1,4-pentadiénového systému. Aktívne

miesto v katalytickej doméne obsahuje nehémovo viazaný ión železa. LOX reakcie môžu iniciovať syntézu signálnych molekúl a štrukturálne a metabolické zmeny v bunke za rôznych patofyziologických podmienok. V cicavčích bunkách kyselina arachidónová (AA) (C20:Δ4, ω-6) a kyselina linolová (LA) (C18:Δ2, ω-6) (cit.¹) sú najčastejšie PNMK, ktoré slúžia ako substrát pre rôzne izoenzýmy živočíšnych LOX. Vo všeobecnosti cicavčie LOX preferujú voľné mastné kyseliny (MK) ako substrát, ale sú schopné pôsobiť aj počas ich väzby v štruktúrach fosfolipidov, esterov cholesterolu a lipoproteínov². Oxygenácia PNMK účinkom LOX je zdrojom vysoko aktívnych bioregulatorov a lipidových mediátorov, ktoré majú kľúčovú úlohu v patogenéze zápalových, nádorových, kardiovaskulárnych, neurodegeneratívnych a iných ochorení. Z primárnych metabolitov LOX cesty (hydroperoxy-eikosatetraénové kyseliny (HPETE) a hydroxyeikosatetraénové kyseliny (HETE)) sa tvoria bioaktívne lipidové mediátory – leukotriény, lipoxíny, hepoxilíny, eoxíny, resolvíny a protektíny^{3,4}.

Miesto dioxygenácie dvojitej väzby v štruktúre PNMK určuje nomenklatúru cicavčích lipoxygenáz. Na základe polohovej špecifity sú lipoxygenázy kategorizované ako 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX a 15-LOX. Tieto izoenzýmy LOX sú polohovo a priestorovo špecifické, a tak sa výsledné eikosanoidy líšia nielen v polohe oxidácie, ale aj chiralitou, ktorá je kľúčovým faktorom ich biologickej aktivity⁵. U človeka sa nachádza šesť rôznych génov kódujúcich rôzne izoenzýmy LOX, a to *ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15*, *ALOX15B* a *ALOXE3*. Jednotlivé izoenzýmy LOX sa od seba odlišujú svojou funkciou a bunkovou a tkanivovou distribúciou^{6,7}.

V súčasnosti sa výskum zameriava na vyhľadávanie terapeuticky účinných inhibítorov LOX s rôznym mechanizmom inhibičného účinku. V snahe nájsť selektívne a účinné LOX inhibitory sa testujú tak novo syntetizované zlúčeniny, ako aj sekundárne metabolity rastlín. Aktuálne sa pozornosť venuje rastlinným metabolitom zo skupiny fenolických látok (polyfenoly), ktoré preukazujú oxidoredukčné aktivity, ale môžu byť zapojené aj do štrukturálnych a metabolických zmien v bunke v prípade rôznych ochorení.

Cieľom predloženej práce je hodnotenie významu biologickej úlohy polohovo a priestorovo špecifických izoenzýmov LOX, ich štruktúry, regulácie aktivity a génovej expresie pri vyhľadávaní účinných inhibítorov zo skupiny polyfenolov. Z hľadiska perspektívneho využitia prezentovaných LOX inhibítorov, ako potenciálnych terapeuticky účinných látok, je potrebné poznanie mechanizmu ich účinku, ktorý je diskutovaný ako integrálna súčasť tejto práce.

2. Význam izoenzýmov lipoxygenáz pri vyhl'adávaní potenciálnych inhibítorov

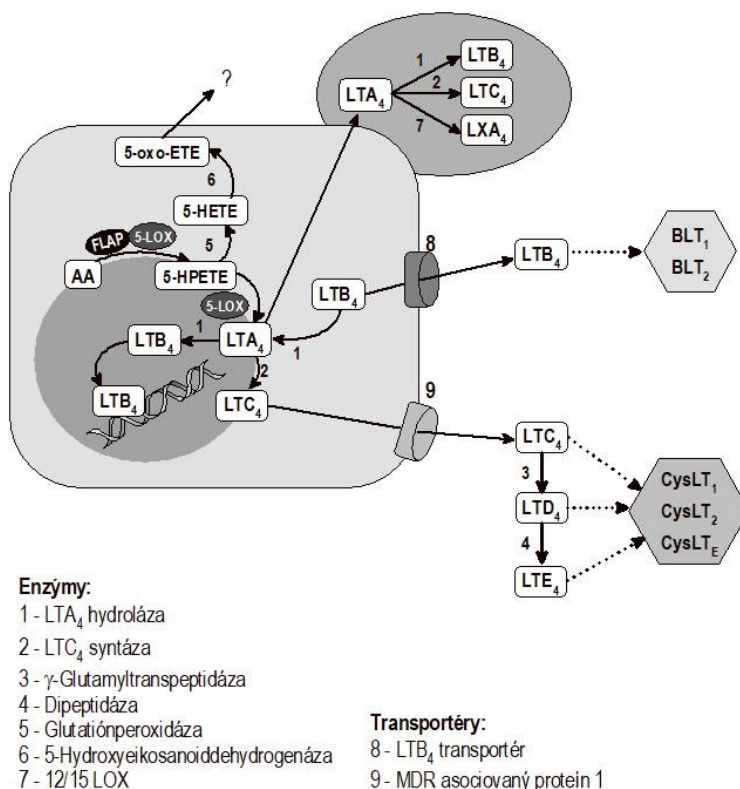
Pri štúdiu LOX je esenciálne objasnenie úloh ich metabolitov za fyziologických a patologických stavov. Dôležitý je vzťah medzi izoenzýmami LOX a ochoreniami, ako sú zápalové a nádorové procesy, ateroskleróza ale aj diabetes mellitus. K dispozícii je však málo informácií o vzťahoch medzi LOX metabolitmi a signálnymi molekulami, akým je napríklad nukleárny faktor kappa B (NF- κ B) patriaci medzi indukovateľné transkripčné faktory, ktoré regulujú imunitné a zápalové odpovede⁸. Kľúčová regulačná úloha LOX v spojení so signálnymi kaskádami ukazuje, že prostredníctvom molekúl inhibujúcich LOX možno prispieť k objasneniu rôznych patologických stavov⁸. Lipoxygenázy sa podieľajú na regulácii zápalových reakcií tvorbou prozápalových mediátorov, známych ako leukotriény a protizápalových mediátorov, označených ako lipoxíny⁹.

Z pohľadu štúdia biologickej aktivity lipoxygenáz a ich účasti na patologických procesoch sú významné ich polohovo a priestorovo špecifické formy, ktoré sú klasifikované ako 5-LOX (EC 1.13.11.34), 8-LOX (EC 1.13.11.40), 12-LOX (EC 1.13.11.31) a 15-LOX (EC 1.13.11.33) v závislosti na selektivitě ich oxygenácie MK (cit.¹⁰).

5-LOX vyžaduje k aktivácii malý membránový proteín FLAP (5-LOX aktivujúci proteín), s ktorým vytvára komplex. Enzým viazaný v tomto komplexe premieňa AA cez 5-HPETE a 5-HETE, na leukotrién A₄ (LTA₄) – epoxid s konjugovaným triénovým systémom. LTA₄ môže byť metabolizovaný na leukotrién LTB₄ alebo cysteinylleukotriény LTC₄, LTD₄ a LTE₄ po konjugácii s glutatiónom. FLAP pôsobí na 5-LOX aktivitu alosterickým mechanizmom^{9,11} (obr. 1). Ca²⁺ ióny a adenozíntrifosfát (ATP) sú tiež aktivátormi 5-LOX (cit.¹²).

Enzým 8-LOX oxiduje AA za tvorby 8-HPETE. Ten sa následne redukuje na 8-HETE, ktorá je agonistom PPAR α receptorov (receptory aktivované proliferátormi peroxizomov)¹³. 8-LOX, prvotne objavená v epiderme myši, sa považuje za ortológ ľudskej 15-LOX2 na základe 78% sekvenčnej identity aminokyselín. 8-LOX a 15-LOX-2 sa nachádzajú v kožnom epiteli u ľudí aj u myši a sú tkanivovo a polohovo špecifické¹³.

12-LOX vytvára ako primárny produkt 12-HPETE, z neho sa tvorí 12-HETE a môžu vznikať aj epoxy-MK (hepoxilíny)¹⁴. Sú známe 3 izoenzýmy, a to 12-LOX – leukocytový, trombocytový a epidermálny typ. Leukocytové a trombocytové typy 12-LOX sa líšia primárnou štruktúrou a tkanivovou špecifitou. Sú zapojené do zápalového procesu, hypertenzie a diabetes mellitus¹⁵. Aj ľudské bun-



Obr. 1. Metabolická dráha kyseliny arachidónovej katalyzovaná 5-LOX; V zápalovej bunke sa syntetizujú leukotriény, ktoré opúšťajú bunku prostredníctvom špecifických transportérov a aktivujú špecifické receptory¹¹. AA – kyselina arachidónová; BLT_{1,2} – receptory leukotriénu B₄; CysLT_{1,2,E} – cysteinylleukotriénové receptory; FLAP – proteín aktivujúci 5-LOX; HETE – kyselina hydroxyeikosatetraéno-vá; HPETE – kyselina hydroperoxyeikosatetraéno-vá; LOX – lipoxygenáza; LT – leukotrién; LX – lipoxín; MDR – viacnásobná lieková rezistencia; 5-oxo-EETE – kyselina 5-oxoeikosatetraéno-vá

kové línie nádorov prostaty zvyšujú tvorbu 12-LOX, ktorá tak prispieva k rozvoju karcinómu prostaty u ľudí¹⁴.

Skupinu enzýmov 15-LOX je možné rozdeliť na dva typy: 15-LOX-1 a 15-LOX-2. Typ 15-LOX-1 sa pozoruje v leukocytoch a endotelových bunkách dýchacích ciest, zatiaľ čo 15-LOX-2 je prítomná v prostate, pľúcach, pečeni, obličkách a mozgu. Bunky indukované interleukínmi IL-4 a IL-13 vykazujú selektívne zvýšenie aktivity 15-LOX-1. Aktivita ľudskej epitelovej 15-LOX-2 je stimulovaná pri nádoroch epitelového tkaniva¹⁶. Pozornosť sa upriamuje na inhibitory 15-LOX ako potenciálne liečivá pre liečbu zápalových, alergických, kardiovaskulárnych a nádorových ochorení^{17,18}. Vzhľadom k tomu, že retikulytový typ 15-LOX je veľmi podobný 12-LOX typu leukocytov, označujú sa tieto enzýmy ako 12/15-LOX (cit.⁴).

12/15-LOX katalyzujú tvorbu aktívnych lipidových metabolitov, ktoré sa podieľajú na rozvoji diabetes mellitus typu 1 a typu 2, kardiovaskulárnych ochorení, ochorení obličiek a Alzheimerovej a Parkinsonovej choroby. Stimulácia 12/15-LOX bola popísaná v bazálnych gangliách centrálného nervového systému a jej metabolity 12-HETE a 15-HETE predstavujú druhých poslov v synaptickom prenosu^{19,20}.

Ľudský genóm obsahuje šesť funkčných génov pre LOX (*ALOX5*, *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*), ktoré kódujú šesť rôznych LOX-izoenzýmov. Zatiaľ čo *ALOX5* gén je situovaný na chromozóme 10, všetky ostatné gény sú lokalizované na chromozóme 17. V genóme myši je sedem funkčných LOX génov^{20,21}. Hoci LOX isoenzýmy katalyzujú rovnaký typ reakcie, inhibitory môžu rôznou mierou ovplyvňovať ich aktivitu. Napríklad inhibitor 5-LOX, ktorého cieľom je zabezpečiť antiastmatický účinok, nemá vplyv na aktivitu 12-LOX2. Táto funkčná multiplicita LOX vyžaduje vývoj inhibitorov špecifických voči danému isoenzýmu. Preto sa výskum orientuje na sledovanie izomorfných špecifít rôznych inhibitorov. Významná je aj príprava a používanie rekombinantných LOX (cit.³).

Mutagenetickými štúdiami, pri ktorých dochádza k zámene jednej alebo dvoch aminokyselín vo väzobných pozíciách aktívneho miesta LOX, sa potvrdil koncept triád s osobitným významom Leu353 a Ile593 ako kľúčových determinantov špecifity a bola dosiahnutá ako zmena aktivity, tak aj polohovej špecifity a preferencie substrátu (AA)⁴.

3. Polyfenoly – východisko pre výber molekúl s protizápalovým účinkom

Rastúci záujem o výskum polyfenolov z rastlinných zdrojov vychádza z ich pozitívnych účinkov na ľudský organizmus. Za fyziologických podmienok polyfenoly pôsobia prostredníctvom receptorov a bunkových signálnych kaskád.

Polyfenoly sú heterogénna skupina fenolických zlúčenín, výhradne rastlinného charakteru. V štruktúre ich molekuly je prítomný aspoň jeden aromatický kruh, na kto-

rom je jedna alebo viac hydroxylových skupín viazaných na alifatické alebo aromatické štruktúry.

3.1. Klasifikácia a biologická aktivita

Fenolické zlúčeniny môžu byť rozdelené na flavonoidné a neflavonoidné²².

Flavonoidy sú široko distribuované, nízkomolekulové sekundárne metabolity rastlín. Tvoria veľkú skupinu polyfenolových zlúčenín s benzo- γ -pyránovou štruktúrou. Sú zložené z dvoch aromatických kruhov spojených prostredníctvom kyslíkového heterocyklu. Biologická aktivita flavonoidov závisí od charakteru a polohy substituentov²². V závislosti od stupňa hydrogenácie a nahradenia heterocyklu sú ďalej rozdelené na flavanoly, flavóny, izoflavóny, antokyány, flavanoly a flavanóny²³. Flavonoidy sa zvyčajne v prírode vyskytujú ako glykozidy. Kompetentný sacharid sa naviaže na uhlík C3, C5 alebo C7. Najčastejším monosacharidom, ktorý sa pripája, je glukóza, ale tiež je to aj galaktóza, xylóza, arabinóza a ramnóza²³. Flavonoidy normalizujú priechodnosť ciev a kapilár, zlepšujú prietok krvi, znižujú koncentráciu cholesterolu v krvi, znižujú lámavosť ciev, majú hepatoprotektívny, vazodilatačný, antitrombotický, protinádorový, antiflogistický a imunomodulačný účinok. Patria medzi významné antioxidanty a vďaka týmto vlastnostiam môžu predchádzať vzniku zápalových, kardiovaskulárnych, nádorových a iných ochorení^{24,25}. Flavonoidy sú využívané v tradičnom i modernom lekárstve. Cenným zdrojom takýchto biologicky účinných látok sú liečivé rastliny²⁴.

Do skupiny neflavonoidov patria fenolické kyseliny, napr. hydroxylované deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej. Medzi najvýznamnejšie deriváty kyseliny hydroxyškoricovej patrí kyselina *p*-kumarová, kávová a ferulová, ktoré sa vyskytujú glykozylované alebo vo forme jednoduchých esterov. Vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou súvisia s typom a počtom funkčných skupín na aromatickom jadre ($-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$)²⁶. Derivátmi fenolických kyselín sú aj stilbény, taníny, ligníny, kurkuminoidy a iné²⁷.

3.2. Štruktúrne črty polyfenolov vo vzťahu k protizápalovej aktivite

Prepojenie medzi fenolickou štruktúrou a protizápalovou aktivitou zohráva významnú úlohu vo vývoji nových liečiv. Boli definované základné štruktúrne požiadavky, ktoré by mali zabezpečiť účinnú protizápalovú aktivitu^{7,28}:

- planárny kruhový systém,
- prítomnosť karbonylovej skupiny v pozícii C4 a C2-C3 a dvojité väzby v kruhu C,
- hydroxylové skupiny v pozíciách C5 a C7 kruhu A,
- dôležitý je počet a poloha hydroxylových skupín a ich *orto*-pozícia na kruhu B.

Zároveň sa zistilo, že flavóny a flavanoly, ktoré majú hydroxylové skupiny v pozícii 4'- na kruhu B, ukázali vyššiu protizápalovú aktivitu než tie, ktoré ich nemajú.

4. Inhibícia lipoxygenáz polyfenolmi – vzťah štruktúry a účinku

4.1. Mechanizmy inhibície

Vzhľadom k tomu, že izoenzyémy LOX sú zakomponované do patogenézy rôznych ochorení, vyhľadávanie inhibítorov LOX je predmetom záujmu medicínskeho a farmaceutického výskumu.

Ako inhibítory LOX boli testované rôzne syntetické molekuly a niektoré boli zavedené do terapeutickú praxe. V liečbe bronchiálnej astmy a alergickej rinitídy sa uplatnili montelukast, zafirlukast a pranlukast, ktoré sú inhibítory cysteinyl leukotriénových (CysLT) receptorov. Zileuton, inhibítor 5-LOX, bol schválený ako antiastmatikum, ale vzhľadom na jeho nepriaznivé farmakokinetické hodnotenia nedosiahol širokého rozšírenia^{9,30}. Na druhej strane, rastlinné sekundárne metabolity sú historicky overené tak v ľudovom liečiteľstve, ale aj v modernej medicíne, a sú alternatívnym prístupom v modulácii patologických procesov⁹. Zo skupiny polyfenolov sú v centre pozornosti flavonoidy, fenolické kyseliny a ich deriváty (stilbény, kurkumín a iné). Vo fyziologických systémoch pôsobia prostredníctvom receptorov a bunkových signálnych kaskád³¹. Štúdie zároveň dokázali, že inhibícia závisí od oxidačného stupňa nehemového železa v aktívnom mieste enzýmu. Mechanizmus inhibície LOX flavonoidmi sa vysvetľuje tým, že elektrón pochádzajúci z flavonoidnej štruktúry prijme Fe^{3+} forma LOX, dochádza k jej redukcii na Fe^{2+} a tým aj k inhibícii enzýmu³².

Podľa mechanizmu inhibície môžu byť inhibítory LOX rozdelené do nasledovných skupín. Mnoho inhibíto-

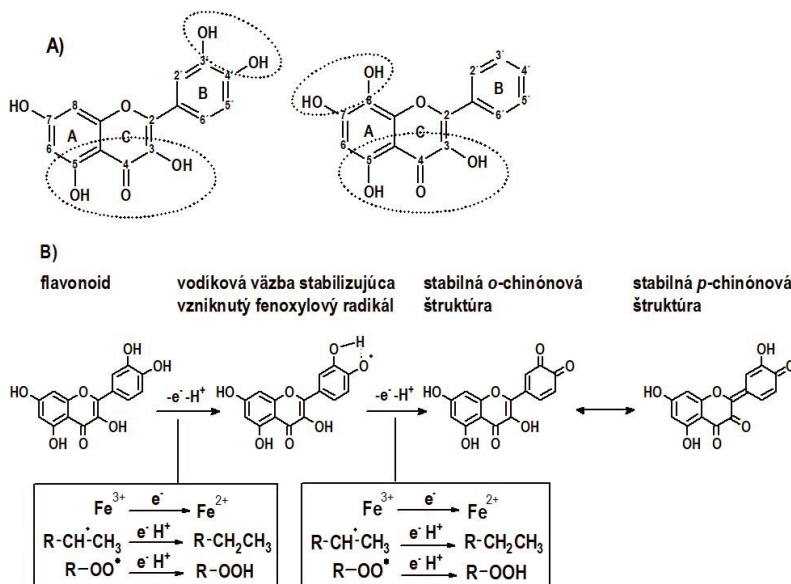
rov však vykazuje viac typov inhibičných mechanizmov súčasne³³.

4.2. Redoxné inhibítory

Keďže v priebehu lipoxygenázovej reakcie vznikajú voľné radikály peroxidov, predstavuje použitie antioxidantov vhodnú cestu prirodzenej inhibície LOX neutralizáciou radikálov generovaných procesom lipidovej peroxidácie³⁴. Redoxné inhibítory pôsobia ako antioxidanty pri oxidatívnej reakcii uskutočnenej LOX. Okrem redoxných vlastností je pre ich aktivitu určujúca i lipofilita⁹. Zlúčeniny s antioxidačnými vlastnosťami sú teda zväčša látky lipofilného charakteru s aromatickým fenolovým kruhom vo svojej štruktúre, ktorý podlieha oxidácii na chinóny. Súčasne redukujú atóm železa v aktívnom mieste enzýmu a tak bránia iniciácii LOX katalyzovanej reakcie. Z rastlinných antioxidantov sú známe flavonoidy, kyselina kávová a kumaríny. Podmienkou zachovania antioxidačnej aktivity flavonoidov je prítomnosť hydroxylových skupín v polohách C5, C6, C7 a C8 kruhu A (cit.⁹) (obr. 2).

4.3. Inhibítory viažuce ión železa

Do tejto skupiny inhibítorov patria zlúčeniny schopné chelatacie iónu železa v aktívnom mieste enzýmu a/alebo redukcie aktívnej Fe^{3+} obsahujúcej formy na neaktívnu Fe^{2+} formu. To znamená, že inhibítory sa môžu kovalentne viazať na ión železa alebo tvoria molekulárne komplexy blokujúce prístup k železu³³. *In vivo* aktivita inhibítorov môže závisieť od izoenzýmov LOX, ale aj od oxidačného stavu iónu železa³⁵. K inhibícii enzýmu dochádza v jeho aktívnom centre naviazaním inhibítora na atóm železa za



Obr. 2. A) Podmienky pre antioxidačnú aktivitu polyfenolov – blízkosť dvoch hydroxylových funkčných skupín alebo hydroxylovej a oxo-skupiny; B) Mechanizmus antioxidačnej aktivity polyfenolov – poskytnutie elektrónu, ktorý redukuje železitý kation a neutralizuje radikálové medziprodukty

tvorby chelátu. Do tejto skupiny inhibítorov patria flavonoidy, kurkumín a zlúčeniny, ktoré v molekule obsahujú *N*-hydroxymočovinu (zileuton)^{29,30}.

4.4. Analógy substrátov/produktov

Medzi vysoko selektívne a účinné inhibítory LOX patria zlúčeniny súťažiace s AA o väzbu na aktívne miesto enzýmu – kompetitívne inhibítory. Jedná sa o látky, ktoré sú štruktúrne podobné substrátom LOX. Medzi analógy AA patria ETIA (kyselina all-*cis*-5,8,11-eikosatriénová) a ETYA (kyselina all-*cis*-5,8,11,14-eikosatetraénová). Z rastlinných obsahových látok tiež kurkumín, štruktúrne podobný substrátu, je kompetitívnym inhibítorom izoenzýmov LOX (cit.³⁶).

Zlúčeniny, ktoré sa štruktúrou podobajú produktom LOX reakcie sú inhibítory, ktoré pôsobia mechanizmom spätnej inhibície. Sem patria 15-HETE; 5-HETE-laktón; 5,6-metano-LTA₄ a metoxyalkyltiazo³⁷.

4.5. Alosterické inhibítory

Tento typ inhibície bol objavený pri *in vitro* inhibíciách sójovej LOX1 ale aj humánnej 15-LOX zlúčeninou oleylsulfát. Oleylsulfát sa viaže na alosterické miesto enzýmu, čo spôsobí zmenu konformácie enzýmu a deformáciu aktívneho miesta³⁸.

4.6. FLAP (aktivátor 5-LOX) a jeho inhibítory

FLAP je proteín aktivujúci 5-LOX, ktorý sa podieľa na transporte a na vhodnej orientácii AA k 5-LOX. Medzi FLAP inhibítory sa zaraďujú zlúčeniny, ktoré selektívne inhibujú FLAP bez priameho ovplyvnenia aktivity 5-LOX, pričom znemožňujú uľahčený prenos substrátu k 5-LOX. Patrí sem zlúčenina MK-866 prvýkrát zavedená skupinou vedcov pod vedením Johna Gillarda³⁹.

4.7. Duálne inhibítory

Zaujímavé sú snahy získať zlúčeniny, ktoré umožňujú súčasnú inhibíciu aktivity LOX a cyklooxygenázy a dosiahnuť zvýšenie ich antiflogistického, antidiabetického a protinádorového účinku. Tieto inhibítory sa nazývajú duálne inhibítory a vyznačujú sa synergickými účinkami. Duálne inhibítory sú nesteroidné antiflogistiká (NSAID), pyrazolinové a pyrolizinové deriváty, deriváty tiofenu a iné⁴⁰.

4.8. Inhibítory cysteinylových receptorov

Cysteinylleukotrién (CysLT) je jedným z prozápalových mediátorov. CysLT pôsobí prostredníctvom špecifických receptorov spolupracujúcich s G-proteínmi. Antagonisty CysLT1 receptorov, ktoré sú už uvedené v medicínskej praxi (montelukast, zafirlukast, pranlukast, ibudilast) obsadzujú väzbové miesta cys-leukotriénov, čím tlmiť nástup astmatických záchvatov⁴¹.

Zo štruktúrnych vlastností fenolických látok vyplýva aj ich schopnosť inhibovať aktivitu polohovo špecifických LOX. Existuje mnoho prác, ktoré sa zameriavajú na sledovanie vplyvu rastlinných biologicky aktívnych látok typu polyfenolov na aktivitu LOX. Aj na našom pracovisku sa venujeme štúdiu antilipoxygenázovej aktivity sekundárnych metabolitov rastlín v modeloch diabetes mellitus a reumatoidnej artritídy. V publikovaných prácach sme testovali vplyv flavonoidov izolovaných z *Calendula officinalis* L. (cit.⁴²), fenylypropanoidov *Ligustrum vulgare* L. (cit.⁴³) a kurkumínu⁴⁴ na aktivitu LOX. Doteraz nepublikovanými výsledkami sme dosiahli inhibíciu rekombinantnej 12/15 LOX použitím modifikovaných flavonoidov.

5. Záver

Mnohé štúdie sa venujú syntéze a hodnoteniu účinku rôznych chemických zlúčenín, ktoré pôsobia ako inhibítory LOX. Vzhľadom na existenciu izoenzýmov LOX, ktoré sú polohovo a tkanivovo špecifické, sa ukazuje, že vývoj selektívneho inhibítora je náročný. Funkčná multiplicita LOX vyžaduje vývoj inhibítorov špecifických voči izoenzýmom. Preto sa výskum orientuje na sledovanie izomorfnej špecifity rôznych inhibítorov. Existuje obmedzený počet úspešných liečiv, ktoré sa môžu použiť na terapeutické účely.

Polyfenoly, sekundárne metabolity rastlín, sa vyznačujú efektívnou antilipoxygenázovou aktivitou, pričom môžu pôsobiť ako antioxidanty a zhasáče voľných radikálov. Z hľadiska možnosti ich využitia ako selektívnych inhibítorov izoenzýmov LOX je podstatné študovať mechanizmus inhibície LOX. Perspektívne hľadanie optimálnych inhibítorov vyžaduje aj objasnenie štruktúry a úloh LOX pri rôznych ochoreniach. Vývoj zvieracích modelov, príprava purifikovaných a rekombinantných enzýmov a cieľené mutácie sú cesty k lepšiemu pochopeniu úloh LOX. Toto môže byť dôležitým nástrojom pri vyhľadávaní terapeuticky účinných látok.

Zoznam skratiek

AA	kyselina arachidónová
CysLT	cysteinylleukotrién
ETIA	kyselina all- <i>cis</i> -5,8,11-eikosatriénová
ETYA	kyselina all- <i>cis</i> -5,8,11,14-eikosatetraénová
FLAP	five-lipoxygenase activating protein (proteín aktivujúci 5-lipoxygenázu)
HETE	hydroxyeikosatetraénové kyseliny
HPETE	hydroperoxyeikosatetraénové kyseliny
IL	interleukín
LA	kyselina linolová
LOX	lipoxygenáza
LT	leukotrién
MK	masné kyseliny
NF-κB	nukleárny faktor kappa B
NSAID	nesteroidné antiflogistiká
PNMK	polynenasýtené masné kyseliny
PPARα	α-receptor aktivovaný proliferátormi peroxizómov

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov VEGA 1/0394/18, VEGA 1/0290/16, VEGA 1/0463/18, 2/0115/19 a APVV-15-0308.

LITERATÚRA

- Valentine R. C., Valentine D. L.: Prog. Lipid Res. 43, 383 (2004).
- Tootle T. L.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 1629 (2013).
- Kuhn H., Banthiya S., Leyen K.: Biochim. Biophys. Acta 1851, 308 (2015).
- Pekárová M., Kuhn H., Bezáková L., Ufer C., Heydeck D.: Arch. Biochem. Biophys. 571, 50 (2015).
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kuhn H., Walter M.: Arch. Biochem. Biophys. 503, 161 (2010).
- Horn T., Kakularam K. R., Anton M., Richter C., Reddanna P., Kuhn H.: Redox Biol. 1, 566 (2013).
- Rådmark O., Werz O., Steinhilber D., Samuelson B.: Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 1851, 331 (2015).
- Yamamoto Y., Gaynor R. B.: Curr. Mol. Med. 1, 287 (2001).
- Wisastra R., Dekker F. J.: Cancers 6, 1500 (2014).
- Liavonchanka A., Feussner I.: J. Plant Physiol. 163, 348 (2006).
- Poeckel D., Funk C. D.: Cardiovasc. Res. 86, 243 (2010).
- Horn T., Adel S., Schumann R., Sur S., Kakularam K. R., Polamarasetty A., Reddanna P., Kuhn H., Heydeck D.: Prog. Lipid Res. 57, 13 (2015).
- Jisaka M. a 10 spoluautorov: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 136 (2005).
- Dobrian A. D., Lieb D. C., Cole B. K., Taylor-Fishwick D. A., Chacrabarti S. K., Nadler J. L.: Prog. Lipid Res. 50, 115 (2011).
- Rapp J.: Dissertation. The University of Toledo, Toledo, USA, 2006.
- Jameson J. B., Kantz A., Schultz L., Kalyanaraman C., Jacobson M. P., Maloney D. J., Jadhav A., Simeonov A., Holman T. R.: PLoS One 9, e104094 (2014).
- Joo Y. C., Oh D. K.: Biotechnol. Adv. 30, 1524 (2012).
- Balistreri C. R. (ed.): Eicosanoids, Inflammation and Chronic Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Health Effects and Targets for Therapies. Nova Science Publisher, New York 2015.
- Sun L., Xu Y. W., Hang J., Liang H., Wang N., Cheng Y.: J. Lipid. Res. 56, 502 (2015).
- Mashima R., Okuyama T.: Redox Biol. 6, 297 (2015).
- Szefel J., Piotrowska M., Kruszewski W. J., Jankun J., Lysiak-Szydlowska W., Skrzypczak-Jankun E.: Curr. Mol. Med. 11, 13 (2011).
- Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A.: Int. J. Mol. Sci. 14, 14950 (2013).
- Pietta P. G.: J. Nat. Prod. 63, 1035 (2000).
- Mojžiš J., Mojžišová G.: Flavonoidy a ich biologické účinky, Viena Košice, Košice 2001.
- Allgrove J. E., Davison G., v knihe: Polyphenols in Human Health and Disease (Watson R. R., Preedy V. R., Zibadi S., ed.), kap. 19, str. 241. Academic Press, San Diego 2014.
- Kumar N., Pruthi V.: Biotechnol. Rep. (Amst.) 4, 86 (2014).
- Ambriz-Pérez D. L., Bang W. Y., Nair V., Angulo-Escalante M. A., Cisneros-Zevallos L., Heredia J. B.: J. Agric. Food Chem. 64, 1899 (2016).
- Gautam R., Jachak S. M.: Med. Res. Rev. 29, 767 (2009).
- Theron A. J., Steel H. C., Tintinger G. R., Gravett C. M., Anderson R., Feldman C. J.: Immunol. Res. 2014, 608930 (2014).
- Rossi A., Pergola C., Koeberle A., Hoffmann M., Dehm F., Bramanti P., Cuzzocrea S., Werz O., Sautebin L.: Br. J. Pharmacol. 161, 555 (2010).
- Aggarwal B. B., Harikumar B. K.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 40 (2009).
- Herre S., Schadendorf T., Ivanov I., Herrberger C., Steinle W., Braun K., Preissner R., Kuhn H.: ChemBioChem 7, 1089 (2006).
- Skrzypczak-Jankun E., Chorostowska-Wynimko J., Selman S., Jankun J.: Curr. Enzyme Inhib. 3, 119 (2007).
- Bezáková L., Holková I., Balažová A., Obložinský M., Mikuš P.: Chem. Listy 111, 567 (2017).
- Chedea V. S., Jisaka M.: Afr. J. Biotechnol. 12, 2786 (2013).
- Skrzypczak-Jankun E., McCabe N. P., Selman S. H., Jankun J.: Int. J. Mol. Med. 5, 521 (2000).
- Mogul R., Johanson E., Holman T. R.: Biochemistry 39, 4801 (2000).
- Walther M., Hofheinz K., Vogel R., Roffeis J., Kuhn H.: Arch. Biochem. Biophys. 516, 1 (2011).
- Gillard J. a 27 spoluautorov: Can. J. Physiol. Pharmacol. 67, 456 (1989).
- Yoshimoto T., Takahashi Y.: Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69, 245 (2002).
- Konstan M. W., Doring G. G., Heltshe S. L., Lands L. C., Hilard K. A., Koker P., Bhattacharya S., Hamilton A.: J. Cystic Fibrosis 13, 148 (2014).
- Bezáková L., Mašterová I., Pauliková I., Pšenák M.: Pharmazie 51, 126 (1996).
- Mučaji P., Záhradníková A., Bezáková L., Cupáková M., Rauová D., Nagy M.: Molecules 16, 8198 (2011).
- Bezáková L., Košťálová D., Obložinský M., Hoffman P., Pekárová M., Kollárová R., Holková I., Mošovská S., Šturdík E.: Čes. Slov. Farm. 63, 26 (2014).

L. Bezáková^a, A. Balažová^a, I. Holková^a, M. Obložinský^a, K. Bauerová^c, and P. Mikuš^b
(^a*Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava,* ^b*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava,* ^c*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Centre of Experimental Medicine Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Animal Lipoxygenases – Polyphenols as Potential Lipoxygenase Inhibitors**

Lipoxygenases belong to the multigene family of dioxygenases containing non-heme iron in the active site of the enzyme. They catalyze the stereospecific insertion of molecular oxygen into the *cis,cis*-1,4-pentadiene configuration of polyunsaturated fatty acids, thus forming corresponding hydroperoxides which serve as starting compounds for the synthesis of leukotrienes and lipoxins, i.e., mediators of allergic and inflammatory diseases. Based on their positional specificity, lipoxygenases are categorized as 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX and 15-LOX isoenzymes, which differ not only in the position of oxidation but also in the chirality, essential for their biological activity. Increased expression of genes for lipoxygenase in the pathogenesis of inflammatory, cardiovascular or cancer diseases, but also diabetes mellitus and other diseases, has prompted considerable research efforts toward finding new

effective inhibitors applicable in the therapy. Furthermore, in addition to the searching for new selective inhibitors of LOX isoenzymes, the current attention is also focused on plant secondary metabolites, particularly from the group of polyphenols. For the application of medicinal plants containing polyphenols, the isolation and characterization of their biologically active compounds and study of the mechanism of their lipoxygenase inhibitory activity is a way to succeed. The use of LOX as a model enzyme in the search for effective inhibitors requires consideration of the functional multiplicity of the enzyme and the selection of inhibitors specific for LOX isoenzymes. The preparation of purified and recombinant forms and targeted mutations of LOX coding genes could be the way of obtaining potential therapeutically active agents.

Keywords: animal lipoxygenases, polyunsaturated fatty acids, lipoxygenase inhibitors, plant secondary metabolites, polyphenols, biological activity

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Slovak Scientific Grant Agency (Grant numbers: VEGA 1/0394/18, 1/0290/16, 1/0463/18, 2/0115/19) and Slovak Research and Development Agency (Grant Number: APVV-15-0308).

VYUŽITÍ KOFEINU JAKO AKTIVNÍ SLOŽKY NÁTĚROVÝCH BIOCIDNÍCH SYSTÉMŮ

KLÁRA KOBETIČOVÁ

Katedra materiálového inženýrství a chemie, Fakulta stavební, České Vysoké Učení Technické v Praze, Thákurova 7, 166 29 Praha 6

klara.kobeticova@fsv.cvut.cz

Došlo 18.5.20, přijato 20.7.20.

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

Klíčová slova: kofein, biocidy, metylxantiny, nátěry

Obsah

1. Úvod
2. Účinnost proti biologickým škůdcům
3. Příjem a (bio)degradace kofeinu
4. Účinnost kofeinu v boji při ochraně dřeva
5. Závěry

1. Úvod

Kofein (1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion) patří mezi nejznámější a nejužívanější alkaloidy, povzbuzující nervovou soustavu a srdeční činnost. Jeho strukturní vzorec můžeme vidět na obr. 1. Je to hořká, bílá, krystaly vytvářející látka, nacházející se v kávových bobech, listech čajovníku a ořeších koly. Kromě kávy a čaje se s ním tak můžeme setkat i v mnoha různých nápojích, potravinách, kosmetických výrobcích (šampóny podporující růst vlasů, krémy omlazující pleť) a potravinových doplňcích podporujících snížení únavy.

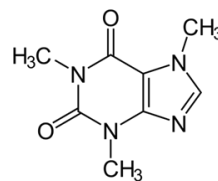
Jak už bylo zmíněno, tento alkaloid se přirozeně vyskytuje převážně v listech či plodech některých rostlin, kde má biocidní účinky. Řada vědeckých studií se proto nyní zaměřuje na využití jeho potenciálu proti různým škůdcům. Biocidní přípravky, které byly v minulé době využívány, totiž většinou obsahovaly různé kovy anebo se jednalo o perzistentní chlorované organické látky, jejichž výroba a použití již dnes není doporučeno anebo je přímo zakázáno mezinárodní legislativou REACH¹ a souvisejícími předpisy. Nebezpečnost kofeinu pro životní prostředí – ekotoxikita kofeinu pro necílové organismy (vodní a suchozemské rostliny, živočichy, mikroorganismy), již také byla studována a nebyl zjištěn významný negativní efekt i při vysokých koncentracích či dávkách kofeinu pro modelové laboratorní organismy^{2–4}. V přírodních vzorcích vod či půdy bývá většinou kofein nacházen v piko- až

mikrogramových koncentracích, kde můžeme brát v úvahu jeho případný toxický potenciál v přítomných směsích v interakci spolu s dalšími chemickými látkami, jako jsou residua léčiv a výrobků denní spotřeby⁵. V posledních letech je výzkum zaměřen převážně na aplikaci kofeinu jako látky fungicidní a insekticidní pro ochranu dřeva a výrobků na bázi dřeva. V následujících kapitolách je proto popsána zjištěná účinnost kofeinu proti jednotlivým skupinám škůdců, jeho degradace a účinnost kofeinu při použití různých druhů ochrany dřeva (impregnace, máčení) za různých podmínek.

2. Účinnost proti biologickým škůdcům

Bylo prokázáno, že kofein může paralyzovat, ovlivňovat chování nebo zabít některé druhy hmyzu. Např. ve studiích⁶ autoři popisují vliv kofeinu a theobrominu na chování larev potměníka moučného, který je schopný napadat sklady jakýchkoliv potravin anebo konzumovat i dřevo. Stejně tak byl zjištěn negativní vliv kofeinu, theofylinu a theobrominu pro larvy zavíječe voskového, který se vyskytuje jako škůdce ve včelích úlech⁷. Byl také potvrzen neurologický účinek kofeinu na pavouky. Pokud pavouci zkonzumovali mouchy namočené v kofeinu, byli z toho dezorientováni a stavěli špatně svoje sítě pro chytání další kořisti⁸. Kofein byl použit i v přípravcích proti termitům⁹. Termiti patří mezi tzv. společenský, sociální hmyz, jejichž přežití závisí na intenzivní komunikaci a spolupráci mezi jednotlivými členy termitiště. Po aplikaci biocidního přípravku na bázi kofeinu termiti přežili, byli ale silně zmateni a byla narušena jejich vzájemná komunikace.

Kofein byl úspěšně použit také proti dřevokazným houbám a plísním. V práci Arory a Ohlana¹⁰ byla studována účinnost čajových extraktů a čistého kofeinu proti deseti druhům hub, způsobujících tzv. hnědou a bílou hnilobu. Extrakt ze zeleného čaje byl ze všech zkoušených čajů proti některým houbám nejúčinnější. Káva byla účinnějším inhibítozem růstu vybraných druhů plísní než testované druhy čaje. V jedné studii autoři zkoumali vliv pražené kávy na inhibici růstu vybraných druhů plísní a hub¹¹. Tento pokus byl proveden na agaru. Opět byl potvrzen inhibiční účinek kofeinu. Ve studii Lekounougou a spol.¹² byl ko-



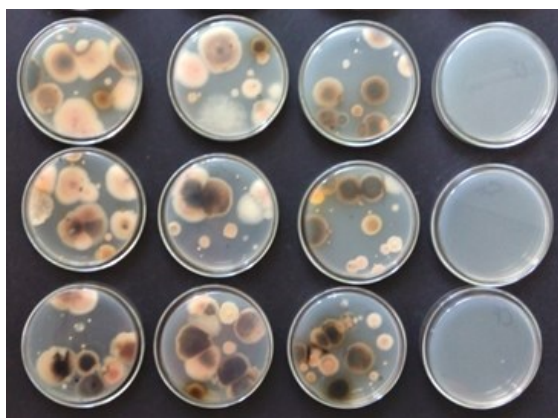
Obr. 1. Chemický vzorec kofeinu

fein úspěšně testován proti dřevokazným houbám, v kombinaci s komerčním, toxickým propikonazolem a byl zde prokázán jejich synergický účinek. Ratajczak a spol.¹³ zkoumali účinek kofeinu na impregnované dřevo, ale pouze jednu koncentraci (20 g l^{-1}) a v kombinaci s organosilany a propolisem (30 %). Zjistili lepší rezistenci dřeva ošetřeného kombinací těchto látek, než když by bylo dřevo impregnováno pouze kofeinem. Kwasniewska-Sip a spol.¹⁴ testovali vodné roztoky kofeinu proti 4 druhům hub a 10 druhům plísní, běžně se vyskytujících na dřevu. Houby se projeví jako citlivější (100% inhibice nastala od koncentrace kofeinu 10 g l^{-1}) než plísně (100% inhibice od koncentrace 25 g l^{-1}). Ti samí autoři o rok později prokázali, že borovicové dřevo bylo po termální modifikaci chráněno proti plísni *A. niger* pouze částečně¹⁵. Ve studii Kobetičové a spol.¹⁶ byl testován kofein spolu s theofylinem (1,3-dimethyl-7H-purin-2,6-dion) a theobrominem (3, 7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion) na agaru proti plísním. U všech látek byla pro testování použita koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti látek ve vodě při 20°C . Jedině kofein se zdál být v této studii 100% účinný proti plísním (obr. 2).

Na druhou stranu, příroda se vždy snaží o zachování určité stability a druhové rozmanitosti. Existují proto i organismy, které si v průběhu evoluce bohužel dokázaly vytvořit imunitu proti působení insekticidních účinků kofeinu či jiných látek přítomných v listech kávovníku. Jedná se např. o jeho úhlavního škůdce, motýla druhu *Perileucoptera coffeella*, jehož larvy hromadně požírají listy a bohužel dokázaly způsobit významné hospodářské škody¹⁷.

3. Příjem a (bio)degradace kofeinu

Ve vědeckých databázích (Web of Science, Scopus) lze dohledat mnoho studií, ve kterých je analyzováno množství kofeinu vyskytující se v určitém prostředí, jako jsou potraviny anebo povrchové či odpadní vody. Nikdo



Obr. 2. Test se vzdušnými plísněmi na agaru po 7 dnech expozice testovaným látkám. Směrem z levé na pravou stranu: kontrola (čistý agar), theobromin ($0,33 \text{ g l}^{-1}$), theofylin ($5,5 \text{ g l}^{-1}$), kofein (20 g l^{-1}). Foto: K. Kobetičová, ČVUT v Praze

ale prozatím nezkoušel měřit chemickou degradaci kofeinu v časovém horizontu. Naopak, biodegradace kofeinu je u škůdců prozkoumána poměrně na dobré úrovni. U hmyzu byla degradace kofeinu popsána ve studii⁷ na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Biodegradace kofeinu na theobromin a theofylin byla v larvách potvrzena pomocí HPLC. Bylo zjištěno, že degradace kofeinu v larvách probíhá stejnou cestou jako u savců, autoři proto uvádějí, že je možné tyto organismy používat v podobných typech studií jako náhradu savčích modelů. Tím by došlo k redukci obratlovců, používaných v pokusech podle nejnovějších požadavků na ochranu laboratorních zvířat podle evropské legislativy REACH. Na dřevokazných škůdcích, jako jsou tesařík, lýkožrout nebo kůrovec, prozatím podobný výzkum dle dostupných informací neproběhl. Nelze se tomu ale divit, tyto brouci mají larvy zavrtané hluboko ve dřevě, dospělí jedinci poté opouštějí poškozené dřevo pouze v určitých časových intervalech, např. jednou za tři roky. Zisk dostatečného množství jedinců pro provádění pokusů by tak byl velmi problematický.

Bylo například zjištěno, že dřevokazné houby a plísně jsou podobné jako rostliny¹⁸ schopné kofein z prostředí přijímat¹⁹ a stejně tak i degradovat ve svém organismu. Kofein se v nich může biodegradovat na tři různé produkty, a to na paraxanthin, theofylin a theobromin²⁰. Paraxanthin se dále může degradovat na 7-metylxanthin anebo 1-metylxanthin. Theofylin na 1-metylxanthin anebo na 3-metylxanthin. Theobromin na 3-metylxanthin. Hlavním meziproduktem bývá theofylin. Konečným metabolitem biodegradace všech meziproductů je xanthin. Oproti tomu bakterie degradují kofein jiným způsobem. Bakterie degradují kofein na theobromin anebo paraxanthin²¹ a poté na 7-metylxanthin a dále na xanthin¹⁸. Ten je poté konvertován na aminokyselinu guanin, kterou mikroby využívají jako zdroj živin ke svému růstu²².

4. Účinnost kofeinu v boji při ochraně dřeva

U dřeva existuje spousta možností, jak jej chránit před působením počasí, stárnutím, požáry i biologickými škůdci. Tato opatření se obvykle rozdělují na konstrukční, fyzikální, chemické a biologické. Velmi často se tyto metody kombinují²³. V případě kofeinu se jedná o ochranu chemickou. Jak je zmíněno v kapitole 2, účinky kofeinu proti různým škůdcům byly studovány z mnoha hledisek, tj. v čisté formě, ve formě extraktů anebo výluhů na agaru anebo v kombinaci s různými látkami. Málo z těchto studií se ovšem zaměřuje na vliv jakékoliv aplikace kofeinu přímo na vlastnosti dřeva. Výjimku tvoří článek¹³, kde autoři za předepsaných podmínek impregnovali borovicové dřevo směsí silanů, propolisu a kofeinu. Tento komplex se navázal na dřevo vazbami Si-O a Si-C díky silanům, což bylo potvrzeno FTIR analýzou. Na vazbě se také podle FTIR analýzy podílely aminoskupiny a karbonylové skupiny kofeinu a propolisu. Na druhou stranu, nebyly prokázány změny vazby směsi na dřevo na zlepšení odolnosti dřeva napadeného houbami v porovnání s kontrolní skupinou

bez přítomnosti hub. Dále bylo zjištěno, že pokud je místo máčení dřeva v roztoku s účinnou látkou použita tlaková impregnace, tak je snížen vliv druhu ošetřovaného dřeva a použité koncentrace na efektivitu aplikace²⁴. Navíc, pokud použijeme k ošetření dřeva vodní výluh čistého kofeinu, tak časem může docházet k jeho vyluhování ze dřeva a snížení jeho ochrany, jak bylo prokázáno ve studii²⁵.

Ve studii¹⁵ proto autoři použili kombinaci impregnace kofeinem s termální modifikací borovicového dřeva. Termální modifikace redukuje sorpci vody a mění chemismus dřeva, díky degradaci termolabilních hemicelulos^{26,27}. Výsledky této studie naznačily, že při teplotě 237 °C došlo ke ztrátě dřevní hmoty vlivem rozvolňování chemických vazeb. Došlo také ke změně zbarvení dřeva při teplotě od 180 °C do 200 °C. Jako optimální pro termální modifikaci se zdála být teplota 160 °C, protože vedla k tvorbě stabilních vazeb kofeinu a dřeva¹⁵ bez jeho následného poškození.

5. Závěry

Kofein, stejně jako mnoho dalších látek rostlinného původu, se dostává do popředí vědeckých prací, zabývajících se ochranou stavebních materiálů proti různým škůdcům. Jeho pesticidní účinky jsou široké, od fungicidních až po insekticidní. Jeho výhodou je nízká toxicita pro životní prostředí, snadná výroba a nízká cena a efektivní účinnost proti různým škůdcům v různých formách od čistého kofeinu přes jeho aplikaci v různých směsích či extraktech z přírodních zdrojů (výluhy z listů a plodů různých rostlin).

Vypracováno s finanční podporou Grantové Agentury České republiky, z projektu číslo 19-02067S.

Seznam zkratk

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier Transform Infrared spectroscopy)
REACH	nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Registration, Evaluation, Assessment of Chemicals)

LITERATURA

1. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006. o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, a o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnice. (ÚV EU 30.12.2006 L 396, str. 1).
2. Testolin R. C., Tischer V., Lima A. O., Cotelle S., Féraud J. F., Radetski C. M.: Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 19, 2186 (2012).
3. Losonszky G.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2014.
4. Lopez-Cruz L., San-Miguel N., Bayarri P.: Front. Behav. Neurosci. 10, 1 (2016).
5. Zou J., Li N.: J. Chromatogr. A 1136, 106 (2006).
6. Kobetičová K., Petříková M., Nábělková J., Černý R.: *Proceedings of 7th International Conference on Chemical Technology, April 15. – 17. 2019, Mikulov – Czech Republic* (Česká společnost průmyslové chemie, ed.), str. 42, Praha 2019.
7. Maguire R., Kunc M., Hyrsel P., Kavanagh K.: Neurotoxicol. Teratol. 64, 37 (2017).
8. Hesselberg T., Vollrath F.: Physiol. Behav. 82, 519 (2014).
9. Tiepo E. N., Correa A. X. R., Resgalla C. Jr., Cotelle S., Féraud J. F., Radetski C. M.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 939 (2010).
10. Arora D. S., Ohlan D.: J. Basic Microb. 37, 159 (1997).
11. Barbero-Lopez A., Ochoa-Retamero A., López-Gómez Y., Vilppu T., Venalainen M., Lavola A., Julkunen-Tiitto R., Haapala A.: Bioresources 13, 6555 (2018).
12. Lekounougou S., Ondo J. P., Jacquot J. P., Nevers G., Gérardin P., Gelhaye E.: *Conference Gareth Williams Scholarship Award, Jackson, USA, 20.-24. 5. 2007*, IRG/WP 07-30427.
13. Ratajczak I., Wozniak M., Kwasniewska-Sip P., Szentner K., Cofta G., Mazela B.: Eur. J. Wood Wood Prod. 76, 775 (2018).
14. Kwasniewska-Sip P., Cofta G., Nowak P. B.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 132, 178 (2018).
15. Kwasniewska-Sip P., Bartkowiak M., Cofta G., Nowak P. B.: Bioresources 14, 1890 (2019).
16. Kobetičová K., Kočí V., Petříková M., Šimůnková K., Černý R.: *4th Central European Symposium on Building Physics (CESBP), September 2.-5. 2019, Prague-Czech Republic*, str. 282, Praha 2019.
17. Guerreira O., Mazzafera P.: J. Chem. Ecol. 26, 1447 (2000).
18. Mazzafera P.: Front. Biosci. 9, 1348 (2004).
19. Brand D., Pandey A., Roussos S., Soccol C.R.: Enzym. Microb. Technol. 27, 127 (2000).
20. Carrasco-Cabrera C. P., Bell T. L., Kertesz M. A.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 103, 5831 (2019).
21. Dash S. S., Gummadi S. N.: Biotechnol. Lett. 28, 1993 (2006).
22. Gutierrez-Sanchez G., Roussos S., Augur C.: Folia Microbiol. 58, 195 (2013).
23. Tesařová D., Hlavatý J., Čech P.: *Povrchové úpravy dřeva*. Grada Publishing a.s., Praha 2014.
24. Humar M., Zlindra D., Pohleven E.: Build. Environ. 42, 578 (2007).
25. Kwasniewska-Sip P., Doczekalska B., Bartkowiak M., Katolik Z., Cofta G.: For. Wood Technol. 95, 166 (2016).
26. Kamdem D. P., Pizzi A., Jermannaud A.: Holz als Roh- und Werkstoff 60, 1 (2002).
27. Lee S. H., Ashaari Z., Lum W. C., Abdul Halip J.,

Ang A. F., Tan L. P., Chin K. L., Md Tahir P.: *Constr. Build. Mater.* 181, 408 (2018).

K. Kobetičová (*Departments of Material Engineering and Chemistry, Faculty of Civil Engineering, Czech Technical University in Prague*): **Use of Caffeine as an Active Substance in Biocidal Coatings**

Caffeine is one of the most widely used stimulants in the world. It can also be added to various drinks, foods and cosmetics. Caffeine occurs naturally in plants, where it

performs a protective function against pests. This feature is also beginning to be used in the woodworking industry. This work summarizes the existing studies dealing with the use of caffeine as an active substance in biocides, its uptake and biodegradation by wood pests and its known interactions with wood and the possibilities of use.

Keywords: caffeine, biocides, methylxanthines, coatings

Acknowledgements

This work was supported by the grant 19-02067S from the Czech Scientific Grant Agency.

PROTINÁDOROVÉ A ANTI-HIV DERIVÁTY BETULINOVÉ KYSELINY

DAVID KODR^a, MICHAELA RUMLOVÁ^b,
TOMÁŠ ZIMMERMANN^a, PETR DŽUBÁK^c,
PAVEL DRAŠAR^a a MICHAL JURÁŠEK^a

^a Ústav chemie přírodních látek, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, ^b Ústav biotechnologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
jurasekm@vscst.cz

Došlo 22.6.20, přijato 29.6.20.

Klíčová slova: kyselina betulinová, anti-HIV-1, anti-HIV-2, protinádorová aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Protinádorové účinky
3. Anti-HIV účinky
4. Deriváty
 - 4.1. Protinádorové deriváty
 - 4.1.1. C-3 deriváty
 - 4.1.2. C-28 deriváty
 - 4.1.3. Další deriváty
 - 4.2. Anti-HIV deriváty
 - 4.2.1. Deriváty zabraňující vstupu viru HIV-1 do buňky
 - 4.2.2. Maturační inhibitory HIV-1
 - 4.2.3. Deriváty s anti- HIV-2 aktivitou
5. Závěr

1. Úvod

Betulinová kyselina (angl. betulinic acid, **BA**) je přírodní pentacyklický triterpen lupanového typu (obr. 1) se širokým spektrem farmakologických indikací. Větší pozornost si získala v 70. letech minulého století, kdy byla pozorována její inhibiční aktivita vůči nádorovým buňkám. **BA** je bílá krystalická látka, která je téměř nerozpustná ve vodě ($0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$, laboratorní teplota)¹ a jen omezeně rozpustná v běžných organických rozpouštědlech. Nevykazuje žádnou absorpci v UV-Vis oblasti.

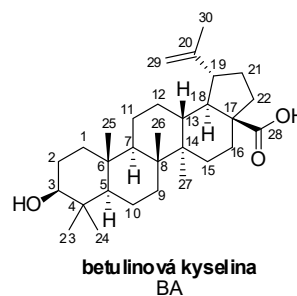
Jedna z prvních studií popisuje extrakci a izolaci **BA** z listů rostliny *Vauquelinia corymbosa*², či z listů a květů

*Hyptis emoryi*³. Nachází se ve svrchní bílé části kůry rostlin z čeledi *Betulaceae*, ale je možné ji nalézt i v jiných rostlinách, např. *Ziziphus spp.*⁴, nebo *Syzygium spp.*⁵.

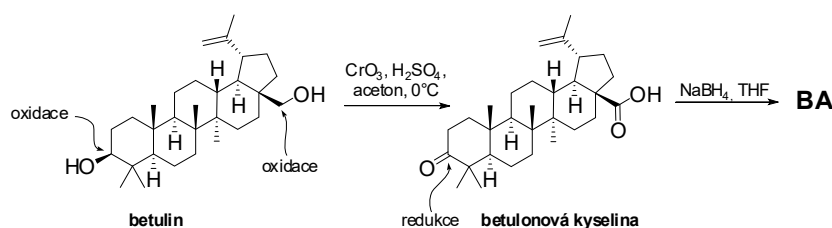
Ačkoliv je **BA** v rostlinné říši hojně rozšířeným sekundárním metabolitem, její procentuální zastoupení v samotném rostlinném materiálu není příliš vysoké. Pouhá extrakce z rostlinného materiálu tak není dostatečná pro její získávání. **BA** lze snadno připravit semisynteticky⁶ či mikrobiální biotransformací⁷ z jiného přírodního triterpenu betulinu (obr. 2), který může tvořit až 20 % váhy sušeného rostlinného materiálu⁸. Samotný výskyt betulinu v březové kůře popsal ve své práci Lowitz již v 18. století⁹. Synteticky je betulin oxidován směsí oxidu chromového a kyseliny sírové, za vzniku betulonové kyseliny. Působením NaBH_4 , je v dalším kroku stereoselektivně redukována 3-oxoskupina za vzniku **BA** (obr. 2).

I přes nízkou rozpustnost ve vodných roztocích si **BA** získává velkou pozornost svým širokým spektrem více či méně zajímavých účinků. Velkou výhodou je také její velmi nízká toxicita 500 mg kg^{-1} (myš)¹⁰. K méně významným účinkům **BA** patří slabá antimikrobiální¹¹ či spasmogenní¹² aktivita. Zajímavějším faktem je, že byla pozorována toxicita *in vitro* proti parazitickému prvokovi *Plasmodium falciparum*¹³. Nicméně nepříznivé výsledky testů *in vivo*, potenciální využití **BA** jako nového antimalarika vyloučily¹⁴. V současné době jsou, především v zemích zasažených epidemií, vyvíjeny nové a účinnější deriváty, které by bylo možné využít jako účinný lék¹⁵. Jedna ze současných studií též naznačuje možné využití **BA** při léčbě diabetu druhého typu¹⁶. Jak již bylo uvedeno výše, **BA** je jen velmi málo toxická. O to překvapivější je pak její selektivní cytotoxicita vůči nádorovým buňkám¹⁰. V neposlední řadě patří k významným účinkům **BA** antivirová aktivita vůči viru HIV (cit.¹⁷).

Mimo svou širokou škálu biologických aktivit je také **BA** nevazebnými interakcemi schopna v některých organických rozpouštědlech¹⁸ samoskladby (self-assembly). Díky tomuto procesu mohou pak vznikat různé supramolekulární systémy, které vytváří stabilní gely. Této vlastnosti



Obr. 1. Číslovaná struktura betulinové kyseliny



Obr. 2. Příprava BA z betulinu

může být využito především v kombinaci s deriváty lépe rozpustnými ve vodě, k vytvoření cíleného systému dávkování léčiv¹⁹. Mast obsahující 20 % BA byla předmětem klinického testování (číslo NTC00346502) pro léčbu dysplastického névu, nicméně proces testování byl z finančních důvodů pozastaven.

Zastoupení v přírodě, dobrá dostupnost, protinádorové, antivirové účinky a velmi nízká toxicita dělají z BA ideálního kandidáta pro vývoj nového léčiva. V současnosti je BA předmětem mnoha rozsáhlých studií. Vývoj nových derivátů BA se nejčastěji soustřeďuje na modifikace vedoucí ke zlepšení biodostupnosti a zvýšení konkrétní biologické aktivity.

2. Protinádorové účinky

Asi nejzajímavější vlastností BA je její selektivní cytotoxicita. BA vyvolává apoptózu celé řady nádorových buněk již při nízkých nanomolárních koncentracích, avšak na nenádorové buňky vliv nemá²⁰. Schopnost vyvolat selektivní apoptózu má za následek nebývale příznivý terapeutický index. To BA staví oproti, v současnosti užívaným léčivům pro terapii rakoviny (např.: taxol, vinkristin), do naprosto výsadní pozice. Většina těchto látek je silně cytotoxická, a to nejen vůči nádorovým buňkám, ale také vůči buňkám normálním, což může mít za následek i nežádoucí vedlejší účinky. Ačkoliv je mechanismus zodpovědný za selektivitu stále předmětem diskusí, předpokládá se souvislost s nižším pH ($\leq 6,8$) v nádorových buňkách, které pravděpodobně napomáhá absorpci této slabé organické kyseliny²¹. BA potlačuje některé deubiquitinasy a snižuje tak celkovou hladinu onkoproteinů, což by mohlo také vysvětlovat výše zmiňovaný selektivní účinek²².

Další výhodou BA je její mechanismus účinku, neboť neexistuje pouze jedna dráha, ale hned několik možných způsobů, kterými je schopna vyvolat programovanou buněčnou smrt. Jedním je přímé působení BA na mitochondriální membránu. Předpokládá se, že je BA inkorporována do fosfolipidové dvojvrstvy. Dochází k významnému zvýšení permeability vnější membrány, její depolarizaci a uvolnění cytochromu *c* do cytosolu. Ten je následně zodpovědný za spuštění apoptózy, přičemž tento proces je nezávislý na proteinu p53 (cit.²³). Mimo jiné dochází ke vzniku reaktivních kyslíkových částic (ROS – z angl. Reactive Oxygen Species), které způsobují nespecifická po-

škození^{24,25}. V normálních (nenádorových) buňkách je funkce BA opačná, kde má spíše funkci antioxidantu a napomáhá vychytávání ROS (cit.²⁶). V důsledku poškození mitochondrií je indukována kaspasová aktivita (aktivuje kaspasu 3 a 8)²⁷. Obvykle dochází k vychlípení buněčné membrány, ke smršťování buněk, fragmentaci DNA a ke kondenzaci a fragmentaci jádra²³. BA dále vykazuje inhibiční aktivitu vůči topoisomerase I²⁸ a proteasom dependentní i independentní regulační cestou je zodpovědná za inhibici funkce transkripčního faktoru Sp1, Sp3 a Sp4 (cit.²⁹). Také je schopna inhibovat aktivaci stresového transkripčního faktoru NF- κ B, který zajišťuje rezistenci poškozených, tedy i nádorových buněk vůči apoptóze. Právě tato vlastnost by mohla být využita při prevenci vzniku rakoviny³⁰. Ačkoliv jiná studie poukazuje na fakt, že v závislosti na buněčné linii může být tento transkripční faktor BA spíše aktivován³¹. Poněkud odlišný způsob, jakým je inhibován růst tumoru v organismu, je kompletní, či alespoň částečné zpomalení angiogeneze. Předpokládalo se, že BA je schopna inhibovat významný angiogenní faktor aminopeptidasu N (ANPEP gen). Způsob, jakým k inhibici dochází, nebyl objasněn³². Pozdější studie nakonec ukázaly, že antiangiogenního efektu je dosaženo spíše skrze modulaci mitochondrií³³. Byla také prokázána schopnost zastavení buněčného cyklu v G₂, nebo v M fázi, nicméně bez jasného mechanismu³⁴.

Schopnost vyvolávat apoptózu a inhibovat další růst byla u BA i jejích derivátů studována *in vitro* na mnohých buněčných liniích jednotlivých typů tumorů. V některých případech pak probíhaly i další studie *in vivo* na myších. Apoptóza a inhibice růstu byla postupně pozorována u mnohých buněčných linií nádorových buněk, které jsou zodpovědné za melanom¹⁰, neuroblastom, medulloblastom, leukémii, rakovinu tlustého střeva, prsu a plic²³, gliom³⁵, rakovinu prostaty³⁶, rakovinu vaječníků³⁷, rakovinu děložního čípku³⁸, endoteliální karcinom³⁹, rakovinu krku, hlavy a slinivky⁴⁰, rhabdomyosarkom, osteosarkom, hepatocelulární karcinom⁴¹ či rakovinu jícnu⁴². Předmětem dalších studií je také možnost synergických účinků s jinými, při chemoterapii již využívanými, látkami a možné kombinované využití BA za současné radioterapie. Byl popsán aditivní efekt BA a ionizujícího záření při inhibici růstu některých nádorových buněk^{43,44}. Stejně tak v kombinaci BA s některými současnými protinádorovými léčivy (jako např. doxorubicinem, VP16, taxolem, mithramycinem A, cisplatinou či vinkristinem^{40,45}) bylo

dosaženo duálního efektu při indukci apoptózy. Při kombinovaném podávání bylo pozorováno zvýšení citlivosti rezistentních tumorů, např. vůči 5-fluoruracilu, či oxaliplatině⁴⁶.

3. Anti-HIV účinky

Obdobně jako jiné pentacycklické triterpeny byla v minulosti u **BA** testována anti-HIV aktivita. Tato vlastnost byla úspěšně prokázána, ačkoliv výsledky testů nebyly příliš uspokojivé, neboť zmíněný účinek byl pozorován až při poměrně vysokých koncentracích¹⁷. Výsledky této studie však nevyhnutelně vedly k syntéze a testování řady derivátů. Jeden z prvních pozitivních výsledků přinesl derivát kyseliny betulinové – RPR103611 (obr. 6, **19a**), který vykazoval mnohonásobně vyšší aktivitu vůči viru HIV (cit.⁴⁷). Významným derivátem s velmi silnou inhibiční aktivitou byl 3-*O*-(3,3-dimethylsukcinylderivat betulinové kyseliny, neboli bevirimat⁴⁸. Nicméně u dospívajících samčích krys byla zjištěna toxicita vůči dopaminergním a serotoninergním nervovým zakončením, za současného podání bevirimatu a metamfetaminu. Vzhledem k tomu, že významné procento nakažených virem HIV je také drogově závislých, může být vyvolaná neurotoxicita závažným problémem při aplikaci léčiva⁴⁹.

Většina léčiv určených pro antiretrovirální terapii (ART) působí několika různými mechanismy. Jedná se nejčastěji o inhibitory reverzní transkriptasy, proteasy, či integrasy⁵⁰. Současná kombinovaná ART nedokáže kompletně zastavit infekci, pouze potlačuje její projev. Dlouhodobá terapie má tak za následek několik významných negativ vedoucích k selhání léčby jako např. chronická toxicita⁵¹, nutnost velmi dobré spolupráce pacienta⁵², a především se při dlouhodobém podávání jednoho typu léčiva zvyšuje riziko vzniku rezistentních kmenů⁵³. Současným trendem je tak hledání nových látek, jejichž mechanismy jsou založeny na odlišném principu. RPR103611 zabraňuje tvorbě komplexu „virová částice – napadená buňka“, znemožňuje tak vstup infekčních částic viru HIV-1 do neinfikovaných buněk⁴⁷. Velmi brzy byla objevena rezistence kmenů s mutací v glykoproteinu gp41 virové obálky⁵⁴. Unikátní mechanismus blokády vstupu není v ART příliš běžný, a proto by mohlo být v kombinované léčbě dosaženo významného pokroku. Jiným příkladem je právě druhý jmenovaný derivát, bevirimat. Ten působí jako inhibitor dozrávání částic viru HIV-1 (maturační inhibitor)⁴⁸. Inhibice dozrávání virových částic se skutečně ukazuje jako kritický bod zásahu⁵⁵. Během fáze dozrávání virová proteasa opakovaně štěpí Gag polyprotein za současného uvolnění jednotlivých strukturních proteinů. Posledním krokem je štěpení p25 Gag (CA/SP1) na funkční p24 (CA) protein. Inhibicí posledního kroku vznikají virové částice s nesprávně vytvořenou maturní kapsidou, které nejsou schopny další infekce⁵⁶. Bevirimat postoupil do druhé fáze klinického testování^{57–59}. Během fáze II byla pozorována redukce viru pouze u 40–50 % pacientů. U zbylé části došlo ke vzniku rezistence přirozenou polymorfní variací v Gag polyproteinu. Další klinické studie tohoto léčiva byly zastaveny⁶⁰. Většina derivátů **BA**

je připravována a studována s vizí vývoje léčiva pro pacienty nakažených rizikovějším virem HIV-1. Některé deriváty **BA** byly též úspěšně testovány vůči méně rozšířenému a pomaleji postupujícímu kmenu viru HIV-2 (cit.⁶¹).

4. Deriváty

Vzhledem k výše zmíněným významným vlastnostem **BA** není žádným překvapením, že se jí začalo věnovat velké množství výzkumných skupin po celém světě. Předmětem jejich studií je jak zkoumání podrobného mechanismu účinku v jednotlivých případech aplikace, tak výzkum zabývající se přípravou a testováním nových derivátů. Největší překážkou v uvedení do klinické praxe je právě lipofilní charakter této látky. Za posledních několik desítek let byly připraveny stovky derivátů, které mnohdy vykazovaly lepší rozpustnost ve vodě. Nicméně s derivatizací se například vytratil sledovaný efekt, došlo k rychlému vzniku rezistence, či k dramatickému zvýšení toxicity vůči normálním buňkám. U protinádorových preparátů dochází často ke ztrátě inhibiční aktivity vůči některým typům tumoru, ale k významnému posílení účinku vůči jinému typu tumoru. U anti-HIV derivátů bylo pak nalezeno několik tzv. „vůdčích struktur“, neboli strukturních motivů **BA** pravděpodobně vedoucích k vytvoření účinného léčiva. Na základě pozorovaných vztahů mezi strukturou a aktivitou derivátů **BA** jsou neustále připravovány nové, účinnější látky proti HIV, rakovině, či malárii.

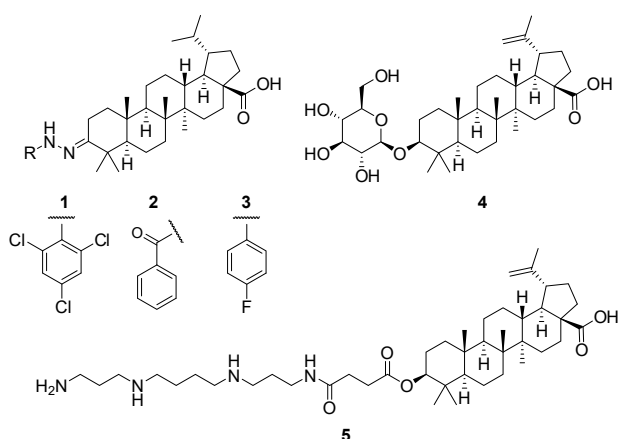
Nejčastěji se **BA** modifikuje v polohách C-3 a C-28. Při adici na dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C-20 a C-29 nedochází obvykle k výraznému posílení aktivity, naopak se aktivita často vytrácí. Tento poznatek platí obecně jak pro protinádorové, tak i pro anti-HIV účinky^{28,36,62}.

Zvýšené rozpustnosti nemusí být dosaženo jen zaváděním polárních funkčních skupin, ale také například přípravou farmaceuticky akceptovatelných solí⁶³, vytvořením inkluzního komplexu s vhodným nosičem, kterým může být například β-cykloextrin⁶⁴, či formulací do liposomu²⁹.

4.1. Protinádorové deriváty

4.1.1. C-3 deriváty

Kyslík vázaný v poloze C-3 (obr. 1) se zdá být esenciálním substituentem¹⁷. Oxidovaná forma **BA**, betulonová kyselina (obr. 2) je aktivnější například vůči melanomu⁶⁵. Na druhou stranu je i typickým případem, kdy dochází ke ztrátě aktivity například vůči rakovině prostaty či plic⁶². Acetylace hydroxylu v poloze C-3 nemá významnější vliv na změnu cytotoxicity³⁶, nicméně některé 3-*O*-acyl-deriváty s elektronegativními substituenty vykazují silné antiangiogenní účinky³⁹. Kyslíkový atom může být také nahrazen atomem dusíku (obr. 3). Například deriváty 3-hydrazono-20,29-dihydrobetulonové kyseliny (**1–3**) vykazují podstatně vyšší toxicitu vůči endotheliálnímu karcinomu plic³⁹. Z řady glykosylovaných derivátů byla největší pozornost věnována β-D-glukopyranosidu **BA** (**4**), který vykazoval dobrou rozpustnost a zvýšenou cytotoxicitu vůči rezistentním nádorovým buňkám^{66,67}. Za účelem zvý-



Obr. 3. Významné protinádorové C-3 deriváty

šení rozpustnosti byla aplikována strategie konjugace **BA** za vzniku tzv. proléčiva, které se v organismu enzymaticky rozštěpí. Příkladem mohou být C-3 konjugáty s rozvětvenými polyethylenglykolovými spojovacími můstky (PEGy), které jsou 250–750× rozpustnější ve vodě a zároveň dochází k zachování protinádorové aktivity⁶⁸. Jiným přístupem může být zavádění polyaminů. Sperminový C-3 derivát (**5**) vykazoval velmi dobrou cytotoxicitu například vůči buňkám rakoviny prsu. Analogický C-28 derivát **BA** byl toxický i na normální buňky⁶⁹. Tyto amfifilní molekuly jsou díky přítomnosti sperminového řetězce schopny utvářet zmiňované supramolekulární gely¹⁹.

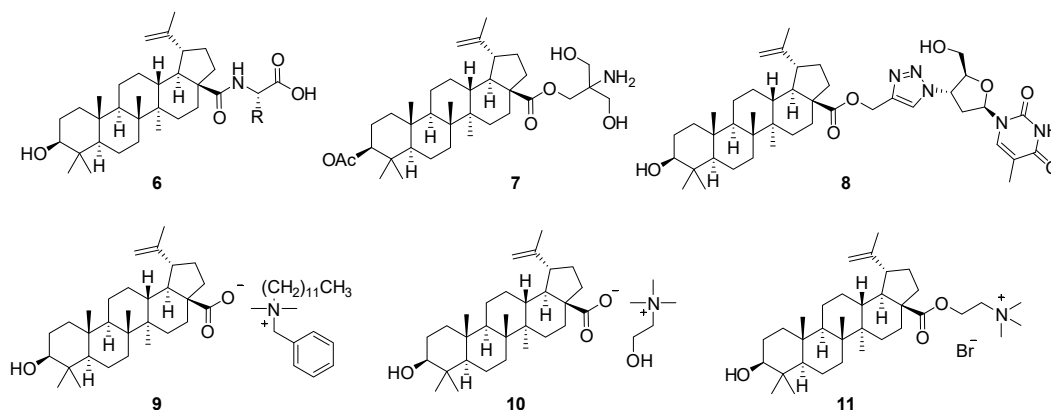
4.1.2. C-28 deriváty

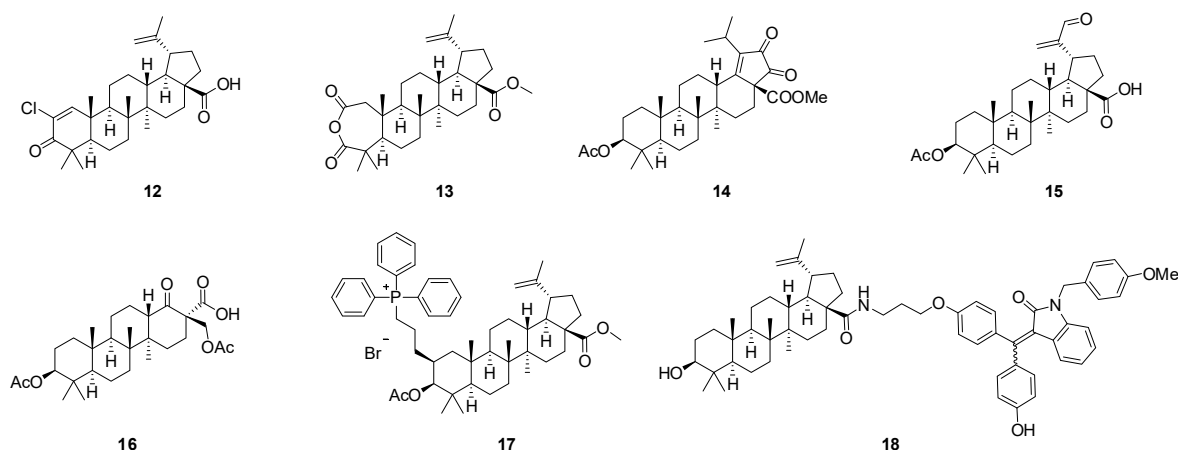
Při porovnávání oxidovaných forem betulinu, který sám o sobě nevykazuje příliš silné cytotoxické účinky, bylo zjištěno, že mezi vlastnostmi C-28 aldehydu a **BA** není příliš velký rozdíl^{70,71}. Tímto zjištěním byl vyvrácen původní předpoklad, že pro účinnost je nezbytná přítomnost karboxylové skupiny v poloze C-28 (obr. 1) a dále se předpokládá, že právě karbonylová skupina je esenciálním

farmakoforem. Nejčastější modifikací v této poloze je tvorba esterů, či amidů (obr. 4). Příprava amidů s aminokyselinami může zvyšovat rozpustnost ve vodě⁷² (**6**). Speciálním případem C-28 derivátů je látka NVX-207 (**7**), kdy při deacetylaci v poloze C-3 dochází ke ztrátě aktivity. Tato látka vykazuje velmi dobrou rozpustnost, selektivitu a též je cytotoxická vůči široké škále nádorových buněčných linií⁷³. Obdobně jako u C-3 derivátů byla navržena proléčiva modifikovaná v poloze C-28, jako např. 28-O-β-D-glukuronopyranosid **BA** (cit.⁷⁴). Azidothymidinový derivát **BA** (**8**) připravený „click“ reakcí vykazoval oproti **BA** téměř čtyřnásobnou účinnost vůči některým typům rakoviny.⁷⁵ Výhodou iontových sloučenin **BA** je minimální strukturní modifikace a výrazné zvýšení rozpustnosti. K „vysolování“ je možné použít látky, které jsou farmaceuticky akceptovatelné, netoxické, případně disponující aditivní biologickou aktivitou. Předpokládá se, že vzhledem k mírně kyselému prostředí v nádorových buňkách dochází po vstupu do buňky k obnovení původní struktury. Mezi látky, u kterých byla prokázána významná selektivní cytotoxicita, patří deriváty benzalkoniových a choliniových kationtů (**9–10**, obr. 3)⁷⁶. Tyto deriváty vykazují též velmi dobrou anti-HIV aktivitu skrze inhibici dimerizace proteasy, čímž se zásadně liší v mechanismu účinku od níže rozebíraných derivátů s anti-maturační aktivitou, působící na kapsidový protein⁷⁷. Na základě předpokladu dobré rozpustnosti iontových sloučenin byly dále připraveny účinné estery **BA** s ligandy obsahujícími kvartérní amoniou skupinu v molekule (**11**)⁷⁸.

4.1.3. Další deriváty s protinádorovou aktivitou

Rada studií se zabývá modifikacemi kruhu lupanového skeletu (obr. 5). Mezi látky, které stojí za pozornost, patří enony, odvozené od betulonové kyseliny s elektronegativním substituentem v poloze C-2 (obr. 1 a obr. 5), které vykazují až 59× vyšší cytotoxicitu než **BA** (**12**)⁷⁹. Seko-anhydridy vykazují významné posílení cytotoxicity vůči mnohým nádorovým buněčným liniím (**13**)⁸⁰. Studie zabývající se derivatizací kruhu E demonstruje potenciál „nové“ skupiny velmi účinných látek souhrnně označovaných jako betulininy (**14–16**). Rada z nich vyka-

Obr. 4. Významné protinádorové C-28 deriváty **BA**



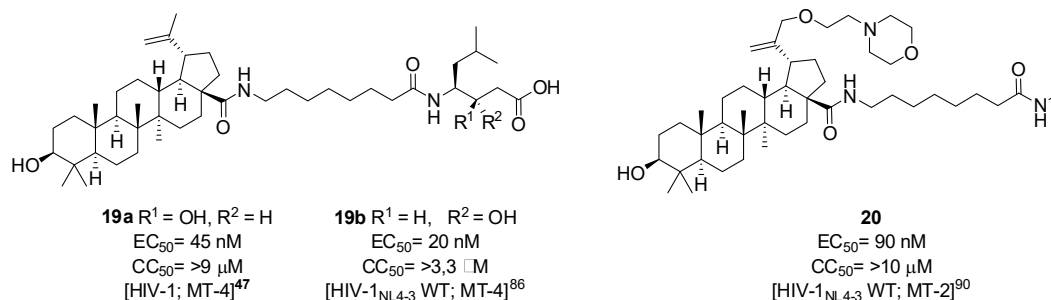
Obr. 5. Další protinádorové deriváty BA

zuje cytotoxicitu i proti rezistentním liniím nádorových buněk, ačkoliv nebyla prokázána jejich zvýšená solubilita ve vodných roztocích⁴¹. Byla připravena celá řada silně cytotoxických solí **BA** (34–40× účinnějších než **BA**), jež mají ve své struktuře vázaný trifenylylfosfoniový kation (reprezentativní příklad – látka **17**). Tyto sole byly navrženy na základě faktu, že kationový trifenylylfosfoniový zbytek ($R-PPh_3^+$) v molekulách je schopen cíleně transportovat biologicky aktivní látky do mitochondrií nádorových buněk⁸¹. Pro možné využití **BA** v radioterapii a pro sledování distribuce **BA** *in vivo* (případně diagnostice) byl připraven derivát značený ¹³¹I (molekulární struktura derivátu není v publikaci vyobrazena). Byla prokázána selektivní akumulace v nádorových buňkách. Iodovaný derivát by mohl najít uplatnění v radioterapii, zvláště při léčbě hepatocelulárního tumoru cílenou radionuklidovou brachyterapií⁸². Pro bližší porozumění účinku a detekci za současného vyvolání apoptózy byl syntetizován konjugát **BA-bis** (aryliden)indolu (**18**). Touto studií byla potvrzena selektivní buněčná lokalizace i cytotoxicita proti nádorovým buňkám v porovnání s doxorubicinem⁸³.

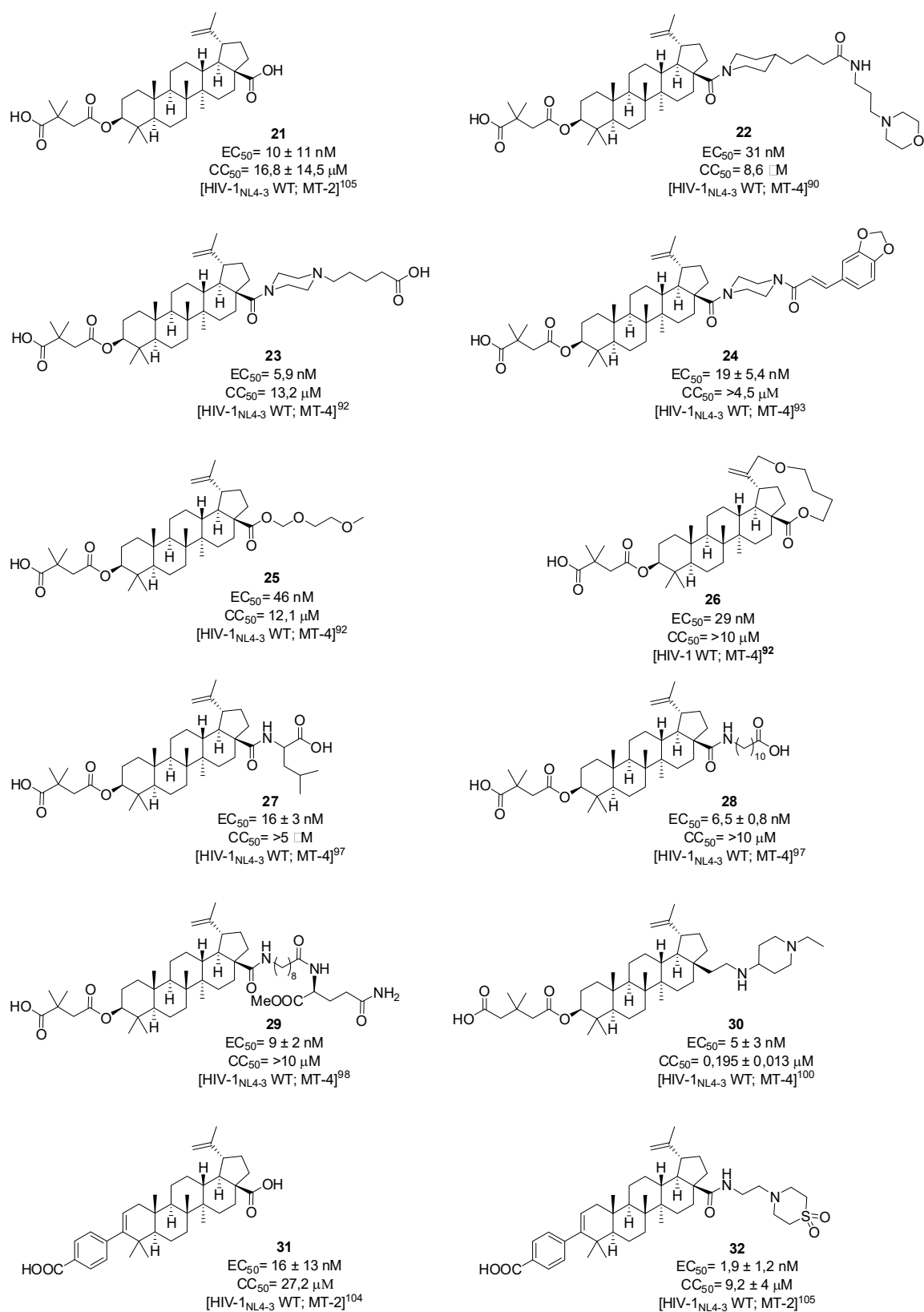
4.2. Anti-HIV deriváty

4.2.1. Deriváty zabraňující vstupu viru HIV-1 do buňky

Jak již bylo uvedeno výše, jedním z prvních derivátů **BA**, u kterého byla prokázána schopnost zabránit vytvoření komplexu „infekční částice viru HIV-1 a napadené buňky“ byl derivát γ -aminokyseliny ((3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanové kyseliny) RPR103611 (**19a**, obr. 6)⁴⁷ a jeho isomeru IC9564 (**19b**, obr. 6)⁸⁶. Látka **19b** na rozdíl od **19a** pravděpodobně zabraňuje vstupu viru do buněk vazbou na jinou část glykoproteinu virové obálky (gp120). V tomto případě, jako i v dalších, dochází k mutacím a vzniku rezistence (obr. 6)⁸⁴. Závěrem těchto studií bylo, že 3 β -hydroxyl je esenciálním substituentem pro tento mechanismus účinku. Malé změny ve struktuře **BA** na kruhu A jsou příčinou úplné ztráty účinku. 3 β -Hydroxylová skupina není vhodným místem chemických modifikací. Stejně tak je důležitá i amidová vazba v poloze C-28, nebo délka uhlovodíkového řetězce vázaného na karbonyl^{85,86}. Aktivita derivátu pak zůstává zachována i v případě, že je 3-hydroxyaminokyselinový zbytek nahrazen L-leucinem⁸⁷. Obdobnou aktivitu a lepší rozpustnost v porovnání s látkou **19b** vykazovala i látka **20** (obr. 6), která je navíc derivatizována v poloze C-29. Tato poloha se zdá být vhodným místem pro zavádění substituentů zvyšujících hydrofilitu, bez ztráty aktivity (obr. 6)⁸⁸.



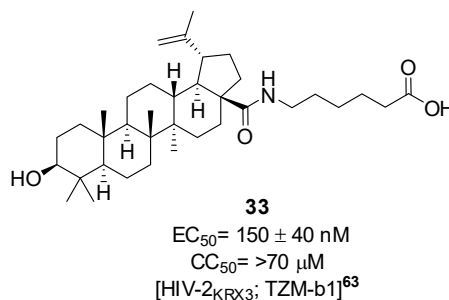
Obr. 6. Významné deriváty BA zabraňující vstupu HIV-1 do buňky



Obr. 7. Významné maturační inhibitory HIV-1

4.2.2. Maturační inhibitory HIV-1

Výše zmiňovaný C-3 ester **BA** s 2,2-dimethylsukcinanhydridem (**21**) se zdál být jedním z největších úspěchů v boji s infekcí virem HIV-1 (obr. 7)⁴⁸. Nicméně selhání léčby nakažených vedlo k zastavení klinických testů. Strukturní motiv bevirimatu (**21**) je ale nesporně vhodnou předlohou pro přípravu řady jiných látek, které by disponovaly lepšími farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi. Lepšího účinku pak bylo dosaženo u disubstituovaných isomerů, 3,28-di-*O*-(dimethylsukcinyl)betulinu⁸⁹. Vzhledem k zdanlivé nezaměnitelnosti substituentu v poloze C-3 bylo připraveno nepřeborné množství inhibitorů „druhé generace“ s modifikací v poloze C-28 (obr. 7). Některé dokážou překonat rezistenci viru oproti původní sloučenině. Z těchto C-28 derivátů pak největší aktivitu vykazovala látka **22**. Navázáním cyklického sekundárního aminu je navíc dosaženo vyšší metabolické stability⁸⁸. Významný byl objev tzv. „privilegované struktury“ (volně přeložený z angl. Privileged Structures), tj. substituovaných C-28 piperazinyamidů (**23**)⁹⁰. Následnou konjugací s další „privilegovanou strukturou“ odvozenou od skořicové kyseliny (**24**)⁹¹ bylo dosaženo ještě uspokojivějších výsledků. Pojem „privilegovaná struktura“ označuje motivy, často přítomné v přírodních látkách, které mají afinitu k širokému spektru receptorů a obecně zlepšují biodostupnost, biologickou aktivitu či metabolismus léčiva^{92,93}. Za zmínku stojí také dobře rozpustný methoxyethoxymethylový derivát (**25**)⁹⁰. Vliv konformace struktury na aktivitu byl zkoumán pomocí rigidních makrocyclických derivátů (**26**), které vykazovaly účinek obdobný **21**, nicméně žádný nebyl schopen překonat přirozeně se vyskytující mutaci⁹⁴. Derivatizací **21** v poloze C-28 se podařilo připravit i duálně aktivní konstrukty, látky LH15 (**27**), LH55 (**28**) a **29**, působící jednak jako maturační inhibitory, ale současně dokáží zabránit vstupu virové částice do buňky^{95,96}. Právě kombinací více mechanismů se dá obvykle nejlépe rezistence překonat. Na základě těchto poznatků byla také připravena řada aktivních látek odvozených od 3-*O*-(3,3-dimethylglutaryl)betulinové kyseliny⁹⁷, např. alkylaminoderivátů (**30**). Tyto látky překonávají přirozenou rezistenci vzniklou polymorfni variací v Gag polyproteinu⁹⁸. Byla také připravena série derivátů **21** substituovaných v různých pozicích fluorem. Fluor je pro svou vysokou elektronegativitu a malý atomový poloměr často inkorporován do nových struktur vyvíjených jako potenciální léčiva⁹⁹. Pouze při substituci v poloze C-29 došlo k zachování anti-HIV aktivity, což naznačuje, že tato pozice by mohla být dalším vhodným místem modifikace¹⁰⁰. Příprava jiných 3-*O*-acyl derivátů vedla většinou ke ztrátě sledované aktivity¹⁰¹, nicméně právě předpoklad zachování vzdálenosti mezi uhlíkem C-3 a karboxylovou skupinou vedl k úspěšné „cross-coupling“ syntéze dalšího aktivního C-3 derivátu s navázanou benzoovou kyselinou (**31**)¹⁰². Objevení látky **31** pak nevyhnutelně vedlo k syntéze dalších derivátů, z nichž BMS-955176 (**32**) vykazovala schopnost úspěšně překonávat rezistenci, která byla zásadní překážkou u původního **21**. BMS-955176 je také velmi dobře rozpustná, tudíž je, v zásadě, možné i její perorální podání¹⁰³.



Obr. 8. Příklad inhibitoru HIV-2

4.2.3. Deriváty s anti- HIV-2 aktivitou

Většina látek, které byly dosud připraveny, ale i látky, které jsou předmětem současných studií, vykazují selektivní aktivitu vůči viru HIV-1. Ačkoliv virus HIV-2 není v civilizovaných částech světa tolik rozšířen, jde o nevyhlášenou infekci, která vede k úmrtí pacienta. Vzhledem k tomu, že oba viry vykazují genetickou homologii pouze asi z 50 %, není žádným překvapením, že většina látek, které inhibují šíření jednoho typu, je vůči druhému typu neaktivní¹⁰⁴. Vzhledem k tomuto předpokladu vznikla série látek odvozená od RPR103611, která se lišila v délce alifatického uhlovodíku, který je vázán v poloze C-28. Bylo zjištěno, že molekula se zkráceným substituentem na řetězec o délce 5-ti uhlíků může vykazovat inhibiční aktivitu vůči viru HIV-2 (**33**, obr. 8)⁶¹.

5. Závěr

V případě hledání derivátů **BA** s anti-HIV aktivitou bylo v posledních letech učiněno mnoho zásadních pokroků vedoucích k nalezení několika vhodných kandidátů na nové léčivo. U protinádorových preparátů je pak situace poněkud komplikovanější, neboť existuje velké množství různých buněčných linií, které jsou jinak citlivé vůči rozdílným derivátům. Hledání ideálního kandidáta pro vývoj nového léčiva se tak zdá být mnohem obtížnější. Ačkoliv je **BA** intenzivně studována již od 90. let minulého století, nepodařilo se dosud připravit žádný dostatečně účinný a bezpečný derivát použitelný v klinické praxi, jež by mohl být uveden na trh jako registrované léčivo.

Tento přehledový článek vznikl z podpory interního grantu z rozpočtu na realizaci aktivit Institucionálního plánu VŠCHT Praha v roce 2020 a institucionálního grantu MŠMT A1_FPBT_2020_004.

LITERATURA

1. Jager S., Winkler K., Pfüller U., Scheffler A.: *Planta Med.* 73, 157 (2007).
2. Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 65, 1407 (1976).
3. Sheth K., Jolad S., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* 61, 1819 (1972).

4. Schuhly W., Heilmann J., Calis I., Sticher O.: *Planta Med.* **65**, 740 (1999).
5. Chang C. W., Wu T. S., Hsieh Y. S., Kuo S. C., Chao P. D.: *J. Nat. Prod.* **62**, 327 (1999).
6. Kim D. S. H. L., Chen Z., Nguyen v. T., Pezzuto J. M., Qiu S., Lu Z.-Z.: *Synth. Commun.* **27**, 1607 (1997).
7. Feng Y., Li M., Liu J., Xu T.-Y., Fang R.-S., Chen Q.-H., He G.-Q.: *Food Chem.* **136**, 73 (2013).
8. Hayek E. W. H., Jordis U., Moche, W. Sauter F.: *Phytochem.* **28**, 2229 (1989).
9. Lowitz J. T.: *Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehrere, Arzneygelahrtheit, Haushaltungskunst und Manufacturen* **2**, 321 (1788).
10. Pisha E. a 14 autorů: *Nature Med.* **1**, 1046 (1995).
11. Wachter G. A., Valcic S., Flagg M. L., Franzblau S. G., Montenegro G., Suarez E., Timmermann B. N.: *Phytomedicine* **6**, 341 (1999).
12. Bejar E., Amarquaye A., Che C., Malone M. H., Fong H. H.: *Int. J. Pharmacogn.* **33**, 25 (1995).
13. Bringmann G., Saeb W., Assi L. A., Francois G., Sankara Narayanan A. S., Peters K., Peters E. M.: *Planta Med.* **63**, 255 (1997).
14. Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: *Phytother. Res.* **13**, 115 (1999).
15. de Sa M. S. a 10 autorů: *Parasitol. Res.* **105**, 275 (2009).
16. Kim S. J., Quan H. Y., Jeong K. J., Kim D. Y., Kim G., Jo H. K., Chung S. H.: *J. Agricult. Food Chem.* **62**, 434 (2014).
17. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: *J. Nat. Prod.* **57**, 243 (1994).
18. Bag B. G., Dash S. S.: *Nanoscale* **3**, 4564 (2011).
19. Bildziukevich U., Kaletova E., Saman D., Sievanen E., Kolehmainen E. T., Slouf M., Wimmer Z.: *Steroids* **117**, 90 (2017).
20. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F.: *Cancer Lett.* **175**, 17 (2002).
21. Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1665 (1997).
22. Reiner T., Parrondo R., de Las Pozas A., Palenzuela D., Perez-Stable C.: *PloS one* **8**, e56234 (2013).
23. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K. M.: *Cancer Res.* **57**, 4956 (1997).
24. Liu W. K., Ho J. C., Cheung F. W., Liu B. P., Ye W. C., Che C. T.: *Eur. J. Pharmacol.* **498**, 71 (2004).
25. Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E., Debatin K. M.: *J. Biol. Chem.* **273**, 33942 (1998).
26. Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kanderfer-Szerszen M.: *Toxicology* **280**, 152 (2011).
27. Fulda S., Jeremias I., Steiner H. H., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* **82**, 435 (1999).
28. Chowdhury A. R., Mandal S., Mittra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K.: *Med. Sci. Monit.* **8**, Br254 (2002).
29. Mullauer F. B., van Bloois L., Daalhuisen J. B., Ten Brink M. S., Storm G., Medema J. P., Schiffelers R. M., Kessler J. H.: *Anti-Cancer Drugs* **22**, 223 (2011).
30. Takada Y., Aggarwal B. B.: *J. Immunol.* **171**, 3278 (2003).
31. Kasperczyk H., La Ferla-Bruhl K., Westhoff M. A., Behrend L., Zwacka R. M., Debatin K. M., Fulda S.: *Oncogene* **24**, 6945 (2005).
32. Melzig M. F., Bormann H.: *Planta Med.* **64**, 655 (1998).
33. Kwon H. J., Shim J. S., Kim J. H., Cho H. Y., Yum Y. N., Kim S. H., Yu J.: *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 417 (2002).
34. Yang L. J., Chen Y., Ma Q., Fang J., He J., Cheng Y. Q., Wu Q.-L.: *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 66 (2010).
35. Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1306 (1999).
36. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2405 (2001).
37. Deng Y., Snyder J. K.: *J. Org. Chem.* **67**, 2864 (2002).
38. Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E.: *Head Neck* **25**, 732 (2003).
39. Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran P., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2181 (2004).
40. Gao Y., Jia Z., Kong X., Li Q., Chang D. Z., Wei D., Le X., Suyun H., Huang S., Wang L., Xie K.: *Cancer Res.* **71**, 5182 (2011).
41. Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janost'akova A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdich M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
42. Yamai H. a 10 autorů: *Int. J. Cancer* **125**, 952 (2009).
43. Selzer E., Pimentel E., Wacheck V., Schlegel W., Pehamberger H., Jansen B., Kodym R.: *J. Invest. Dermatol.* **114**, 935 (2000).
44. Bache M. a 10 autorů: *Radiat. Oncol.* **6**, 111 (2011).
45. Sawada N., Kataoka K., Kondo K., Arimochi H., Fujino H., Takahashi Y., Miyoshi T., Kuwahara T., Monden Y., Ohnishi Y.: *Br. J. Cancer* **90**, 1672 (2004).
46. Jung G. R., Kim K. J., Choi C. H., Lee T. B., Han S. I., Han H. K., Lim S. C.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101**, 277 (2007).
47. Mayaux J. F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Henin Y., Dereu N., Evers M., Soler F., Poujade C., De Clercq E.: *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3564 (1994).
48. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **39**, 1016 (1996).
49. Killinger B., Shah M., Moszczynska A.: *J. Neurochem.* **128**, 764 (2014).
50. Pau A. K., George J. M.: *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**, 371 (2014).
51. Dau B., Holodniy M.: *Drugs* **69**, 31 (2009).

52. Paterson D. L., Swindells S., Mohr J., Brester M., Vergis E. N., Squier C., Wagener M., M. Singh N.: *Ann. Intern. Med.* **133**, 21 (2000).
53. Wainberg M. A., Zaharatos G. J., Brenner B. G.: *N. Engl. J. Med.* **365**, 637 (2011).
54. Labrosse B., Pleskoff O., Sol N., Jones C., Henin Y., Alizon M.: *J. Virol.* **71**, 8230 (1997).
55. Blair W. S. a 12 autorů: *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5080 (2009).
56. Sundquist W. I., Krausslich H. G.: *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2**, a006924 (2012).
57. Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin D. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3574 (2007).
58. Martin D. E., Blum R., Doto J., Galbraith H., Ballow C.: *Clin. Pharmacokinet.* **46**, 589 (2007).
59. Martin D. E., Blum R., Wilton J., Doto J., Galbraith H., Burgess G. L., Smith P. C., Ballow C.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3063 (2007).
60. Margot N. A., Gibbs C. S., Miller M. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2345 (2010).
61. Dang Z., Lai W., Qian K., Ho P., Lee K. H., Chen C. H., Huang L.: *J. Med. Chem.* **52**, 7887 (2009).
62. Mukherjee R., Jaggi M., Siddiqui M. J., Srivastava S. K., Rajendran P., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 4087 (2004).
63. Reddy B. P., Sharma V. M., Reddy K. R., Reddy M. M.: *US20110218204 A1* (2011).
64. Sun Y. F., Song C. K., Viernstein H., Unger F., Liang Z. S.: *Food Chem.* **138**, 1998 (2013).
65. Kim D. S., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1707 (1998).
66. Kommera H., Kaluderovic G. N., Bette M., Kalbitz J., Fuchs P., Fulda S., Mier W., Paschke R.: *Chem. Biol. Interact.* **185**, 128 (2010).
67. Gonzalez P., Mader I., Tchoghandjian A., Enzenmuller S., Cristofanon S., Basit F., Debatin K. M., Fulda S.: *Cell Death Differ.* **19**, 1337 (2012).
68. Dai L., Li D., Cheng J., Liu J., Deng L.-H., Wang L.-Y., Lei J.-D., He J.: *Polym. Chem.* **5**, 5775 (2014).
69. Bildziukevich U., Vida N., Rarova L., Kolar M., Saman D., Havlicek L., Drasar P., Wimmer Z.: *Steroids* **100**, 27 (2015).
70. Hata K., Hori K., Takahashi S.: *J. Nat. Prod.* **65**, 645 (2002).
71. Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S.: *Toxicol. Lett.* **143**, 1 (2003).
72. Jeong H. J., Chai H. B., Park S. Y., Kim D. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1201 (1999).
73. Willmann M., Wacheck V., Buckley J., Nagy K., Thalhammer J., Paschke R., Triche T., Jansen B., Selzer E.: *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 384 (2009).
74. Gauthier C., Legault J., Rondeau S., Pichette A.: *Tetrahedron Lett.* **50**, 988 (2009).
75. Dang Thi T. A., Kim Tuyet N. T., Pham The C., Thanh Nguyen H., Ba Thi C., Doan Duy T., D'Hoo-ghe M., Van Nguyen T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 5190 (2014).
76. Suresh C., Zhao H., Gumbs A., Chetty C. S., Bose H. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1734 (2012).
77. Zhao H., Holmes S. S., Baker G. A., Challa S., Bose H. S., Song Z.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **27**, 715 (2012).
78. Biedermann D., Eigenerova B., Hajdich M., Sarek J.: *Synthesis* **2010**, 3839 (2010).
79. You Y. J., Kim Y., Nam N. H., Ahn B. Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3137 (2003).
80. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajdich M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1100 (2004).
81. Spivak A. Y. a 11 autorů: *Russ. Chem. Bull.* **62**, 188 (2013).
82. Xu Y.-P., Yang M., Pan D.-H., Wang L.-Z.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **288**, 157 (2011).
83. Pal A., Ganguly A., Chowdhuri S., Yousuf M., Ghosh A., Barui A. K., Kotcherlakota R., Adhikari S., Banerjee R.: *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 612 (2015).
84. Holz-Smith S. L., Sun I. C., Jin L., Matthews T. J., Lee K. H., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 60 (2001).
85. Evers M. a 15 autorů: *J. Med. Chem.* **39**, 1056 (1996).
86. Soler F. a 11 autorů: *J. Med. Chem.* **39**, 1069 (1996).
87. Sun I. C., Chen C. H., Kashiwada Y., Wu J. H., Wang H. K., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **45**, 4271 (2002).
88. Qian K., Yu D., Chen C.-H., Huang L., Morris-Natschke S. L., Nitz T. J., Salzwedel K., Reddick M., Allaway G. P., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* **52**, 3248 (2009).
89. Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L. M., Fowke K., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 183 (2001).
90. Qian K., Bori I. D., Chen C.-H., Huang L., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* **55**, 8128 (2012).
91. Zhao Y., Gu Q., Morris-Natschke S. L., Chen C. H., Lee K. H.: *J. Med. Chem.* **59**, 9262 (2016).
92. Horton D. A., Bourne G. T., Smythe M. L.: *Chem. Rev.* **103**, 893 (2003).
93. Evans B. E. a 16 autorů: *J. Med. Chem.* **31**, 2235 (1988).
94. Tang J. a 20 autorů: *Open Med. Chem. J.* **8**, 23 (2014).
95. Huang L., Yuan X., Aiken C., Chen C. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 663 (2004).
96. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K. H., Huang L., Chen C. H.: *J. Med. Chem.* **56**, 2029 (2013).
97. Hashimoto F., Kashiwada Y., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 2133 (1997).
98. Urano E., Ablan S. D., Mandt R., Pauly G. T., Sigano D. M., Schneider J. P., Martin D. E., Nitz T. J., Wild C. T., Freed E. O.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 190 (2015).
99. Gillis E. P., Eastman K. J., Hill M. D., Donnelly D. J., Meanwell N. A.: *J. Med. Chem.* **58**, 8315 (2015).
100. Li J., Goto M., Yang X., Morris-Natschke S. L., Huang L., Chen C. H., Lee K. H.: *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett. 26, 68 (2016).
101. Qian K., Kuo R. Y., Chen C. H., Huang L., Morris-Natschke S. L. Lee K. H.: J. Med. Chem. 53, 3133 (2010).
102. Liu Z. a 16 autorů: Bioorg. Med. Chem. 24, 1757 (2016).
103. Regueiro-Ren A. a 27 autorů: ACS Med. Chem. Lett. 7, 568 (2016).
104. Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. Alizon M.: Nature 326, 662 (1987).

D. Kodr^a, M. Rumlová^b, T. Zimmermann^a, P. Džubák^c, P. Drašar^a, and M. Jurášek^a (^a*Dpt of Chemistry of Natural Compounds*, ^b*Dpt of Biotechnology*; *University of Chemistry and Technology Prague*, ^c*Palacky University Olomouc*): **Anticancer and Anti-HIV Derivatives of Betulinic Acid**

Betulinic acid and its derivatives modifying its physicochemical and biological properties contain a promising pharmacophore, which, so far only experimentally, are used as a structural basis for substances that function as antitumor and anti-HIV-1 and -2 agents. An overview of derivatives, classified according both structural characteristics and the type of the effect, is given. Although betulinic acid has been extensively studied since the 1990s, it has not yet been possible to prepare any sufficiently effective and safe derivative useful in clinical practice that could be marketed as a registered drug.

Full text English translation available in the on-line version.

Keywords: betulinic acid, anti-HIV-1, anti-HIV-2, antitumor activity

VITELLOGENIN – BIOMARKER ENDOKRINNÍ DISRUPCE U RYB

ZUZANA KOUTKOVÁ, JANA BLAHOVÁ
a ZDEŇKA SVOBODOVÁ

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

KoutkovaZuzana@gmail.com

Došlo 16.7.19, přepracováno 4.5.20, přijato 12.5.20.

Klíčová slova: vodní prostředí, hormonální systém, xenoestrogenní látky

Obsah

1. Úvod
2. Endokrinní disrupce
3. Vitellogenin
4. Stanovení a využití vitellogeninu jako biochemického markeru
 - 4.1. Detekce vitellogeninu v laboratorních podmínkách
 - 4.2. Detekce vitellogeninu v terénních podmínkách
5. Závěr

1. Úvod

Látky ovlivňující hormonální systém (a jejich přítomnost ve vodním prostředí) jsou poslední dobou velmi diskutovaným tématem. Provádí se řada výzkumů za účelem sledování jejich výskytu v prostředí a sílí snahy o jejich degradaci a odstranění. V mnoha studiích byl prokázán jejich negativní vliv na vodní živočichy a o jejich účincích na lidský organismus se stále diskutuje. Abychom se mohli zaměřit na jejich odstranění z vodního prostředí, musíme být schopni tyto látky detegovat. Mnoho látek se ale ve vodě vyskytuje ve stopových koncentracích, a tak je jejich stanovení technicky náročné. Z těchto důvodů je posuzování jejich přítomnosti často založeno na využití biochemických markerů kontaminace.

2. Endokrinní disrupce

Kontaminanty životního prostředí, které mohou narušit funkci neuroendokrinního systému obratlovců, nazýváme endokrinní disruptory¹. Látky s uvedeným efektem

můžeme najít v řadě produktů, které se v minulosti intenzivně využívaly, nebo se užívají i nyní. Jedná se například o pesticidy (atrazin, organofosfáty, arzenik), ftaláty využívané ke změkčování plastů, dioxiny, kovy (Cu, Pb), zpomalovače hoření, glykolethery používané jako rozpouštědla (v barvách, čisticích prostředcích, kosmetických přípravcích, brzdových kapalinách) a mnoho dalších. V následujícím textu se zaměříme pouze na ty endokrinní disruptory, které vykazují xenoestrogenní účinek, tzn. že ovlivňují reprodukční systém napodobením vlivu estrogenů².

V oblasti humánní medicíny se dnes využívá odhadem asi 20 různých progestinů (jiným názvem gestagenů, progesteronů, progestagenů), které řadíme mezi endokrinní disruptory. Jedná se o látky, které mají široké spektrum použití. V kauzální medicíně se využívají například k léčbě děložních nádorů nebo při děložním krvácení³. V preventivní medicíně pak mají nezastupitelnou úlohu v orální antikoncepci. Například v roce 2017 bylo dle informací Státního ústavu pro kontrolu léčiv dodáno na trh v České republice více než 3,5 milionu balení léčiv řazených do skupiny „Pohlavní hormony a modulatory genitálního systému“⁴. Takto užitá léčiva se z organismu vylučují společně s močí a následně odchází do odpadních vod. Čistírny odpadních vod (ČOV) však často nemají natolik efektivní technologie, aby tyto látky z vody zcela odstranily. ČOV tedy opouští nedokonale vyčištěná voda, která následně kontaminuje různé složky vodního ekosystému (např. řeky a potoky). Zde dochází, za předpokladu většího průtoku, k jejímu dalšímu naředění. Pokud je ale průtok nízký, například během suchého letního období, jsou látky ve vodě ve vyšší koncentraci a mohou na vodní organismy působit s větší intenzitou⁵. Konkrétní proces probíhá pravděpodobně tak, že ačkoliv z těla tyto látky odcházejí v konjugované podobě, ve formě glukuronidů a sulfátů, v ČOV díky bakteriím v odpadním kalu dochází k jejich dekonjugaci, tedy aktivaci⁶. V roce 2018 provedli Šauer a spol.⁷ odběr vzorků odpadních vod v několika větších městech České republiky a analyzovali přítomnost estrogeně působících látek. Vzorky byly odebírány na přítoku vody do ČOV i na jejím odtoku. Na odtoku byla zjištěna koncentrace testovaných látek ve většině případů nižší, nikoli však nulová. Příkladem může být ČOV v Brně, kde ze všech 17 testovaných látek byla naměřena nejvyšší koncentrace u cypoteron acetátu, konkrétně v množství 12,0 ng l⁻¹ na přítoku a 0,5 ng l⁻¹ na odtoku⁷. Vzhledem k tomu, že ve vodním prostředí se látky tohoto typu vyskytují v různých kombinacích, je třeba brát toto v potaz při testování jednotlivých estrogeně působících látek. Ekpeghere a spol.⁸ stanovili na odtoku vody z ČOV hladiny estrogenů v rozmezí od hodnot pod hranici detekce (0,0001 ng l⁻¹) až po 0,05 ng l⁻¹, přičemž nejnižší účinnost ČOV byla zaznamenána u hladin estronu. Vzorky odebírali v letech 2009 a 2010 na řekách v Koreji⁸. Jejich výsled-

ky potvrdili i Ben a spol.⁹, kteří porovnávali koncentrace látek před a po průchodu vody ČOV v provincii Jiangsu ve východní Číně. Sledování těchto polutantů na přítoku a odtoku vody z ČOV prováděla i řada dalších autorů. V laboratorních podmínkách je často testován vliv jedné látky v různých koncentracích. Pokud jsou zaznamenány změny až při výrazně vyšších hodnotách, než je běžně se vyskytující koncentrace, neznamená to, že k uvedenému jevu nemůže v přírodě dojít. Ve vodním prostředí je řada látek a jejich metabolitů, z nichž některé mají vůči sobě agonistické nebo antagonistické účinky¹⁰.

3. Vitellogenin

Vitellogenin je hlavním prekurzorem žlutkového proteinu. Jedná se o molekulu fosfoglykolipoproteinu, která je syntetizována v játrech dospělých samic oviparních obratlovců, tedy ryb, plazů, obojživelníků a ptáků. V následujícím textu se ale zaměříme pouze na jeho výskyt u ryb. Za určitých podmínek může k syntéze vitellogeninu dojít i u samců a juvenilních samic. Jeho syntézu indukuje estrogen, jehož koncentrace jsou v krvi samců velmi nízké. Pokud jsou však ryby samčího pohlaví vystaveny působení xenoestrogenních látek, dochází k jeho syntéze i u nich. Z uvedeného důvodu se vitellogenin často využívá jako vhodný biomarker pro hodnocení přítomnosti estrogenních kontaminantů ve vodním prostředí^{1,5}.

Proces syntézy vitellogeninu probíhá na základě aktivity hypothalamo-hypofýzo-ovariální osy. Hypothalamus zajišťuje produkci gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH). Na tento proces má vliv mnoho endogenních a environmentálních faktorů. Mezi uvedené faktory patří vrozený biorytmus, výživový stav, sezónní změny fotoperiody a teploty a další. Jako odpověď na GnRH začne hypofýza uvolňovat folikuly stimulující hormon, který následně indukuje tvorbu 17 β -estradiolu a jeho uvolňování ze tkáně *theca follicula* ovariálních folikulů. 17 β -Estradiol vyvolá v játrech syntézu vitellogeninu a jeho následné uvolnění do krevního řečiště. Z krevního řečiště vitellogenin difunduje přes bazální membránu a mezibuněčný prostor mezi buňky zóny granulosa. Přes folikulární buňky se vitellogenin dostává do kontaktu s oolemou. Do oocyty pak vstupuje pomocí specifických receptorů, které se nacházejí na jeho membráně¹¹. Molekula vitellogeninu je v konečném důsledku rozložena proteolytickými enzymy¹² a poté zabudována do vaječného žloutku. Stejně tak jako lipovitellin, fosfatin a fosvetin slouží jako hlavní zdroj energie pro následný vývoj embrya¹³. Z důvodu usnadnění proteolýzy je celá molekula vitellogeninu poměrně nestabilní a náchylná ke štěpení proteasami. Z uvedeného důvodu je třeba při skladování a analýze vzorků využívat pro stabilizaci speciální inhibitory proteas¹².

4. Stanovení a využití vitellogeninu jako biochemického markeru

Přítomnost vitellogeninu ve tkáních samců a nedospělých jedinců ryb byla na základě mnoha výzkumů zvolena jako jedna z možností detekce přítomnosti endokrinních disruptorů ve vodním prostředí¹⁰. Vitellogenin je obvykle detegován v krevním séru, játrech, plazmě, celotělových homogenátech¹⁴ a povrchovém hlenu ryb²³.

K detekci vitellogeninu se využívá řada metod. Jednou z nejčastěji používaných je metoda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)¹⁵. Protože je molekula vitellogeninu specifická pro každý jednotlivý živočišný druh, je k jeho detekci touto metodou třeba přípravy specifických protilátek v závislosti na typu pokusných zvířat¹⁴. Z modifikací imunochemické metody ELISA se pak využívá např. přímá¹⁶, nepřímá kompetitivní¹⁷ a dále i sandwichová varianta¹². Další možností je využití molekulárně-biologických metod (např. PCR) pro detekci mRNA vitellogeninu¹⁵. Detekci endokrinních disruptorů lze také provádět přímou analýzou jednotlivých analytů v různých biotických a abiotických matricích vodního ekosystému. Pro uvedené analýzy se běžně využívají chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrofotometrií¹⁸. Mezi další parametry, které lze využít pro hodnocení negativních účinků xenoestrogenů v laboratorních podmínkách, řadíme např. posouzení poměru pohlaví v testovaných skupinách, biometrické změny (např. délka a váha ryb) a histologické vyšetření gonád. Můžeme sledovat i vliv na následné generace tak, jak to provedli Bhandari a spol.¹⁹. Ti během svého experimentu zkoumali vliv bisfenolu A (100 $\mu\text{g l}^{-1}$) a EE2 (0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$) na následující (F1, F2, F3 a F4) generace *Oryzias latipes*. Oplozená vajíčka byla po dobu sedmi dní vystavena uvedenému lázni. Výrazný pokles přežití embryí byl zaznamenán až u F3 a F4 generace ($P < 0,05$), což jasně poukazuje na negativní vliv těchto látek na následné generace¹⁹.

4.1. Detekce vitellogeninu v laboratorních podmínkách

V laboratorních podmínkách je, v porovnání s pokusy prováděnými v terénních podmínkách, mnohem jednodušší zajistit stálé prostředí a tím zaručit validní výsledky. Využitím vitellogeninu, jako biochemického markeru při hodnocení látek s estrogenním účinkem, se zabývala řada autorů^{17,20–24}.

Vitellogenin v krevní plazmě a celotělovém homogenátu detegovali u juvenilních stádií jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) v rámci experimentu Tyler a spol.²⁰. Pro zhodnocení výsledků bylo třeba nejdříve stanovit běžné hladiny vitellogeninu. K tomu byly využity vzorky plazmy jelečka velkohlavého jiných než později testovaných ryb. Ty byly rozděleny do skupin podle pohlaví a fáze pohlavního cyklu. U samců se množství vitellogeninu v krevní plazmě pohybovalo v rozmezí $25,0 \pm 6,0 \text{ ng ml}^{-1}$. U nedospělých samic se jednalo o hodnoty

$37,0 \pm 6,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, u samic dospělých pak byly hodnoty $182,0 \pm 2,6 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pro samotný průběh pokusu byly použity skupiny ryb s kombinovaným poměrem samců i samic z důvodu nemožnosti zajistit vyrovnané pohlaví u takto mladých jedinců. Tyto skupiny ryb byly po dobu 30 dní po vykolení vystaveny testované látce 17 β -estradiolu. Z konečných výsledků je zřejmé, že existuje statisticky významná závislost mezi koncentrací vitellogeninu a hladinou testované látky. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u pokusné skupiny vystavené 100 ng l^{-1} 17 β -estradiolu. V tomto případě byla koncentrace vitellogeninu v plazmě $12,0 \pm 2,2 \text{ ng ml}^{-1}$ a $15,1 \pm 3,3 \text{ ng ml}^{-1}$ v duplicitním tanku²⁰.

Další z často užívaných látek je 17 α -ethinylestradiol (EE2). Jeho vliv na indukci tvorby vitellogeninu u oviparních živočichů, konkrétně dánía pruhovaného (*Danio rerio*), prokázali Andersen a Holbech²¹. V rámci svého pokusu vystavili pokusné ryby v několika věkově oddělených skupinách (jikry, larvy a jedince do 60 dnů věku) koncentraci $15,4 \pm 1,4 \text{ ng l}^{-1}$ EE2. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu byla analyzována 30. den po vylíhnutí, přičemž pro analýzu byla použita metoda ELISA. V pokusné skupině byly prokázány významně rozdílné koncentrace v porovnání se skupinou kontrolní. Nejvyšších koncentrací vitellogeninu dosahovala skupina vystavená EE2 ve fázi embrya. K tomu mohlo dojít z důvodu kumulace lipofilního EE2 ve žloutkovém vaku, neboť takto uložený EE2 mohl později vyvolat zvýšenou indukci vitellogeninu. Skupina vystavená testované látce do období deseti a dvaceti dní věku vykazovala naopak nižší koncentrace vitellogeninu než ostatní skupiny. To mohlo být způsobeno tím, že před dvacátým dnem věku nemají tyto ryby ještě zcela vyvinuté jaterní enzymy. Histologickým vyšetřením gonád 60. den věku Andersen a Holbech²¹ detegovali případné změny vývoje pohlavních orgánů. Histologicky byl prokázán feminizační efekt této látky na diferenciaci samčích pohlavních orgánů. U jedinců vystavených EE2 v období 20–40 dní po vylíhnutí byl u 59 % samců zaznamenán výskyt oocytů ve tkáni varlat²¹.

Uvedené experimenty ukazují pouze vliv krátkodobého působení estrogenních látek na vodní živočichy. Jak ale budou reagovat ryby vystavené xenoestrogenním látkám o známé koncentraci po delší časové období, v rámci let, je v laboratorních podmínkách velmi obtížné zjistit. Kidd a spol.¹⁷ proto provedli pokus v experimentálním jezeře, které se nachází v severozápadním Ontariu v Kanadě. Celý experiment trval sedm let (1999–2005) a byl zaměřen na sledování chronického vlivu nízkých koncentrací EE2 na jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*). Během prv-

ních dvou let pokusu byly odebírány vzorky ryb pro stanovení hladin vitellogeninu před přidáním EE2. Během dalších tří let trvání experimentu byl EE2 v množství 5–6 ng l^{-1} pravidelně přidáván do jezera. Následující dva roky experimentu již EE2 do vody v jezeře přidáván nebyl. Pro získání kontrolních vzorků bylo vybráno nezatížené jezero ze stejné oblasti. K detekci vitellogeninu byly použity celotělové homogenáty pokusných ryb. V období před zahájením podávání EE2 byly hodnoty koncentrací vitellogeninu u samců do $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Ve vzorcích odebraných během období, ve kterém byl do vody přidáván EE2, byly u samců populace zaznamenány významně zvýšené hladiny vitellogeninu, které se pohybovaly od $2500 \mu\text{g g}^{-1}$ až po $12\,000 \mu\text{g g}^{-1}$. Během pokusu byly také odebrány vzorky jater pro analýzu množství mRNA vitellogeninu, které u jedinců vystavených EE2 bylo mnohonásobně vyšší. Tato skupina vykazovala množství exprimované mRNA vitellogeninu v rozmezí $0,4 \pm 0,6$ až $1,2 \pm 0,1$, zatímco u kontrolní skupiny zjištěné množství odpovídalo $< 0,1$ – $1,6$ % hodnot pokusné skupiny. Histologické vyšetření mimo jiné potvrdilo fibrózu a malformace tubulů testikulární tkáně u ryb vystavených účinkům EE2 (cit.¹⁷).

Ve vodním prostředí existuje nebezpečí kumulace vlivu více estrogenních látek a jejich možného synergického působení. Uvedenou problematikou se zabývali Žlábek a spol.²², kteří zkoumali účinek estrogenních a androgenních látek na stádía gonád, pohlavní diferenciaci a na indukci tvorby vitellogeninu u juvenilních stádií (stáří 5 měsíců) jelce tlouště (*Squalius cephalus*). Jedné skupině pokusných ryb byl v krmivu podáván 17 β -estradiol, druhé testosteron a třetí skupině kombinace těchto dvou látek (tab. I). Po třiceti dnech byl proveden odlov ryb a analýza hladin vitellogeninu v celotělových homogenátech. U skupiny ryb, která byla krmena krmivem obsahujícím 17 β -estradiol, se hladina vitellogeninu statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny. Nejvyšší produkce vitellogeninu byla zaznamenána u ryb, jejichž krmná směs obsahovala kombinaci 17 β -estradiolu a testosteronu. Testosteron tedy markantně zvýšil účinky estrogenu²².

Běžně se analýza hladiny vitellogeninu provádí z krve nebo tkání, které jsou získávány v rámci invazivního odběru, často s nutností usmrcení zvířete. Alternativou k těmto postupům je možnost analýzy hladiny vitellogeninu v povrchovém hlenu²³. Tato alternativa by mohla poskytnout možnost odběru většího množství vzorků a celkové zjednodušení odběru. Případné snížení stresových faktorů lze také považovat za pozitivní faktor. Maltais a Roy²³ provedli pokus, při kterém juvenilní stádía pakaprovce Hubbsova (*Moxostoma hubbis*) vystavili působení látek

Tabulka I
Indukce tvorby vitellogeninu u juvenilních stádií jelce tlouště

Testovaná látka	17 β -Estradiol	17 β -Estradiol + Testosteron	Testosteron	Kontrola
Množství testované látky v krmivu	20 mg kg^{-1}	20 mg kg^{-1} + 0,1 g kg^{-1}	0,1 g kg^{-1}	X
Koncentrace vitellogeninu po 30 dnech ($\mu\text{g g}^{-1}$)	7 $\pm$ 11	32 $\pm$ 28	0,4 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3

EE2 a nonylfenolu (NP) v různých koncentracích (EE2: 10 ng l⁻¹; NP: 1 µg l⁻¹, 10 µg l⁻¹, 50 µg l⁻¹) po dobu 21 dní a sledovali koncentraci vitellogeninu v krevní plazmě a povrchovém hlenu. Statistickou analýzou byla potvrzena statisticky vysoce významná pozitivní korelace ($P < 0,05$). Ke statisticky významnému zvýšení obsahu vitellogeninu ($P < 0,01$) došlo u ryb až při koncentraci 50 µg l⁻¹ NP (6500 µg ml⁻¹ plazmy; 3,1 µg mg⁻¹ proteinu v povrchovém hlenu). Pokusy s nižšími koncentracemi NP nevykazovaly statisticky významné zvýšení syntézy vitellogeninu (< 1000 µg ml⁻¹ plazmy; $< 0,5$ µg mg⁻¹ proteinu v povrchovém hlenu)²³.

U juvenilních stádií, 7–8 dní po vykulení, mořana japonského (*Pagrus major*) a okouníka načernalého (*Sebastus melanops*) byly prokázány statisticky významně zvýšené koncentrace vitellogeninu v plazmě při jejich vystavení NP v koncentraci 10 µg l⁻¹ a 50 µg l⁻¹ a 5 ng l⁻¹ estrogenu (E2) po dobu šedesáti dní ($P < 0,05$). V pokusné skupině se vyskytovali jak samci, tak samice. Koncentrace vitellogeninu byla analyzována v průběhu experimentu (30. den) a na jeho konci (60. den) (tab. II). Dále bylo prokázáno, že vystavení ryb exogennímu vlivu E2 statisticky významně zvýší ($P < 0,05$) indukci produkce vitellogeninu²⁴.

4.2. Detekce vitellogeninu v terénních podmínkách

Detekce vitellogeninu v krevní plazmě/séru a ve tkáních ryb v terénních podmínkách je důležitá z hlediska sledování estrogeně působících látek v životním prostředí. Analýza vzorků pro detekci vitellogeninu se ve světě běžně využívá a také na našem území byla provedena řada studií zabývajících se touto problematikou. Samotnou detekci vitellogeninu je vhodné kombinovat s chemickou analýzou konkrétní látky ve vodním prostředí. Mimo to jsou hodnoceny i další ukazatele – histologické vyšetření, poměr pohlaví, délka a váha ryb apod.

Jedna ze studií proběhla na řece Jihlavě, která je jedním z přítoků Dyje. Jako oblast pro odběr vzorků byl vymezen úsek mezi městy Třebíč a Ivančice. Studie proběhla v letech 1999–2002 a jako modelový organismus byla vybrána parma obecná (*Barbus barbus*). Odlov ryb probíhal během doby sledování třikrát. Prvním místem odběru

byl úsek řeky nad městem Ivančice, konkrétně v obci Hrubšice. Další místo odběru bylo situováno pod Třebíčí a poslední místo odběru pak bylo nad Třebíčí. V Třebíči se nachází ČOV, mezi Třebíčí a Ivančicemi vodní elektrárny Dalešice a Mohelno, v Dukovanech pak jaderná elektrárna. U odlovených ryb byly odebrány vzorky jater a gonád pro histologické vyšetření. Během studie bylo celkem odchyceno 993 kusů ryb, přičemž 47,5 % z nich byli samci. Feminizace byla zaznamenána u 6 odchycených jedinců. Histologické vyšetření gonád pak odhalilo, že frekvence feminizovaných samců je nižší u ryb odchycených v méně znečištěné vodě (v Hrubšicích), než ve vodě obsahující více polutantů (u Třebíče). Přítomnost polutantů ve vodě se stanovovala na základě jejich detekce ve tkáni ryb. Jednalo se o Hg, As, Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, polychlorované bifenylly (PCB), hexachlorbenzen (HCB) a dichlordifenyltrichlorethan (DDT) a jeho metabolity. Koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců byla výrazně nižší v méně znečištěné vodě v Hrubšicích (0–3,84 µg ml⁻¹) než ve vodě znečištěné (0,02–880,26 µg ml⁻¹). Autoři ve své studii uvádějí, že příčinou feminizace samců (celkově 2,8 %) mohlo být i souhrnné působení více faktorů, zahrnujících kromě xenoestrogenních látek ve vodním prostředí i přírodní a hydrologické podmínky (koncentrace ryb, teplota vody) a věk²⁵.

Králický potok, přítok Tiché Orlice, byl v minulosti využíván pro umělou reprodukci lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) a pstruha obecného potočního (*Salmo trutta fario*). Kolem roku 1990 byla v okolí města Králíky poprvé zaznamenána snížená reprodukce ryb, což vedlo k detailnějšímu sledování této oblasti. Jedním z pokusů zaměřených na tuto oblast bylo sledování koncentrace vitellogeninu v krvi ryb na řece Tichá Orlice, která je levostranným přítokem Labe. Jako indikátorový organismus byl vybrán pstruh obecný potoční (*Salmo trutta fario*). Vzorky krevní plazmy byly odebrány od ryb odlovených na dvou místech (obce Králíky a Lichkov) a jako kontrolní místo byla zvolena lokalita Červená Voda. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu byla detegována ve vzorcích z lokality Králíky (3–30 mg ml⁻¹). V lokalitě Lichkov byl vitellogenin detegován v množství do 0,01 mg ml⁻¹ a v Červené Vodě byla koncentrace vitellogeninu pod mezí detekce. Ze zjištěných výsledků bylo

Tabulka II

Hladiny vitellogeninu v plazmě (ng ml⁻¹) u mořana japonského a okouníka načernalého

	30. den		60. den	
	10 µg ml ⁻¹	50 µg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	50 µg ml ⁻¹
Koncentrace NP ^a				
Mořan japonský	≤ 2900	≤ 4000	≤ 3900	≤ 2900
Okouník načernalý	≤ 4000	≤ 3400	≤ 5000	≤ 4000
Koncentrace E2 ^b	0 ng l ⁻¹	5 ng l ⁻¹	0 ng l ⁻¹	5 ng l ⁻¹
Mořan japonský	≤ 1000	≤ 8500	≤ 1100	≤ 7000
Okouník načernalý	≤ 900	≤ 7000	≤ 800	≤ 8500

^a NP – nonylfenol, ^b E2 – estradiol

potvrzeno, že zvýšená koncentrace vitellogeninu v krvi samců může indikovat poruchy spermiogeneze a reprodukce^{26,27}.

Na řece Labi v roce 2008 provedli Randak a spol.²⁸ v rámci experimentu odběr vzorků ryb na třech místech toku řeky, a to v oblastech, ve kterých se předpokládalo větší znečištění. Sledovaným organismem byl jelec tloušť (*Squalius cephalus*). Ryby byly odloveny v okolí města Pardubice, Neratovice a Ústí nad Labem. Odlov se vždy prováděl nad a pod uvedenými lokalitami. Ve svalovině ryb byla provedena analýza vybraných perzistentních polutantů (Hg, PCB, DDT, HCH a dalších). Dále byly analyzovány vybrané biomarkery, mezi kterými byl i vitellogenin. Jako kontrolní lokalita bylo vybráno odběrové místo na řece Vltavě nad nádrží Lipno, kde byl předpoklad minimálního znečištění. Nejvyšší koncentraci vitellogeninu obsahovaly vzorky z ryb odlovených na řece Labi nad Ústím nad Labem. Naopak nejnižší koncentraci vitellogeninu obsahovaly vzorky odebrané pod městem Neratovice. Kromě detekce vitellogeninu provedli Randak a spol.²⁸ také histologické vyšetření gonád. U dvou samců ze čtyř odlovených pod Ústím nad Labem byly nalezeny patoanatomické anomálie. Ve tkáni varlat se nacházely perinukleární oocyty. Ve vzorcích z jiných lokalit podobné změny nebyly nalezeny. Během odlovu ryb pod Ústím nad Labem byli z necelých padesáti ryb pouze čtyři samci, z toho pohlavní orgány dvou z nich vykazovaly histologickou anomálii. Jak vyplývá z uvedeného, rozložení pohlaví v populaci jelce tlouště nebylo ani z daleka podobné přirozenému poměru 1:1. K tomuto úkazu mohlo dojít z několika důvodů. Samci mohou být na přítomnost endokrinních látek ve vodě mnohem citlivější, což mohlo ovlivnit pohlavní vývoj v raném stádiu ryb a zapříčinit vyšší procentuální zastoupení samic. Tento nepoměr mohla ale také zavinit migrace samic za potravou po směru toku řeky. Obecně lze říct, že vzorky odebrané pod městy ukazují vyšší kontaminaci než vzorky odebrané nad městskou aglomerací. V Neratovicích byly zaznamenány nejvyšší koncentrace PCB ve svalovině ryb, nad Ústím nad Labem nejvyšší koncentrace HCH a pod Ústím nad Labem pak nejvyšší koncentrace DDT v tukové tkáni. Nejvyšší koncentrace Hg ve svalovině byly zaznamenány u ryb odlovených v referenčním místě na Vltavě²⁸.

Na soutoku řek Svitavy a Svratky leží druhé největší město České republiky, Brno. Na těchto řekách byly odebrány vzorky ze 7 lokalit. Na řece Svitavě se na horním toku jednalo o lokalitu Bílovice nad Svitavou. Na řece Svratce to pak na horním toku byla lokalita Kníničky. Na dolním toku pod Brnem to byla místa před soutokem obou řek, dále pak lokality Modřice, Rajhradice a Židlochovice. Jako indikátorový organismus byl vybrán jelec tloušť (*Squalius cephalus*), detekce vitellogeninu byla prováděna z krevní plazmy samců. Nejvyšší hodnoty vitellogeninu byly naměřeny v Bílovicích nad Svitavou (medián 52,2 ng ml⁻¹) a v Modřicích (medián 14,7 ng ml⁻¹). Nejnižší pak v Kníničkách, v Židlochovicích a na řece Svratce před soutokem (medián 0,5 ng ml⁻¹). Bílovice nad Svitavou byly určeny jako kontrolní lokalita, předpokládalo se zde nejnižší znečištění. Mezi hypotézy odůvodňující vyso-

ké hodnoty vitellogeninu v oblasti Bílovice nad Svitavou patří možnost kontaminace zapříčiněná chemickou a strojírenskou firmou v nedalekém Adamově nebo vliv bakterií odpadního kalu ČOV přímo v Bílovicích nad Svitavou. Odlov ryb v lokalitě Modřice i Bílovice nad Svitavou byl proveden pod ČOV (cit.²⁹).

Významným problémem je také skutečnost, že některými většími aglomeracemi protékají vodní toky s nízkým průtokem, tudíž nedochází k dostatečnému naředění přítomných nežádoucích látek ve vodě. Touto problematikou se zabývala např. studie provedená na Libotýnském potoce, Černém potoce a řece Moravici. Na těchto vodních tocích Zelníčková a spol.³⁰ sledovali obsah kontaminantů ve vodním prostředí, konkrétně ve tkáních ryb. Odlov pstruha obecného potočního (*Salmo trutta m. fario*) proběhl v září roku 2012 vždy nad a pod ČOV, a to ve městech Vlachovo Březí, Bruntál a Břidličná. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců byla zjištěna u ryb odlovených na Libotýnském potoce (Vlachovo Březí). Na toku pod ČOV byly naměřeny hodnoty 5,4–2978,1 ng ml⁻¹ (cit.³⁰).

Jeden z velkých pokusů zaměřených na sledování znečištění vodních toků proběhl na řekách v České republice v roce 2007–2011 (cit.³¹). V rámci sledování byly odebrány vzorky pro analýzy ze samců jelce tlouště (*Squalius cephalus*) odlovených v závěrových profilech na 10 českých řekách (Berounka, Dyje, Labe, Lužnice, Odra, Ohře, Otava, Sázava, Svratka, Vltava). Nejnižší hodnoty vitellogeninu byly naměřeny u ryb odlovených v řekách Dyje, Labe, Ohře a Vltava. Naopak nejvyšší hodnoty v plazmě byly naměřeny u ryb odlovených na řece Svratce pod Brnem. Pouze 11 % samců jelce tlouště zde odlovených mělo v krevní plazmě hodnoty vitellogeninu pod mezí detekce použité metody³¹.

Problematika endokrinních disruptorů ve vodním prostředí je také intenzivně studována v zahraničí. V Kanadě byly v rámci pokusu v roce 2017 umístěny pokusné ryby v klecích, po dobu jednoho měsíce, do toku řeky North Saskatchewan u města Edmonton. Hlavním cílem studie bylo sledování vlivu musk sloučenin, syntetických analogů pyžma, galaxolidu a tonalidu na jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*). Mimo jiné autoři zkoumali u samců i syntézu vitellogeninu. Koncentrace sledovaných látek byly v uvedené řece natolik nízké, že nezpůsobily zvýšení syntézy vitellogeninu (nejvyšší zaznamenané hodnoty: galaxolid – 381,0 ng l⁻¹; tonalid – 21,6 ng l⁻¹)³².

Ve Spojených státech amerických, konkrétně na hranicích Arizony a Nevady, leží národní rekreační jezerní oblast (Lake Mead National Recreation Area). V letech 1999–2000 zde Jenkins a spol.³³ provedli sledování koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě kapra obecného (*Cyprinus carpio*), přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v zálivu Las Vegas. V listopadu 1999 byla zaznamenána hodnota 1504 µg ml⁻¹ a nejvyšší hodnota byla zaznamenána v květnu 2000 (68 074 µg ml⁻¹), jinak se hodnoty pohybovaly pod hranicí 200 µg ml⁻¹. V roce 2006 pak zjistili nejvyšší hladiny vitellogeninu (5192 µg ml⁻¹) v oblasti Willow Beach, kde byl zároveň zaznamenán nej-

vyšší výskyt PCB ($0,38 \mu\text{g g}^{-1}$), jehož možným zdrojem jsou transformátory v Hooverově přehradě³³.

V severozápadní oblasti Spojených států amerických na základě odběru vzorků z různých řek zjistili Iwanowicz a spol.³⁴ významně zvýšené hladiny vitellogeninu v krvi samců okounka pstruhového (*Micropterus salmonides*) odloveného na řece Ohio (Ohio River Island). Zároveň ale na této řece nebyl zaznamenán takový výskyt intersexualismu u samců (přítomnost oocytů ve tkáni varlat), jak by se mohlo očekávat vzhledem k naměřeným koncentracím vitellogeninu. V porovnání s ostatními řekami byl na řece Ohio výskyt intersexualismu poměrně nízký. Na řece Moosehorn zase pozorovali výraznou negativní korelaci vztahu hladiny vitellogeninu v plazmě a závažnosti patologických změn, kdežto na řece Assabet River naopak zjistili výraznou pozitivní korelaci sledovaných parametrů³⁴. Stejnou tematikou se zabývali i Geraudie a spol.³⁵, kteří odebírali vzorky z ryb ve francouzských řekách severozápadně od Paříže, konkrétně ze Seiny a jednoho z jejích přítoků, Epty. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevním séru samců plotice obecné (*Rutilus rutilus*) zaznamenali u města Poses (řeka Seina), a to $1225,0 \text{ ng ml}^{-1}$. Nižší hladiny, $435,0 \text{ ng ml}^{-1}$ a $156,0 \text{ ng ml}^{-1}$, pak zachytili u měst Gournay a Dampierre (řeka Epta). U samců ryb odlovených v oblasti Poses, Gournay a Dampierre byla histologickým vyšetřením gonád zjištěna přítomnost oocytů ve tkáni varlat, ale specifický vztah mezi hladinou vitellogeninu a histologickými změnami gonád nebyl potvrzen, jelikož samci ryb se známkami intersexualismu z oblastí Poses a Gournay vykazovali nižší koncentrace vitellogeninu než samci bez patologií odchycení ve stejných lokalitách³⁵.

5. Závěr

Význam vitellogeninu pro detekci hormonálních změn způsobených xenoestrogenními látkami u samců ryb v experimentálních a terénních podmínkách je nezastupitelný. Ve vodních tocích nalézáme samce ryb, u kterých je názorně vidět negativní vliv estrogenních látek na vývoj jejich pohlavních orgánů. Z českých toků, zmíněných v textu, byly nejvyšší hladiny vitellogeninu zjištěny v krevní plazmě ryb na řece Tichá Orlice a na Libotýňském potoce. Otázkou je, zda tomu je z toho důvodu, že se jedná o menší toky, které protékají řadou měst, nebo zda je zde ještě jiný důvod. Již proběhla řada výzkumů zaměřených na degradaci nebo odstranění reziduí estrogenů z vodního prostředí, ale zatím není znám způsob, jak tyto látky z vody jednoduše a kompletně odstranit.

Vypracováno s finanční podporou Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, projekt číslo 224/2019/FVHE.

Seznam použitých zkratk

ČOV	čistírna odpadních vod
E2	estradiol
EE2	17 α -ethinylestradiol

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GnRH	gonadotropin-uvolňující hormon
NP	nonylfenol
PCB	polychlorované bifenylly
HCB	hexachlorbenzen
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
HCH	hexachlorcyklohexan

LITERATURA

- Hiramatsu N., Matsubara T., Fujita T., Sullivan C. V., Hara A.: *Mar. Biol.* 149, 35 (2006).
- <https://www.ewg.org/research/dirty-dozen-list-endocrine-disruptors>, staženo 17. 6. 2019.
- Kumar V., Johnson A. C., Trubiroha A., Tůmová J., Ihara M., Grabic R., Kloas W., Tanaka H., Kroupová H. K.: *Environ. Sci. Technol.* 49, 2625 (2015).
- <http://www.sukl.cz/>, staženo 15. 1. 2019.
- Sumpter J. P.: *Toxicol. Lett.* 82–83, 737 (1995).
- Dascenzo G., Dicorcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R.: *Sci. Total Environ.* 302, 199 (2003).
- Šauer P., Stará A., Golovko O., Valentová O., Bořík A., Grabic R., Kroupová H. K.: *Water Res.* 137, 64 (2018).
- Ekpeghere K., Sim W.-J., Lee H.-J., Oh J.-E.: *Sci. Total Environ.* 640, 1015 (2018).
- Ben W., Zhu B., Yuan X., Zhang Y., Yang M., Qiang Z.: *Water Res.* 124, 244 (2017).
- Drastichová J., Šíroková Z., Žlábek V.: *Folia Vet.* 48, 14 (2004).
- Reading B. J., Sullivan C. V., Schilling J., v knize: *Reference Module in Life Sciences. Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment* (Farrell A. P., ed), 1. vyd. str. 635. Academic Press, Londýn 2011.
- Nilsen B. M., Berg K., Eidem J. K., Kristiansen S.-I., Brion F., Porcher J.-M., Goksøyr A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 621 (2004).
- Fenske M., van Aerle R., Brack S., Tyler C. R., Segner H.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 129, 217 (2001).
- Hansen P.-D., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M., Blaise C.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 17, 448 (1998).
- Crowther J., v knize: *Molecular Biomethods Handbook* (Walker J. M., Rapley R., ed.), 2. vyd., kap. 37, str. 657. Humana Press, Totowa 2008.
- Blazer V. S., Walsh H. L., Shaw C. H., Iwanowicz L. R., Braham R. P., Mazik P. M.: *Environ. Monit. Assess.* 190, 577 (2018).
- Kidd K. A., Blanchfield P. J., Mills K. H., Palace V. P., Evans R. E., Lazorchak J. M., Flick R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8897 (2007).
- Ortiz-Villanueva E., Jaumot J., Martínez R., Navarro-Martin L., Piña B., Tauler R.: *Sci. Total Environ.* 635, 156 (2018).
- Bhandari R. K., vom Saal F. S., Tillitt D. E.: *Sci. Rep.*

- 5, 9303 (2015).
20. Tyler C. R., van Aerle R., Hutchinson T. H., Maddix S., Trip H.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 337 (1999).
 21. Andersen L., Holbech H., Gessbo Å., Norrgren L., Petersen G. I.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 134, 365 (2003).
 22. Žlábek V., Randák T., Kolářová J., Svobodová Z., Kroupová H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 280 (2009).
 23. Maltais D., Roy R. L.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 168 (2014).
 24. Saravanan M., Nam S.-E., Eom H.-J., Lee D.-H., Rhee J.-S.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 216, 10 (2019).
 25. Peňáz M., Svobodová Z., Baruš V., Prokeš M., Drastichová J.: *J. Appl. Ichthyol.* 21, 420 (2005).
 26. Kolarova J., Svobodova Z., Zlabek V., Randak T., Hajslova J., Suchan P.: *Fresenius Environ. Bull.* 14, 1091 (2005).
 27. Havelková M., Svobodová Z., Kolářová J., Krijt J., Némethová D., Jarkovský J., Pospíšil R.: *Acta Vet. Brno* 77, 133 (2008).
 28. Randak T., Zlabek V., Pulkrabova J., Kolarova J., Kroupova H., Siroka Z., Velisek J., Svobodova Z., Hajslova J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 737 (2009).
 29. Blahová J. a 11 spoluautorů: *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 541 (2010).
 30. Zelníčková L., Blahová J., Maršálek P., Hostovský M., Ševčíková M., Dobšíková R., Šírká Z., Divišová L., Plhalová L., Svobodová Z.: *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 109 (2013).
 31. Burkina V. a 10 spoluautorů: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 92 (2018).
 32. Lefebvre C., Kimpe L. E., Metcalfe C. D., Trudeau V. L., Blais J. M.: *Environ. Pollut.* 231, 1593 (2017).
 33. Jenkins J. A., Rosen M. R., Draugelis-Dale R. O., Echols K. R., Torres L., Wieser C. M., Kersten C. A., Goodbred S. L.: *Environ. Res.* 163, 149 (2018).
 34. Iwanowicz L. R. a 15 spoluautorů: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 50 (2016).
 35. Geraudie P., Gerbron M., Minier C.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 211, 29 (2017).

Z. Koutková, J. Blahová, and Z. Svobodová
(Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno):
Vitellogenin – Biomarker of Endocrine Disruption in Fish

Vitellogenin is one of biomarkers in aquatic environment which is widely used for laboratory testing of the influence of estrogens, especially on the function of fish genitals. While normal concentration of vitellogenin is very low in wild male fish, their exposure to water containing endocrine disruptors causes rapid increase of vitellogenin. Vitellogenin can cause fertility disorders, such as feminization of male fish or histopathology changes of gonads, which could lead to suppression of reproduction of fish and therefore it could result in a reduction of the fish population.

Keywords: aquatic environment, hormonal system, xeno-estrogenic substances

AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Babica, Jan	147	Prokeš, Marián	87
Babulicová, Mária	30	Ragač, Ondrej	140
Balažová, Andrea	35, 153	Rumlová, Michaela	164
Bauerová, Katarína	153	Sabadková, Dana	23
Bedlovičová, Zdenka	1	Sihelská, Zuzana	64
Bezáčková, Lýdia	35, 153	Sobeková, Anna	43
Blahová, Jana	174	Staňková, Barbora	94
Böhmová, Ema	64	Süli, Judit	43
Bujdošová, Zuzana	43	Svobodová, Zdeňka	174
Cviner, Petr	7	Šída, Pavel	57
Čonková, Eva	64	Šípková, Jana	57
De Feo, Vincenzo	140	Šlouf, Miroslav	80
Drašar, Pavel	164	Štícha, Martin	147
Džubák, Petr	164	Tomášová, Petra	94
Fajtová, Pavla	134	Ungvarská Maľučká, Lucia	1
Fedorová, Monika	87	Vašíčková, Pavla	147
Fialová, Lenka	109	Vašková, Janka	140
Flegel, Martin	123	Vecka, Marek	94
Fojtíková, Lucie	13	Vetchý, David	23
Fojtíková, Štěpánka	94	Vrublevskaya, Maria	117
Franc, Aleš	23	Zelenka, Jaroslav	102
Gharwalová, Lucia	117	Zimmermann, Tomáš	164
Goldírová, Katarína	64	Žák, Aleš	94
Harčárová, Michaela	64		
Harvanová, Jarmila	1		
Holková, Ivana	35, 153		
Holubová, Barbora	13		
Horáčková, Šárka	18		
Horn, Martin	134		
Hrubý, Martin	70		
Hynie, Sixtus	57		
Jurášek, Michal	164		
Karovičová, Jolana	30		
Klenerová, Věra	57		
Kobetičová, Klára	160		
Kodr, David	164		
Kohajdová, Zlatica	30		
Kolouchová, Irena	7, 117		
Koutková, Zuzana	174		
Kozlík, Petr	147		
Kramáriková, Ivana	57		
Krejčíková, Sabina	80		
Kudláček, Karel	147		
Kuchař, Martin	13		
Kurhajec, Slavomír	23		
Kutová, Simona	94		
Lapčík, Lubomír	52		
Lauková, Michaela	30		
Li, Peng	52		
Loukotová, Lenka	70		
Marková, Adéla	117		
Mikuš, Peter	153		
Mikuš, Peter	35		
Mühlhansová, Andrea	18		
Mydlárová Blaščáková, Marta	140		
Nemcová, Radomíra	87		
Nesměrák, Karel	147		
Obložinský, Marek	153		
Ostafinska, Aleksandra	80		
Pádrová, Karolína	7		
Pařízek, Antonín	123		
Pistl, Juraj	87		
Pliska, Vladimír	123		
Plocková, Milada	18		
Poráčová, Janka	140		

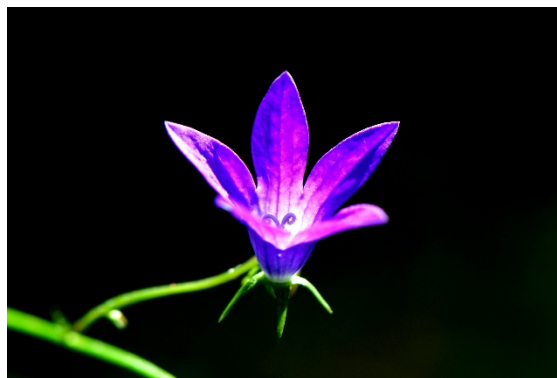


Foto Zdeněk Putz

