Cena mléka – a co bude dál?

„Cena mléka v posledních týdnech trhá rekordy“, četli jsme do konce roku téměř každý den v novinových titulcích a poslouchali z médií. Nákupní ceny za syrové mléko překročily ve 4. čtvrtletí v některých zemích unie dokonce i 50 ct za kg, v ČR se dostaly v prosinci v průměru již na rekordních 9,99 Kč l^{-1} a tento růst cen u nás pokračuje i v roce letošním. Farmáři se radují, že se jim „konečně vyplácí mléko vyrábět“, jeho zpracovatelé nejprve naladěni příznivým vývojem zahraničního obchodu z loňského 2. pololetí jsou náhle znepokojeni oprávněnými obavami, zda je možné při těchto navýšeních ještě realizovat odbyt výrobků na domácím trhu. Mnozí mlékaři se také strachovali, aby jim snad další cisternu mléka nepřetáhla a nepřeplatila konkurenční mlékárna v Německu. A jak to viděl spotřebitel? Ten byl zděšen zcela – jednak někdy z až katastrofálních informací dostávajících se mu z medií, ale především z reality, se kterou byl denně konfrontován v obchodě: „Ježíšímarjá“, kam až se ta cena mléka, másla či sýrů ještě došplhá? A co bude dál, až nám k tomu ještě zvýší „dépéháčko“ a zdraží energie.“ Na trhu s mlékem vládla nervozita, která sebou přinášela další a další zdražování. Otázkou bylo také, jak se takovýto vývoj odrazí ve spotřebě této zdraví prospěšné potraviny a jak také ovlivní celkovou ekonomiku v odvětví? Ano, taková byla a bohužel stále zůstává realita posledních dnů….

Za loňský vývoj na mléčném trhu byli často kritizováni analytici i politici, že jej nedokázali předvídat a lépe usměrnit. Byla však tato kritika namístě? Těžko říci, ale spíše ne. Faktorů, které trh s mlékem ovlivňovaly, byla totiž celá řada a v průběhu roku 2007 se naprosto nečekaně zkombinovalo působení hned několika z nich současně, což zřejmě nebylo možné předvídat ani v těch nejpesimističtějších scénářích. Jednotlivé příčiny překotného vývoje byly zmiňovány v médiích každodenně. Ať už to byl a je růst spotřeby mléka v rozvíjejících se civilizačních centrech (především Čína, Indie a jihozápadní Asie), kterému není schopen plně vyhovět světový trh, či nevyzpytatelné počasí v mnoha světových produkčních regionech (např. sucho ve Středozemí, ale i ve střední Evropě, ale především pak v mlékařských centrech Austrálie a Nového Zélandu) způsobující propad ve výrobě mléka. K tomu se dnes přidává rovněž stoupající spotřeba zemědělských komodit k technickým účelům na biopaliva ovlivňující dostupnost a cenový vývoj krmiv s nepřímým dopadem na ceny potravinových surovin. A pak zde jsou samozřejmě vlivy ekonomicko-politické, ať už rostoucí cena ropy, vývoj vzájemných kurzů hlavních světových měn a politická nestabilita v řadě oblastí světa. Doprovodným jevem všeho bývá i spekulativní jednání některých podnikatelů. To vše byla a je realita, se kterou se musíme vyrovnávat, lépe řečeno, se kterou se musí vyrovnat sám trh, aby se vždy navrátil do své rovnováhy.

Ale na lepší časy se přesto už blýská. Tak za prvé je zde fakt, že vývoj cen komoditních mlékárenských výrobků na světových trzích zaznamenává od konce minulého roku významný obrat. Ceny sušeného mléka a syrovátky poklesly o více než 50 % ze svých loňských cenových stropů. K poklesu cen se snaží vytvořit prostor i Evropská unie, která v polovině letošního března rozhodla o dalším uvolnění, resp. navýšení mléčných kvót, čímž vytvořila prostor ke zvýšení zatím ještě stále regulované produkci mléka v Evropě. Tento fakt může rovněž částečně ovlivnit vývoj cen. Ke změně přispěje určitě i letošní pozitivní změna počasí v Oceánii, které se po několika abnormálně suchých letech dostává do normálu, což umožňuje opětovné navýšení mléčné produkce. Trh s mlékem se tak zase pomalu stabilizuje, i když z pohledu cen je tato stabilita poněkud posunutá. Predikce holandské Rabobank specializující se na agrobusiness totiž hovoří jasně: průměrná evropská cena mléka pro příští rok bude o 10 centů vyšší než v roce 2006 a bude se pohybovat v rozmezí 38 až 40 centů. Současná nasycenost světového mléčného trhu však sráží predikovanou cenu ještě níže. V sousedním Německu byl zaznamenán meziměsíční pokles mezi prosincem a lednem 4,5 % a obdobné snížení se očekává ještě v příštích měsících. Mléko se zde začíná vykupovat za daleko nižší ceny, než se kterými jsme se setkávali ve 4. čtvrtletí roku 2007.

Mléko zůstane do budoucna citlivou komoditou a svým způsobem určitě i strategickou surovinou. Postupná westernizace životního stylu asijské společnosti doprovázená růstem spotřeby této základní potraviny to ještě potvrdí. V Asii se zvýší mléčná produkce, v Americe a Oceánii dojde určitě k jejímu oživení. Evropská unie je připravena přehodnotit svoji zemědělskou reformu, která měla své opodstatnění v době vzniku, současný vývoj však ukazuje, jak se moc nevyplácí zasahovat do přirozeně fungujícího trhu a do citlivě vyváženého poměru mezi nabídkou a poptávkou. Na jakékoliv ovlivňování a řízenou regulaci v konečném efektu doplácíme totiž my spotřebitelé a daňoví poplatníci.

Jen se obávám jednoho. My v Čechách si totiž často tak trochu „sedíme na vedení“. Růst nákupních cen započal v západní Evropě loni již koncem 1. pololetí, ale k nám se dostavil teprve v průběhu září. A zatímco v prvních třech měsících letošního roku farmářská cena mléka u nás stále ještě roste (současný průměr je 10,04 Kč l^{-1}, přičemž některé mlékárny platí cenu ještě vyšší), v okolních zemích jsou vysoké ceny mléka již minulostí. Kéž bychom i my na tento zvrat nemuseli čekat zase tak dlouho. Přineslo by to uklidnění, rychlejší stabilizaci trhu a zabránilo by se spekulativním jednání všech těch, kteří chtějí z takovéhoto vývoje vytěžit co nejvíce a za každou cenu. A v současné době by to velmi prospělo hlavně mlékárnám, které se vzhledem k silnému tlaku maloobchodu na snižování cen při současných vysokých cenách placeným zemědělcům dostávají do červených čísel. A prospělo by to určitě nám všem, tedy spotřebitelům.

Jiří Kopáček
Českomoravský svaz mlékárenský

Chem. Listy *102*, 314–318 (2008) Referát

TVORBA FIBRINU A JEHO DEGRADACE

ROMAN KOTLÍN a JAN E. DYR

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2
kotlinr@centrum.cz

Došlo 11.10.07, přijato 5.12.07.

Klíčová slova: fibrinogen, fibrin, koagulace krve

Obsah

1. Úvod
2. Přeměna fibrinogenu na fibrin
   2.1. Aktivace trombinu
   2.2. Odštěpování fibrinopeptidů
   2.3. Polymerace fibrinu
   2.4. Kovalentní stabilizace fibrinové sítě
3. Fibrinolýza
4. Patofyziologie fibrinogenu
5. Závěr

1. Úvod

Proces přeměny fibrinogenu na fibrin je důležitým fyziologickým dějem, který se účastní procesu hemostázy. Jedná se o složitý, vysoce regulovaný biochemický děj, jehož poruchy mohou vést k závažným život ohrožujícím stavům. V tomto článku se pokusíme shrnout dosavadní znalosti o přeměně fibrinogenu na fibrin, neboť aktualizovaný přehled ohledně tohoto procesu v české odborné literatuře stále chybí.

2. Přeměna fibrinogenu na fibrin

Trombinem katalyzovaná přeměna fibrinogenu na fibrinovou síť je společná všem dosud žijícím obratlovcům[1]. Proces přeměny fibrinogenu na fibrin lze rozdělit do několika kroků: aktivace trombinu, odštěpení fibrinopeptidů katalyzované trombinem, polymerace fibrinových monomerů, laterální asociace protofibril a kovalentní stabilizace fibrinového klotu.

2.1. Aktivace trombinu

Tělo si neustále udržuje rovnováhu mezi koagulací a degradací fibrinové sítě (fibrinolýzou). Ústřední úlohu zde hraje serinová proteasa α-trombin (dále jen trombin), která v krevním řečišti cirkuluje v inaktivní formě zvané protrombin. Trombin, jako jeden z klíčových koagulačních faktorů, poprvé popsal A. Buchanan v roce 1836 (cit.[2]) a později v roce 1845 (cit.[3]). Molekula protrombinu je sestavena z jednoho řetězce o molekulové hmotnosti 65,7 kDa, tvořeného 582 aminokyselinovými zbytky[4]. Působením serinové proteasy aktivovaného faktoru Xa (EC 3.4.21.6) dojde nejprve k hydrolytickému štěpení vazby mezi arginylem320 a isoleucylem321 a následně ke štěpení vazby za Arg271 (cit.[5]). Tím vznikne aktivní molekula trombinu, která je sestavena ze dvou polypeptidových řetězců – lehkého (36 aminokyselinových zbytků) a těžkého (259 aminokyselinových zbytků), které jsou kovalentně spojeny S-S vazbou mezi zbytky Cys293 a Cys439 (číslováno v sekvenci protrombinu). Trombin je schopen odštěpovat první aktivační peptid z molekuly protrombinu a tím zesiluje aktivaci dalších molekul trombinu[6].

Aktivní místo trombinu tvoří Ser195, His57 a Asp189, které jsou nezbytné pro neutrofilní atak cílové peptidové vazby[7]. V molekule trombinu nalézáme ještě další dvě důležitá místa. Jsou to elektropozitivní povrchové oblasti I a II (označované jako exosite I a exosite II), které specificky interagují se záporně nabitými částmi molekul substrátů (např. fibrinogenu) a kofaktorů. Oblast I je tvořena zbytky[8] Lys36, His71, Arg73, Arg75, Tyr76, Arg77 a Lys109/110. Oblast II je tvořena aminokyselinovými zbytky[9] Arg93, Lys236, Lys240, Arg101 a Arg233. Přes oblast I se uskutečňuje vazba thrombomodulinu, fibrinogenu nebo faktoru V, přes oblast II se váže heparin, fibrinogen, faktor V nebo GPIbα (cit.[7]). Dalším důležitým místem v molekule trombinu je Na^+ vazebné místo, kam se váže sodný ion, který alostericky reguluje aktivitu trombinu[9]. Pokud jsou ionty Na^+ navázány, trombin upřednostňuje prokoagulační substráty – fibrinogen, faktor V, faktor VIII nebo protein PAR1 (receptor 1 aktivovaný proteinasou)[9]. Pokud ionty Na^+ navázány nejsou, upřednostňuje trombin protein C jako substrát[9]. Dalšími důležitými oblastmi trombinu je γ-smyčka a 60-smyčka. 60-Smyčka je tvořena převážně prolinovými zbytky a pomocí hydrofobních interakcí podporuje vazbu substrátu v jeho *N*-koncové části[7]. γ-Smyčka je hydrofilní a interaguje s *C*-koncovými částmi substrátů[7].

Při poranění dochází k uvolnění tkáňového faktoru z endothelu poškozené cévní stěny[10]. Tkáňový faktor se následně váže na serinovou proteasu faktor VII (EC 3.4.21.21), která ve spolupráci s ionty Ca^{2+} a destičkovými fosfolipidy proteolyticky aktivuje faktor X (cit.[11]). Aktivovaný faktor Xa (EC 3.4.21.6) v kooperaci s faktorem Va, ionty Ca^{2+} a destičkovými fosfolipidy přeměňuje protrombin na trombin[12]. Generace trombinu vyvolá silnou pozitivní zpětnovazebnou reakci tím, že trombin aktivuje krevní destičky a faktory V a VIII kontaktní fáze koagulace[12].

Na membráně krevních destiček či endotheliálních buněk se aktivovaný faktor VIIIa váže na serinovou proteasu faktor IXa (EC 3.4.21.22), která aktivuje faktor X (cit.[13]). Aktivace faktoru X faktorem IXa je 50–100× rychlejší než aktivace faktorem VIIa (cit.[14]). Vznikající trombin dále aktivuje serinovou proteasu faktor XI (EC 3.4.21.27) (cit.[15]), přeměňuje fibrinogen na fibrin[16], aktivuje krevní destičky[12] a aktivuje faktor XIII (cit.[17]). Aktivovaný faktor XIa aktivuje faktor IX. Aktivovaný faktor XIIIa kovalentně stabilizuje vznikající fibrinovou síť.

Celý systém aktivace trombinu je přísně regulován. Nejdůležitějším inhibitorem trombinu je antitrombin III, který je schopen inhibovat všechny serinové proteasy koagulační kaskády[18]. Vazbou antitrombinu na trombin dojde k rozštěpení vazby za Arg393 antitrombinu a uvěznění trombinu v ireverzibilním komplexu[7]. Dalším inhibitorem koagulační kaskády je inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), který reverzibilně inhibuje faktor Xa a komplex VIIa-tkáňový faktor-Xa (cit.[19]). Vazba trombinu na trombomodulin umožňuje aktivaci serinové proteasy proteinu C (EC 3.4.21.69), jehož aktivní forma ve spolupráci s proteinem S a vitaminem K proteolyticky inaktivuje faktory Va a VIIIa (cit.[20]).

2.2. Odštěpování fibrinopeptidů

Trombin specificky štěpí peptidovou vazbu mezi argynylem a glycylem[21]. Ve fibrinogenu přednostně štěpí vazbu mezi Aα Arg16-Gly17 a Bβ Arg14-Gly15. Hexadekapeptid odštěpený z Aα řetězce nazýváme fibrinopeptid A a tetradekapeptid odštěpený z Bβ řetězce nazýváme fibrinopeptid B. Fibrinopeptidy tvoří méně než 2 % hmoty fibrinogenu[1]. Přednost štěpení právě těchto vazeb je dána konformačním uspořádáním fibrinopeptidů vystupujících z molekuly fibrinogenu do prostoru, jež skvěle zapadají do aktivního místa trombinu[21]. Ze sledování kinetiky odštěpování fibrinopeptidů bylo zjištěno, že uvolnění fibrinopeptidů B začíná až po uvolnění fibrinopeptidů A (cit.[22]). Během polymerace fibrinu však narůstá rychlost odštěpování fibrinopeptidů B až sedmkrát, což svědčí o tom, že fibrinopeptidy B jsou odštěpovány preferenčně z fibrinového polymeru díky konformační změně vyvolané polymerací, která podporuje odštěpování[23].

Předpokládá se, že odštěpení fibrinopeptidů A spouští tvorbu protofibril, a že odštěpení fibrinopeptidů B souvisí s laterální agregací[24]. Uvolněním fibrinopeptidů vzniká polymerační místo (hrbolek) A, resp. polymerační místo (hrbolek) B. Polymerační místa jsou tvořeny sekvencí Gly-Pro-Arg a Gly-His-Arg, které reagují s polymeračními místy (prohlubněmi) a a b, které jsou situovány v γC a βC doméně[25].

2.3. Polymerace fibrinu

Polymerace fibrinu začíná po odštěpení fibrinopeptidů A interakcí mezi polymeračním hrbolkem A a polymerační prohlubní a (cit.[26]). Polymerační hrbolky jsou situovány v centrální doméně, polymerační prohlubně jsou umístěny v koncových doménách. Specifické interakce mezi polymeračním hrbolkem „A“ a polymerační prohlubní „a“ komplementárními vazebnými místy dávají vzniknout agregátům, v nichž jsou fibrinové monomery posunuty o polovinu délky, neboť centrální doména jedné molekuly reaguje s koncovou doménou druhé[26]. Tím vzniká fibrinový dimer, na nějž se váží další molekuly fibrinového monomeru a vzniká dvojitě stočená protofibrila. Zároveň se utvářejí i vazby mezi koncovými doménami. Hlavními aminokyselinovými zbytky podílejícími se na vazbě jsou γArg275, γTyr280, γSer300 a γAsn308 (cit.[1]).

Jakmile protofibrily dosáhnou určité délky (600 až 800 nm) začnou laterálně agregovat a tvoří vlákna[27]. Během laterální agregace se uplatňují specifické intermolekulární interakce (mezi B:b polymeračními místy), které způsobují, že se struktura vlákna opakuje po 22,5 nm, což je možné pozorovat v elektronovém mikroskopu[28]. Laterální agregaci posiluje αC doména, která disociuje směrem od centrální domény po uvolnění fibrinopeptidů B (cit.[29]).

Příčný nárůst vláken je limitován, neboť vlákna jsou zkroucená. Při dosažení určitého průměru vlákna je energie potřebná pro natažení přidávané protofibrily vyšší než vazebná energie a nárůst vlákna se zastaví[1]. Vlákna se větví a vytvářejí síť připomínající svými vlastnostmi gel. Fibrinový gel obsahuje až 95 % kapaliny[1].

2.4. Kovalentní stabilizace fibrinové sítě

Vznikající fibrinová síť je stabilizována tvorbou kovalentních vazeb mezi jednotlivými molekulami fibrinogenu. Tvorbu kovalentních vazeb katalyzuje plasmatická transglutaminasa, aktivovaný faktor XIIIa (protein-glutamin γ-glutamyl transferasa, EC 2.3.2.13)[30]. Faktor XIII má molekulovou hmotnost 326 kDa, je přítomen v plasmě (10 μg ml^{-1}), krevních destičkách, monocytech a jejich prekurzorech v kostní dřeni[31].

Faktor XIII cirkuluje jako inaktivní zymogen tvořený dvěma páry různých polypeptidových řetězců označovaných A a B. Působením trombinu dojde k odštěpení aktivačních peptidů a vzniku allozymogenu FXIII’. V přítomnosti vápenatých iontů disociují dvě podjednotky B z molekuly faktoru XIII’ a vzniká aktivní faktor XIIIa (cit.[30]). Přítomnost fibrinu urychluje a napomáhá aktivaci faktoru XIII (cit.[32]).

Aktivovaný faktor XIIIa katalyzuje tvorbu vazeb mezi koncovými zbytky glutaminu a ε-aminoskupinou lysylu[33]. Nejprve vznikají kovalentní vazby mezi γ řetězci, poté mezi *C*-koncovými částmi α řetězců. Faktor XIII také kovalentně váže k fibrinu fibronektin, α2-antiplasmin či inhibitor aktivátoru plasminogenu 2 (cit.[34]). Kovalentní „stabilizace“ fibrinové sítě zvyšuje její odolnost vůči mechanickým vlivům a trombolytickým enzymům.

3. Fibrinolýza

Fibrinový gel zajišťuje po poranění a při hojení rány pouze dočasnou zátku, která je po využití efektivně odstraněna. Štěpit fibrin je schopno mnoho proteolytických enzymů a buněk. Nejvíce specifickým mechanismem degradace fibrinové zátky je však fibrinolýza.

Hlavní složkou fibrinolytického systému je glykoprotein plasminogen. Plasminogen, neaktivní forma serinové proteasy plasminu (EC 3.4.21.7), je syntetizován v játrech[35], cirkuluje v krvi v koncentraci 1–5 μmol l^{-1} s poločasem dva dny[36]. Je tvořen jedním řetězcem o hmotnosti 92 kDa, 791 aminokyselinovými zbytky a obsahuje 24 disulfidových vazeb[37]. Aktivní místo plasminu je tvořeno zbytky His602, Asp645 a Ser740 (cit.[38]). Ve struktuře plasminogenu nalézáme čtyři významné domény označované K1, K2, K3 a K4. Tyto domény jsou bohaté na lysyly, jsou tvořené velkými smyčkami stabilizovanými disulfidovými vazbami a zprostředkovávají vazbu na fibrin a povrchové receptory buněk[37]. Sacharidová složka plasminogenu reguluje afinitu k buněčným receptorům a hraje významnou roli při degradaci plasminu[36].

V krevním řečišti kolující forma plasminogenu (označovaná jako Glu plasminogen podle *N*-terminálního aminokyselinového zbytku) je limitovanou proteolýzou štěpením vazby mezi Lys77-Lys78 přeměňována na Lys plasminogen, který rychleji a efektivněji nasedá na fibrin a je 10–20× rychleji aktivován[39]. Tato forma se normálně nevyskytuje v cirkulaci, vzniká až před samotnou fibrinolýzou.

K aktivaci plasminogenu jsou zapotřebí aktivátory. Nejdůležitějším je glykoprotein, tkáňový aktivátor plasminu (tPA), což je serinová proteasa (EC 3.4.21.68) o hmotnosti 72 kDa, která je produkována a sekretována především endotheliálními buňkami s poločasem 5 min. Uvolňování tPA z endothelu je stimulováno např. trombinem, histaminem či adrenalinem, ale také tělesnou zátěží nebo stresem. Tkáňový aktivátor plasminu nasedá na fibrin a štěpí vazbu mezi Arg561-Val562 v plasminogenu vázaného na fibrin, vzniká plasmin, který štěpí fibrin. Plasmin štěpí vazbu Arg275-Ile276 v molekule tPA, čímž vzniká aktivnější dvouřetězcová forma a zesiluje se fibrinolýza[40].

Dalším aktivátorem plasminu je urokinasa (uPA), serinová proteasa (EC 3.4.21.73) o hmotnosti 54 kDa, která je produkována a sekretována především endotheliálními buňkami, makrofágy a některými nádorovými buňkami. Urokinasa štěpí vazbu mezi Arg561-Val562 v plasminogenu, vzniká plasmin, který štěpí fibrin. Plasmin a kallikrein štěpí vazbu Lys158-Ile159 v molekule uPA, čímž vzniká aktivnější dvouřetězcová forma. Urokinasa má mnohem nižší afinitu k fibrinu než tPA a je schopna aktivovat plasmin i v nepřítomnosti fibrinu[41].

Z dalších aktivátorů plasminu lze jmenovat kallikrein, aktivovaný faktor XIa, XIIa a membránovou metaloproteinasu MT1-MMP. Tyto aktivátory plasminu však za normálních podmínek nepředstavují více než 15 % celkové aktivity plasminu[42].

Plasmin štěpí fibrin za aminokyselinovými zbytky lysinu a argininu na rozpustné degradační produkty, z nichž nejvýznamnější jsou D-dimery[36] (kovalentně spojené D domény ze dvou různých molekul fibrinového monomeru), jejichž koncentrace v plasmě slouží k diagnostice tvorby a rozpouštění trombu. Degradační produkty fibrinu jsou schopné inhibovat polymeraci fibrinového monomeru[36].

Uvolněním plasminu ze štěpeného fibrinu je tento inaktivován glykoproteinem α_2-antiplasminem. α_2-Antiplasmin cirkuluje v krvi s poločasem 2,4 dny, koncentrace v krvi je 0,9 nmol l^{-1} a hmotnost 70 kDa. Je plasminem štěpen, čímž vzniká dvouřetězcová forma, která s plasminem tvoří komplex, degradovaný v játrech[43].

Proces fibrinolýzy je regulován. Regulační funkci nezastává pouze α_2-antiplasmin, ale také inhibitory aktivátorů plasminu a zeslabovače fibrinolýzy. Všudypřítomným inhibitorem je inhibitor aktivátoru plasminu 1 (PAI-1). Jedná se o jednořetězcový glykoprotein o hmotnosti 52 kDa, který je produkován endotheliálními buňkami, krevními destičkami, monocyty, hepatocyty, makrofágy a adipocyty. Jeho produkce je stimulována v závislosti na zánětlivé odpovědi cytokiny, lipoproteiny a růstovými faktory. Inhibuje tPA i uPA (cit.[36]).

Dalším inhibitorem je inhibitor aktivátoru plasminu 2 (PAI-2). Vyskytuje se buď jako protein o hmotnosti 47 kDa nebo jako glykoprotein o hmotnosti 60 kDa. Je produkován především leukocyty a měřitelná hladina v krvi je pouze během těhotenství. Je schopen inhibovat dvouřetězcové formy tPA a uPA (cit.[42]).

Zeslabovačem fibrinolýzy je inhibitor fibrinolýzy aktivovatelný trombinem (TAFI). Jedná se o 60 kDa vážící protein, který cirkuluje v plasmě o koncentraci 100 nmol l^{-1}, který je produkován hepatocyty a je uložen v krevních destičkách. Jeho aktivace trombinem je zesílena v přítomnosti thrombomodulinu. Proteolytickým štěpením trombinem vzniká Zn-dependentní karboxypeptidasa TAFIa se specifitou pro *C*-koncové arginylové a lysylové zbytky[44]. V molekule plasminogenu a tPA hrají právě tyto zbytky důležitou roli v interakci s fibrinem.

V neposlední řadě hrají důležitou úlohu v regulaci fibrinolýzy receptory. Z nich nejdůležitější roli hrají plasminogenové receptory[45] (např. GP IIbIIIa, α-enolasa), uPAR[45] (urokinasový receptor, podporuje vazbu uPA s PAI-1), integrin $\alpha_{M\beta2}$ (cit.[46]) (váže plasminogen a uPA, čímž 50× urychluje generaci plasminu), annexin-2[47] (váže plasminogen a tPA a tím 60× urychluje generaci plasminu) a protein přidružený k receptoru α2-makroglobulinu[48] (vychytává komplexy tPA-PAI-1).

4. Patofyziologie fibrinogenu

Choroby spojené s poruchou v molekule fibrinogenu jsou poměrně vzácné. Vrozená dysfibrinogenémie, choroba která se projevuje nefunkčností molekuly fibrinogenu vyvolanou poruchou v primární struktuře (bodová mutace, insert, delece), byla celosvětově popsána zatím jen asi v 400 rodinách[49]. Toto číslo ovšem nevypovídá o reálném množství případů, neboť koagulační vyšetření se neprová-

dí standardně a genetický screening provádí pouze několik pracovišť na světě. V České republice je pouze jedno pracoviště zabývající se vyšetřováním dysfibrinogenémií, a to Ústav hematologie a krevní transfuze, které spolupracuje s hematology z celé ČR.

Deficit fibrinogenu projevující se sníženou hladinou fibrinogenu v plasmě – hypofibrinogenémie bývá také vyvolán vrozenými mutacemi v některém z genů kódujících řetězce fibrinogenu. Získané dysfibrinogenémie bývají spojené s pozměněným zastoupením sialových kyselin v souvislosti s jaterními chorobami[50].

Poměrně závažným onemocněním je „fibrinogen storage disease“, které se vyznačuje ukládáním fibrinogenu v játrech[51], které může způsobit až selhání jater a smrt.

5. Závěr

Fibrinogen má v organismu mnoho funkcí, které jsou nezbytné pro přežití. Jako součást koagulační kaskády se účastní procesu zástavy krvácení. Zástava krvácení je jedním z nejdůležitějších ochranných mechanismů zajišťujících správné fungování organismu. V případě poranění je aktivována složitá kaskáda reakcí vedoucí k zabránění ztráty krve. Proces fibrinolýzy zajišťuje, po úspěšném zacelení rány, degradaci fibrinové sítě, která napomáhala v zástavě krvácení. Jak proces tvorby fibrinové sítě, tak i fibrinolýza dosud neodhalily všechna svá tajemství. Porozumění těmto procesům a jejich patofyziologii může zachránit mnoho životů a zajisté si zaslouží pozornost odborné veřejnosti.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GA AV ČR číslo KAN200670701.

LITERATURA

1. Weisel J. W.: Adv. Protein Chem. *70*, 247 (2005).
2. Buchanan A.: London Med. Gaz. *18*, 50 (1836).
3. Buchanan A.: Proc. R. Phul. Soc. Glasgow *2*, 16 (1845).
4. Magnusson S. In Boyer P. D. (ed.): *The Enzymes, vol. 3*. Academic Press, New York 1971.
5. Orcutt S. J., Krishnaswamy S.: J. Biol. Chem. *279*, 54927 (2004).
6. Fukutake K., Cho M. H., Seegers W. H.: Am. J. Physiol. *194*, 280 (1958).
7. Crawley J. T. B., Zanadelli S., Chion C. K. N. K., Lane D. A.: J. Thromb. Haemost. *5*, 95 (2007).
8. Huntington J. A.: J. Thromb. Haemost. *3*, 1861 (2005).
9. Pineda A. O., Carrell C. J., Bush L. A., Prasad S., Caccia S., Chen Z. W., Mathews F. S., Di Cera E.: J. Biol. Chem. *279*, 31842 (2004).
10. Butenas S., Mann K. G.: Blood Coagulation. Biochemistry (Moscow) *67*, 3 (2002).
11. Silverberg S. A., Nemerson Y., Zur M.: J. Biol. Chem. *252*, 8481 (1977).
12. Lawson J. H., Kalafatis M., Stram S. Mann K. G.: J. Biol. Chem. *269*, 23357 (1994).
13. Rosing J., van Rijn J. L. M. L., Bevers E. M., van Dieijen G., Comfurius P., Zwaal R. F.: Blood *65*, 319 (1985).
14. Lawson J. H., Mann K. G.: J. Biol. Chem. *266*, 11317 (1991).
15. Gailani D., Broze G. J. Jr.: Science *253*, 909 (1991).
16. Bailey K., Bettleheim F. R., Lorand L. Middlebrook W. R.: Nature *167*, 233 (1951).
17. Lorand L., Konishi K.: Arch. Biochem. Biophys. *105*, 58 (1964).
18. Olson S. T., Bjork I., Shore J. D.: Methods Enzymol. *222*, 525 (1993).
19. Rapaport S. I.: Thromb. Haemost. *66*, 6 (1991).
20. Walker F. J., Sexton P. W., Esmon C. T.: Biochim. Biophys. Acta *571*, 333 (1979).
21. Stubbs M. T., Bode W.: Semin. Thromb. Hemostasis *19*, 344 (1993).
22. Lewis S. D., Shields P. P., Shafer J. A.: J. Biol. Chem. *260*, 10192 (1985).
23. Hanna L. S., Scheraga H. A., Francis C. W., Marder V. J.: Biochemistry *23*, 4681 (1984).
24. Blombäck B.: Thromb. Res. *83*, 1 (1996).
25. Pechlik I., Yakovlev S., Mosesson M. W., Gilliland G. L., Medved L.: Biochemistry *45*, 3588 (2006).
26. Fowler W. E., Hantgan R. R., Hermans J., Erickson H. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *78*, 4872 (1985).
27. Hantagan R. R., Hermans J.: J. Biol. Chem. *254*, 11272 (1979).
28. Weisel J. W.: J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. *96*, 176 (1986).
29. Veklich Y. I., Gorkun O. V., Medved L. V., Nieuwenhuizen W., Weisel J. W.: J. Biol. Chem. *268*, 13577 (1993).
30. Lorand L.: Ann. N.Y. Acad. Sci.: *936*, 291 (2001).
31. Muszbek L., Ariëns R. A., Ichinose A.: J. Thromb. Haemost. *5*, 181 (2007).
32. Lewis S. D., Janus T. J., Lorand L., Shafer J. A.: Biochemistry *24*, 6772 (1985).
33. Ariëns R. A. S., Lai T.-S., Weisel J. W., Greenberg C. S., Grant P. J.: Blood *100*, 743 (2002).
34. Greenberg C. S., Lai T.-S., Ariëns R. A. S., Weisel J. W., Grant P. J., v: *Blood. Principles and practice of hematology*. (Hnadin R. I., Lux S. E., Stossel T. P., ed.), str. 1225. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2003.
35. Raum D., Marcus D., Alper C. A., Levey R., Taylor P. D., Starzl T. E.: Science *208*, 1036 (1980).
36. Hajjar K. A. In Nathan D. G., Orkin S. H., Ginsburg D., Look A. T.: *Hematology of Infancy and Childhood*. W. B. Saunders Co., Philadelphia 2003.
37. Forsgren M., Raden B., Israelsson M., Larsson K., Heden L. O.: FEBS Lett. *213*, 254 (1987).
38. Seksela O.: Biochim. Biophys. Acta *823*, 35 (1985).
39. Markus G., Priore R. L., Wissler F. C.: J. Biol. Chem. *254*, 1211 (1979).
40. Pennica D., Holmes W. E., Kohr W. J., Harkins R. N.,

Vehar G. A., Ward C. A., Bennet W. F., Yelverton E., Seeburg P. H., Heyneker H. L., Goeddel D.V., Collen D.: Nature *301*, 214 (1983).
41. Holmes W. E., Pennica D., Blaber M., Rey M. W., Guenzler W. A., Steffens G. J., Heyneker H. L.: Biotechnology *3*, 923 (1985).
42. Cesarman-Maus G., Hajjar K. A.: Br. J. Haematol. *129*, 307 (2005).
43. Holmes W. E., Nelles L., Lijnen H. R.: J. Biol. Chem. *262*, 1659 (1987).
44. Nesheim M.: Chest *124*, 33 (2003).
45. Hajjar K. A.: Thromb. Haemostasis *74*, 294 (1995).
46. Pluskota E., Soloviev D. A., Bdier K., Cines D. B., Plow E. F.: J. Biol. Chem. *279*, 18063 (2004).
47. Hajjar K. A., Krishnan S.: Trends Cardiovasc. Med. *9*, 128 (1999).
48. Beiseigel U., Weber W., Ihrke G., Herz J., Stanley K. K.: Nature *341*, 162 (1989).
49. Hanss M., Biot F.: Ann. N.Y. Acad. Sci. *936*, 89 (2001), http://www.geht.org/databaseang/fibrinogen, staženo: 21. 8.07.
50. Narvaiza M. J., Fernandez J., Cuesta B., Paramo J. A., Rocha E.: Ric. Clin. Lab. *16*, 563 (1986).
51. Abukawa D., Tazawa Y., Noro T., Nakagawa M., Iinuma K., Sugiyama K., Knisely A.: Pediatr. Dev. Pathol. *4*, 304 (2001).

R. Kotlín and Jan E. Dyr *(Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic):* **Fibrin Formation and Degradation**

Fibrinogen conversion to fibrin is a physiological process leading to haemostasis. Fibrinogen is cleaved by the serine protease thrombin to the fibrin monomer, which interacts with other fibrin monomers to produce protofibrils, which in turn spontaneously interact to form fibres. Fibrin formation activates specific proteases, which cleave plasminogen to plasmin. Plasmin degrades the fibrin network and disintegrates the haemostatic plug. The processes are regulated and are not yet fully clarified. This review brings an insight into these physiological processes.

amvis
Americké vědecké informační středisko, o.p.s.

VÝZVA

k podávání žádostí o podporu

česko-americké vědeckotechnické spolupráce

Uzávěrka přihlášek je 30. června 2008.

Kontakt:
AMVIS, o. p. s.
Senovážné nám. 24
116 47 Praha 1
Bližší informace na www.amvis.cz
e-mail: amvis@amvis.cz

Chem. Listy *102*, 319−326 (2008) Referát

CYKLUS Na^+ IÓNOV U BAKTÉRIÍ A METHANOARCHAEA

ZUZANA NOVÁKOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
Zuzana.Novakova@savba.sk

Došlo 20.6.07, prijaté 29.10.07.

Kľúčové slová: Methanoarchaea, Na^+ translokujúce systémy, Na^+ závislá ATP syntáza, generátory a konzumenti $\Delta\tilde{\mu}_{Na+}$

Obsah

1. Úvod
2. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea
   2.1. Enzýmy metanogenézy ako primárne sodné pumpy
      2.1.1. Na^+ translokujúci metyltransferázový komplex
      2.1.2. Formylmetanofurán dehydrogenáza
3. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea
   3.1. Na^+ translokujúca V_1V_o ATPáza
   3.2. Na^+ závislá A_1A_o ATP syntáza
4. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií
   4.1. Dekarboxylázy
   4.2. Oxidoreduktázy
5. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií
   5.1. Na^+ spriahnutý symport
   5.2. Na^+/H^+ antiporter
   5.3. Flagelárne motory poháňané gradientom sodných iónov
   5.4. F_1F_o ATP syntáza využívajúca sodné ióny ako spriahajúce
   5.5. Cyklus sodných iónov u bakteriálnych patogénov
6. Záver

1. Úvod

Sodík je šiesty najčastejšie sa vyskytujúci prvok v zemskej kôre a najčastejšie sa vyskytujúci alkalický kov. Sodné ióny spolu s iónmi Cl^- sú najviac zastúpené ióny v morskej vode. Odhaduje sa, že v moriach a oceánoch je až $1{,}5\cdot10^{16}$ ton Na^+. Sodík je vitálne dôležitý pre bunkovú biológiu a jeho pôsobenie na organizmy je dvojaké. Na jednej strane, život bez neho by nebol možný, na strane druhej, vo vyšších koncentráciách dokáže byť pre organizmy toxický. Vzhľadom k predpokladu, že život vznikal v oceánoch a moriach, kde ako je uvedené vyššie dominuje sodík ako hlavný katión, zohrávajú Na^+ ióny významnú úlohu v živote všetkých organizmov, počnúc od Archaea cez Prokaryoty, až po Eukaryoty, človeka vrátane. Morské, prípadne alkalitolerantné organizmy vyžadujú vysoké koncentrácie sodíka priamo vo svojom okolí, ale ani pre ostatné organizmy nie je jeho prítomnosť zanedbateľná. Je pochopiteľné, že na to, aby mohli organizmy udržiavať Na^+ homeostázu majú viaceré sofistikované Na^+ závislé systémy, ktoré sa na tom podieľajú.

Funkcia Na^+ iónov u živých organizmov je veľmi rôznorodá. Ióny Na^+ sa podieľajú na udržiavaní osmotického tlaku, pH všetkých živých organizmov, a aj viaceré bioenergetické systémy sú závislé na Na^+ iónoch. Príkladom takéhoto procesu je u methanoarchae tvorba metánu – metanogenéza. Pre úplnosť je potrebné dodať, že aj u vyšších organizmov, vrátane človeka, sú Na^+ ióny dôležité, pre vedenie nervového vzruchu, reguláciu objemu a tlaku krvi, udržanie svalovej dráždivosti, acidobázickej rovnováhy, ale aj v mnohých iných fyziologických dejoch.

Nadbytok Na^+ iónov na druhej strane vedie k rozmanitým patologickým stavom. V prímorských oblastiach a v súčasnosti aj v našich podmienkach salinita pôd stúpa a poľnohospodárska produkcia je negatívne ovplyvňovaná vysokou koncentráciou solí v pôde. Všetky tieto zistenia poukazujú na dôležitosť spoznávania funkcií Na^+ iónov v bunkovej biológii.

Preto, aby Na^+ ióny mohli v organizmoch plniť uvedené funkcie, musí mať bunka neporušenú membránu, ktorá prostredníctvom rôznych púmp a transportérov reguluje ich intracelulárnu koncentráciu. Je známe, že u živočíchov sa elektrochemický gradient Na^+ iónov ($\Delta\tilde{\mu}_{Na}{}^+$) využíva pre poháňanie transportu rôznych metabolitov do bunky. $\Delta\tilde{\mu}_{Na}{}^+$ je generovaný primárnou sodnou pumpou, Na^+/K^+ ATPázou. Tento typ ATPázy nebol u prokaryotov nájdený. Napriek tomu sa v posledných dvoch dekádach ukázalo, že Na^+ ióny môžu zohrávať významnú funkciu aj v bioenergetike prokaryotov a archaea. Dovtedy bola všeobecne akceptovaná predstava, že jediným spriahajúcim iónom je H^+. V krátkosti je na porovnanie potrebné pripomenúť základný princíp membránovo viazanej konverzie energie v mitochondriách, mnohých baktériách a chloroplastoch ako to navrhol profesor P. Mitchell vo svojej chemiosmotickej teórii[1]. V membráne týchto organel je transfer elektrónov spriahnutý s translokáciou H^+ cez membránu a vzniknutý elektrochemický gradient H^+ ($\Delta\tilde{\mu}_H{}^+$) je využitý na poháňanie mnohých bunkových endergonických procesov. Protón je tzv. spriahajúci ión. Veľkosť elektrochemického gradientu protónov je určená uvedenou rovnicou:

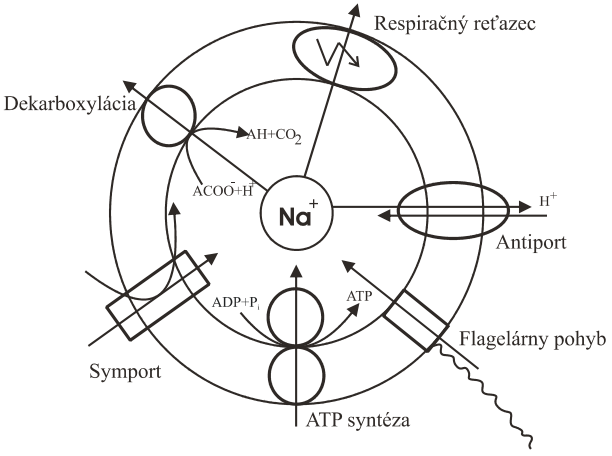
$$\Delta\tilde{\mu}_H{}^+ = F\,\Delta\Psi - 2{,}303\,RT\,\Delta\mathrm{pH}$$

($\Delta\Psi$ je elektrický potenciálový rozdiel cez membránu, *R* je plynová konštanta, *T* je teplota v K, *F* je Faradajova konštanta , $\Delta pH = pH_{in} - pH_{out}$).

V roku 1980 bola prvýkrát popísaná existencia primárnej pumpy generujúcej elektrochemický gradient Na^+ iónov u anaeróbnej baktérie *Klebsielly aerogenes*[2]. Zo začiatku boli tieto zistenia prijímané bioenergetickou komunitou s určitou nedôverou a boli považované za kuriozitu v zmysle, že u prokaryotov je všetko možné. Postupne sa však ukázalo, že viaceré mikroorganizmy môžu ióny Na^+ využívať vo svojich bioenergetických systémoch ako ióny spriahajúce (coupling). Aj nedávne sekvenovanie mnohých bakteriálnych genómov preukázalo existenciu rôznych Na^+ závislých bioenergetických systémov.

Myšlienka, že Na^+ ión môže slúžiť ako spriahajúci ión, bola založená na mnohých pozorovaniach. Zistilo sa, že Na^+ môže byť transportované z bunky pomocou primárnych púmp (generátorov Na^+ gradientu), a že tok Na^+ po gradiente do bunky sa využíva na prácu rovnako ako H^+ gradient (obr. 1, cit.[3]). Prítomnosť primárnych Na^+ púmp v bunke je výhodná pri nízkom elektrochemickom H^+ gradiente, alebo pri vysokej koncentrácii Na^+ iónov, čo nie sú vhodné podmienky pre funkciu Na^+/H^+ antiportera, ktorý sa taktiež zúčastňuje na transporte iónov Na^+ z bunky.

Objavy enzýmov využívajúcich Na^+ ióny viedli v roku 1985 Skulacheva[4] k formulovaniu revolučného konceptu cyklu sodného katiónu v membránovej energetike, ktorý je v súčasnosti akceptovaný rovnako ako protónový cyklus Mitchella. Odhalenie, že Na^+ katión dokáže fungovať rovnako ako spriahajúci ión, ktorý dopĺňa prípadne nahrádza protón v bioenergetických funkciách, preformovalo dovtedajší náhľad na bioenergetiku. Existujú organizmy využívajúce výlučne energiu H^+ gradientu, ďalej organizmy, u ktorých je známa koexistencia oboch gradientov H^+ ako aj Na^+, a taktiež ako napr. *Propionigenium modestum*, ktoré využíva len gradient Na^+ iónov pri transformácii energie[5]. V nasledovných častiach poskytneme stručný prehľad o substitúcii H^+ iónov Na^+ iónmi v bioenergetických cykloch, vo svete, kde $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ namiesto $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ poháňa membránové endergonické reakcie (transport aminokyselín, cukrov a iných metabolitov, syntézu ATP a pohyb bakteriálnych bičíkov). Cyklus Na^+ iónov bol v poslednej dobe objavený u celého radu morských mikroorganizmov, mnohých ľudských a živočíšnych patogénov, ale aj u archaea. Môžeme konštatovať, že svet Na^+-závislej bioenergetiky má dôležité miesto v biosfére našej planéty.



Obr. 1. **Prehľad bakteriálnych systémov podieľajúcich sa na energetickom spriahnutí prostredníctvom cirkulácie iónov Na^+**

2. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea

2.1. Enzýmy metanogenézy ako primárne sodné pumpy

Methanoarchaea patria medzi fylogeneticky najstaršie organizmy a sú zaradené do tretej vývojovej línie organizmov, do ríše Archaea. Záujem o túto skupinu mikroorganizmov nie je neočakávaný. Na jednej strane v čase, keď sa stále viac zaujímame o alternatívne zdroje energie, je tvorba metánu methanoarchaea mimoriadne zaujímavá. Na druhej strane metán predstavuje jeden z aktívnych skleníkových plynov. Aj keď CO_2 je najdôležitejším skleníkovým plynom, molekuly metánu zachytávajú teplo až s 20 násobnou účinnosťou ako molekuly CO_2. Antropogénna činnosť výrazne prispieva k zvyšovaniu koncentrácie metánu v atmosfére (ryžové polia, produkcia a distribúcia zemného plynu a nafty, dolovanie uhlia, poľnohospodárstvo, ale aj prírodné zdroje, oceány, tundry a vlhké zeme...). Je preto potrebné chápať všetky parametre, ktoré bezprostredne ovplyvňujú tvorbu metánu. Metanogenéza je pre methanoarchaea jediná metabolická dráha, v ktorej získavajú energiu. Pre tvorbu metánu využívajú len niekoľko jednoduchých substrátov (H_2 + CO_2, metanol, formiát a metylamíny). Najuniverzálnejším substrátom je vodík a oxid uhličitý. Postupnou redukciou oxidu uhličitého vodíkom vzniká metán a redoxné reakcie, ktoré sa tohto procesu zúčastňujú, generujú elektrochemické gradienty Na^+ iónov a H^+ súbežne. Oba tieto gradienty môžu byť priamo využívané na poháňanie syntézy ATP.

Problém bioenergetiky metanoarchaea, súčasného využitia dvoch iónových gradientov a ich kooperácia nebola doposiaľ detailne objasnená. Napriek viacročným snahám viacerých laboratórií, problém transformácie energie u methanoarchaea zostáva otvorený. Doposiaľ sa nepodarilo jednoznačne vysvetliť molekulárny mechanizmus využitia oboch iónových gradientov H^+ a Na^+ v syntéze bunkového ATP. Na rozdiel od toho, enzýmy, ktoré tieto gradienty generujú, sú známe a priamo súvisia s procesom metanogenézy.

2.1.1. Na^+ translokujúci metyltransferázový komplex

U metanogénnych archaea je tvorba metánu spojená s paralelnou tvorbou $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ a $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, ktoré sa využívajú na

poháňanie endergonických reakcií. Funkciu primárnej H^+ pumpy plní H_2-heterodisulfid reduktáza (EC 1.8.98.1) a funkciu primárnej Na^+ pumpy N^5-metyltetrahydrometanopterín: koenzým M metyltransferáza (EC 2.1.1.86).

V prípade tvorby metánu z acetátu, H_2 a CO_2 sa metanogenéza ukázala ako Na^+ závislý proces. Na rozdiel od toho, redukcia metanolu z H_2 na metán nevyžaduje prítomnosť Na^+ katiónov. Tieto poznatky viedli k hypotéze, že metanogenéza v mieste prenosu metylovej skupiny z N^5-metyltetrahydrometanopterínu na koenzým M je proces závislý na Na^+ katióne[6]. Reakcia je katalyzovaná membránovo viazaným enzýmom N^5-metyltetrahydrometanopterín: koenzým M metyltransferázou translokujúcou Na^+.

Enzým bol prvýkrát purifikovaný z *Methanobacterium thermoautotrophicum* (kmeň Marburg)[7]. Uvedená metyltransferáza je zložená z ôsmich podjednotiek pričom na 23 kDa polypeptid je naviazaná corrinoidová prostetická skupina obsahujúca kobalt. Vzhľadom na molekulovú hmotnosť celého komplexu a jednotlivých podjednotiek sa dá očakávať, že purifikovaný komplex tvorí tetramér.

Metyltransferáza katalyzuje dve reakcie. Najprv metyláciu prostetickej skupiny a následne jej demetyláciu, pričom výsledne sa prenáša metylová skupina z N^5-metyltetrahydrometanopterínu na koenzým M (cit.[8]).

CH_3-H_4MPT + cob(I)alamín → CH_3-cob(III)alamín +
+ H_4MPT

CH_3-cob(III)alamín + H-S-CoM → CH_3-CoM +
+ cob(I)alamín

Redukovaná forma enzýmu sa správa ako nukleofil voči metylovej skupine N^5-metyltetrahydrometanopterínu (CH_3-H_4MPT) a vytvorí s ňou intermediát, ktorý potom odovzdá metylovú skupinu koenzýmu M a vytvorí sa metylkoenzým M. Demetylácia metyltransferázy je stimulovaná Na^+ iónmi, čo nasvedčuje tomu, že práve druhá časť reakcie súvisí s vektorovým transportom týchto iónov. Predpokladá sa, že translokáciu Na^+ iónov poháňajú konformačné zmeny prenášajúce sa cez navzájom susediace podjednotky.

2.1.2. Formylmetanofurán dehydrogenáza

Tento enzým (EC 1.2.99.5) katalyzuje prvý krok metanogenézy, pri ktorom sa CO_2 viaže na metanofurán (MFR-NH_3^+) a následne je redukovaný za vzniku formylmetanofuránu (MFR-NH-CHO) pomocou elektrónov z vodíka (obr. 2, cit.[9]). Na tejto reakcii sa podieľajú ešte ďalšie dva enzymatické komplexy, hydrogenáza citlivá na kyslík a oxidoreduktáza. Syntéza formylmetanofuránu je v energetickom metabolizme metanogénov dôležitá H_2 závislá reakcia.

MFR-NH_3^+ + CO_2 + H_2 → MFR-NH-CHO + H^+ + H_2O
$\Delta G°' = +16$ kJ mol^{-1}

Reakcia je endergonická a poháňaná Na^+ gradientom. Bolo zistené, že tvorba metánu z CO_2 a H_2, ale nie z formaldehydu a H_2, je inhibovaná Na^+ iónofórmi, čiže redukcia CO_2 po tvorbu formaldehydu musí byť poháňaná $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$.

Formylmetanofurán dehydrogenáza bola purifikovaná a charakterizovaná u *Methanosarcina barkeri*[10], *Methanobacterium thermoautotrophicum*[11], *Methanobacterium wolfei*[12] a u *Archaeoglobus fulgidus*[13]. Je to multipodjednotkový solubilný proteín obsahujúci molybdén (volfrám), nehemové železo, síru a molybdopterín dinukleotid, ktorého aktivita na vzduchu rapídne klesá.

Enzým u *Methanobacterium thermoautotrophicum* je zložený z dvoch podjednotiek s približnou hmotnosťou 60 kDa a 45 kDa.

3. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea

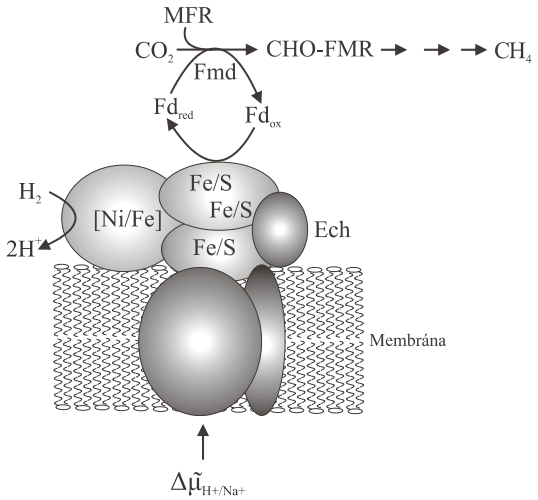
3.1. Na^+ translokujúca V_1V_o ATPáza

V_1V_o ATPázy (EC 3.6.3.15) sa nachádzajú u baktérií a taktiež vo vakuolách eukaryotických buniek. U eukaryotov pracujú ako H^+ pumpy, ktoré okysľujú vnútorné prostredie rôznych organel (lyzozómy, endozómy, cisterny Golgiho aparátu). V tomto prípade ich primárna funkcia nespočíva v tvorbe ATP.

Vo svete baktérií napr. Gram-pozitívna baktéria *Enterococcus hirae* má Na^+ translokujúcu V_1V_o ATPázu, ktorá transportuje Na^+ ióny z cytoplazmy a tým vytvára $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ (cit.[14]). ATP slúži ako zdroj energie pre tento systém. Predpokladá sa, že táto Na^+ pumpa je dôležitá pre udržiavanie sodnej homeostázy baktérií žijúcich v alkalickom prostredí.

V_o membránová časť je zložená z podjednotiek G, I a K. V_1 časť tejto ATPázy pozostáva z podjednotiek A, B, C, D, E a F.

ATPázová aktivita purifikovaného enzýmu je citlivá na inhibítory vakuolárnych ATPáz ako nitrát, *N*-etylmaleimid a destruxin B, nereaguje na konkanamycín A., ale je inhibovaná aj DCCD.



Obr. 2. **Schématický model redukcie CO_2 na formylmetanofurán u *Methanosarcina barkeri*;** Fmd – formylmetanofurán dehydrogenáza, MFR – metanofurán, CHO-MFR – formylmetanofurán, fd – ferredoxín, Ech – energiu konvertujúca hydrogenáza

C podjednotka V_1V_o ATPázy obsahuje štyri (dvakrát viac ako F_1F_o ATPáza) transmembránové helixy, ktoré zrejme vznikli génovou duplikáciou a fúziou z génu pre c podjednotku F_1F_o ATPázy. Rotor tejto ATPázy obsahuje len polovičný počet väzbových miest pre spriahajúce ióny ako ATPázy typu F. Tvorí ho hexamér, pričom každý monomér obsahuje jedno Na^+- väzbové miesto.

Mechanizmus, akým ATPáza pracuje, je nejasný. Predpokladá sa, že hexamerický rotor rotáciou postupne transportuje Na^+ ióny podobne ako F_1F_o ATPáza.

3.2. Na^+ závislá A_1A_o ATP syntáza

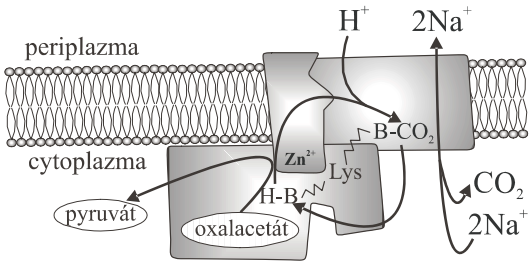
Po analýze membránovo asociovaných ATPáz niektorých archaea sa našli ATPázy, ktoré boli odlišné od ATPáz typu V a F ATPáz a boli klasifikované ako ATPázy typu A (archaeálne). Katalytické časti týchto ATPáz sú vysoko homologické s ATPázami typu V a membránová časť je funkčným homológom F_o časti[15]. Niektoré metanogény (*Methanococcus jannaschii*[16], *Methanobacterium thermoautotrophicum*[17]) majú v genóme sekvenciu len pre A_1A_o ATPázu (EC 3.6.3.14). Jedinou cestou pre tieto organizmy ako syntetizovať ATP je ATP syntéza poháňaná iónovým gradientom. Preto sa predpokladá, že funkciou tejto ATPázy je syntéza ATP. Nevyriešenou zostáva otázka, ktorý spriahajúci ión táto ATPáza využíva. Ako už bolo spomenuté, metanogény produkujú súčasne gradienty H^+ a Na^+ iónov a predpokladá sa, že by mohli priamo využívať aj gradient Na^+ iónov na syntézu ATP[18]. Doposiaľ nebola na purifikovanom enzýme určená iónová špecificita, ale nedá sa vylúčiť, že A_1A_o ATPáza translokuje H^+ aj Na^+ ióny súčasne, ako naznačujú niektoré experimenty[19]. Iónová preferencia môže byť určená energiou jednotlivých gradientov.

4. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií

4.1. Dekarboxylázy

Niektoré mikroorganizmy disponujú membránovo viazanými enzýmami, ktoré katalyzujú dekarboxylačné reakcie rastových substrátov a súčasne využívajú voľnú energiu dekarboxylácie na pumpovanie Na^+ iónov von z bunky, čím vytvárajú $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$.

Spomedzi dekarboxyláz transportujúcich Na^+ ióny bola objavená ako prvá oxalacetát dekarboxyláza (EC 4.1.1.3) u *Klebsielly aerogenes* a neskôr aj u *Klebsielly pneumoniae*[20]. Tento enzým zohráva dôležitú úlohu pri anaeróbnom metabolizme citrátu, počas ktorého sa vytvára $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ a 1 mol ATP na 1 mol citrátu. Oxalacetát dekarboxyláza (obr. 3, cit.[21]) je zložená z troch subjednotiek[21]. Subjednotka α obsahuje väzbové miesto pre biotín. Hydrofóbna β subjednotka je lokalizovaná v membráne. Subjednotka γ je svojím *N*-terminálnym koncom ukotvená v membráne a jej hydrofilná *C*-terminálna doména je



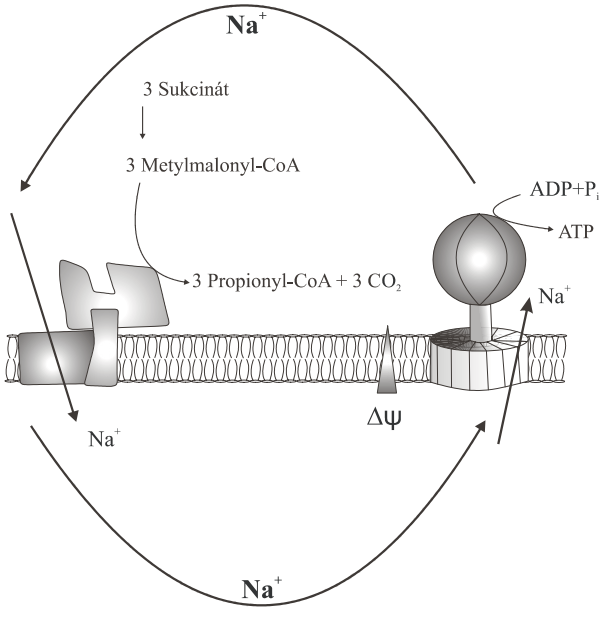
Obr. 3. **Obrázok znázorňujúci geometriu oxalacetát dekarboxylázy u *Klebsielly pneumoniae* a mechanizmus dekarboxylácie**; BH – biotín

miestom, kde sa k enzýmu viaže Zn^{2+}, ktorý sa priamo zúčastňuje na transfere karboxylu z oxalacetátu. Táto podjednotka sa nachádza medzi α a β podjednotkami a spája ich.

U *Veillonelly alcalescens* bola objavená Na^+- translokujúca metylmalonyl-CoA dekarboxyláza (EC 4.1.1.41) zúčastňujúca sa pri degradácii sukcinátu na propionát a CO_2 (cit.[22]).

Anaeróbna baktéria *Propionigenium modestum* získava všetku energiu tak, že spriaha exergonickú dekarboxyláciu metylmalonyl-CoA s transportom Na^+ cez membránu a vytvorený gradient využíva na syntézu ATP (obr. 4, cit.[4]).

Ďalšie dekarboxylázy tvoriace $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ sú známe u *Acidaminococcus fermentans* a *Malonomonas rubra*. *Acida-*



Obr. 4. **Konzervácia energie počas fermentácie sukcinátu u *P. modestum*;** cyklus Na^+ iónov spája exergonickú dekarboxyláciu metylmalonyl-CoA a endergonickú ATP syntézu

minococcus fermentans obsahuje glutaconyl-CoA dekarboxylázu (EC 4.1.1.70), ktorú využíva v metabolizme glutamátu pri dekarboxylácii glutakonyl-CoA na krotonyl-CoA (cit.[23]).

Malonomonas rubra obsahuje malonát dekarboxylázu (EC 4.1.1.9), ktorá sa podieľa na reakcii premeny malonátu na acetát a CO_2 (cit.[24]). Je viac komplikovaná ako predošlé enzýmy, pretože obsahuje aj aktivačný modul potrebný pre túto reakciu.

4.2. Oxidoreduktázy

Morské a halofilné baktérie potrebujú pre svoj rast Na^+ ióny. Energiu $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ využívajú na poháňanie transportu rôznych látok proti koncentračnému gradientu. Oh a spol.[25] skúmali u morských baktérií obsahujúcich Na^+-translokujúcu NADH:ubichinón oxidoreduktázu (EC 1.6.5.3) závislosť na Na^+ iónoch. Zistili, že všetky baktérie, ktoré prestali rásť v neprítomnosti NaCl, obsahovali túto primárnu Na^+ pumpu. Naopak, baktérie bez tejto pumpy dokázali rásť aj v neprítomnosti NaCl. Tieto zistenia ukázali, prečo niektoré morské baktérie vyžadujú pre svoj rast Na^+ ióny.

NADH:ubichinón oxidoreduktázy (NDH-I) v respiračnom reťazci mitochondrií a baktérií katalyzujú prenos dvoch elektrónov z NADH na ubichinón. Oxidácia jedného NADH je spojená s translokáciou štyroch protónov. Okrem tejto oxidoreduktázy, veľa baktérií a húb obsahuje menšiu a jednoduchšiu (NDH-II).

NADH:ubichinón oxidoreduktáza translokujúca Na^+ (Na^+-NQR) bola prvýkrát nájdená u *Vibria alginolyticus*[26]. Je to enzým spájajúci transfer elektrónov s translokáciou Na^+ z bunky. Baktérie obsahujúce primárnu Na^+ pumpu dokážu rásť v alkalickom prostredí aj v prítomnosti protónoforov. Táto alternatíva umožňuje baktériám udržiavať si neutrálne vnútorné pH v alkalickom prostredí.

NADH:ubichinón oxidoreduktáza bola nájdená taktiež u *Klebsielly pneumoniae*[27] rastúcej anaeróbne na citráte (obr. 5, cit.[28]).

Štúdium podjednotiek NADH:ubichinón oxidoreduktázy z *Vibria alginolyticus* ukázalo, že enzým obsahuje šesť podjednotiek, ktoré v dvoch krokoch redukujú ubichinón na ubichinol cez medziprodukt ubisemichinón. NqrF podjednotka obsahuje ako kofaktor nekovalentne naviazaný flavín FAD a na NqrB a NqrC podjednotku sa kovalentne viaže zrejme FMN. Na začiatku NqrB podjednotka reaguje s NADH a redukuje ubichinón na ubisemichinón. Táto reakcia je silno inhibovaná Ag^+. Potom NqrA podjednotka v prítomnosti NqrC podjednotky redukuje ubisemichinón na ubichinol. V tomto bode dochádza k translokácii Na^+, pričom sa potvrdilo, že špecifický inhibítor Na^+ púmp 2-*n*-heptyl-4-hydroxychinolín *N*-oxid (HQNO) výrazne inhibuje túto časť reakcie. NqrF taktiež obsahuje [2Fe-2S] klaster, ktorý sa s vyššie spomenutými kofaktormi podieľa na redoxnej reakcii katalyzovanej NADH:ubichinón oxidoreduktázou[29].

5. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií

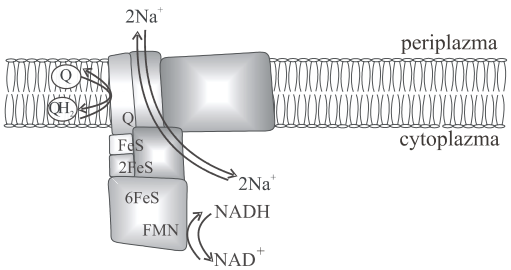
5.1. Na^+ spriahnutý symport

Symportéry sú membránové transportné proteíny zodpovedné väčšinou za akumuláciu živín, ale aj za osmoadaptáciu buniek. Energiu na poháňanie transportu týchto látok získavajú z H^+ alebo Na^+ elektrochemického potenciálu. Symportéry využívajúce gradient Na^+ iónov u baktérií tvoria viacero skupín a sú bežnou cestou pre príjem substrátov. Obyčajne ide o transport aminokyselín, sacharidov a citrátu. Ióny Na^+ vstupujú do bunky v smere elektrochemického gradientu, čím poskytujú energiu pre vstup substrátov[30].

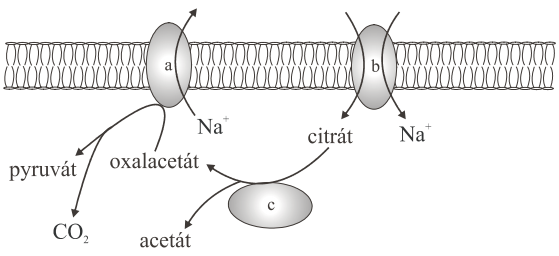
Príkladom Na^+ závislého transportu sacharidu do bunky je melibiózový prenášač u *Salmonelly typhimurium* alebo *E. coli*. Zaujímavosťou je, že tento prenášač dokáže na kotransport okrem Na^+ katiónu využívať aj H^+ a Li^+ ióny.

Kotransport Na^+ so sacharidmi bol pozorovaný taktiež u morských baktérií (*Vibrio fisherii*, *Alteromonas haloplanktis*, *Vibrio alginolyticus*).

K.pneumoniae má za anaeróbnych podmienok indukovateľný Na^+- závislý transportný systém pre citrát ako zdroj uhlíka[31]. Citrát vstupuje do bunky v symporte s Na^+



Obr. 5. **Schématický model NADH:ubichinón oxidoreduktázy u *Klebsielly pneumoniae***; Q – ubichinón



Obr. 6. **Časť metabolizmu citrátu u *K. pneumoniae***; a – oxalacetát dekarboxyláza, b – citrátový prenášač, c – citrát lyáza

a vo vnútri bunky sa štiepi citrát lyázou (EC 4.1.3.6) na acetát a oxalacetát. Oxalacetát sa následne dekarboxyluje na pyruvát pomocou membránovo viazaného enzýmu oxalacetát dekarboxylázy, ktorá pumpuje von z bunky Na^+ ióny, čím vytvára $\Delta\tilde{\mu}_{Na}{}^+$ (obr. 6, cit.[32]).

Kotransportér rozvetvených aminokyselín (leucín, izoleucín, valín) závislý na Na^+ katiónoch bol študovaný u *Pseudomonas aeruginosa* a gény pre podobné prenášače boli identifikované aj u *S. typhimurium.*

5.2. Na^+/H^+ antiporter

Jeden z dôležitých transportných systémov u baktérií je aj Na^+/H^+ antiporter, ktorý spája obeh H^+ a Na^+ iónov cez membránu. Je to integrálny membránový proteín, ktorý katalyzuje výmenu H^+ z jednej strany membrány za Na^+ ióny na opačnej strane, čím reguluje vnútrobunkové pH, obsah Na^+ iónov v bunke a bunkový objem[33]. Antiporter využíva protónmotívnu silu a premieňa ju na elektrochemický Na^+ gradient alebo naopak. Mnohé Na^+/H^+ antiportery sú veľmi citlivé na zmeny pH, čo potvrdzuje ich úlohu v pH homeostáze a sú rozšírené vo všetkých bunkách od archaea cez baktérie až po eukaryoty. Extrémofily patriace medzi archaea nie sú výnimka. Obsahujú antiportery, ktoré majú významné funkcie v ich metabolizme a bioenergetike. Alkalofilné baktérie sú schopné prežívať v prostredí s extrémne nízkou koncentráciou H^+, v rozmedzí pH 9 až 11. Za túto schopnosť vďačia elektrogénnym Na^+/H^+ antiporterom, ktoré vytvárajú pH gradient s rozdielom okolo dvoch pH jednotiek[34]. Pri respirácii a ATP syntéze využívajú protónový cyklus. Sekundárny transport spriahnutý s Na^+ gradientom využívajú na symport živín a pohyb bičíka.

U extrémnych halofilov, ktoré žijú v prostredí s vysokými koncentráciami solí, udržuje antiporter nižšiu vnútrobunkovú koncentráciu Na^+ oproti okoliu. U týchto organizmov existuje primárny Na^+ cyklus rovnako ako H^+ cyklus. Syntézu ATP u nich v niektorých prípadoch poháňa aj Na^+ gradient. Sekundárny transport je v tomto prípade poháňaný Na^+ gradientom.

Metanogény majú cyklus iónov na membráne najviac podobný morským baktériám. Obsahujú Na^+/H^+ antiporter, ktorý slúži ako centrálny spojovací a prepínací článok medzi energetickými procesmi závislými na H^+ a systémami závislými na Na^+ iónoch. Pred genómovou analýzou bol Na^+/H^+ antiporter detegovaný u týchto organizmov prostredníctvom inhibítorov ako amilorid, harmalín a EIPA [5-(*N*-etyl-*N*-izopropyl)-amilorid], špecifických pre tento antiporter. Metanogenézou vytvorený Na^+gradient sa môže pomocou antiportera premieňať na H^+ gradient, ale samozrejme tento proces funguje aj opačným smerom. U *Ms. barkeri* sa antiporter v alkalických podmienkach zúčastňuje pH regulácie, kedy recykluje H^+ do cytoplazmy výmenou za Na^+ ióny.

Podrobnosti o Na^+/H^+ antiporteroch boli analyzované v prácach Šurína[35] a Majerníka[36].

5.3. Flagelárne motory poháňané gradientom sodných iónov

Flagely sú organely zodpovedajúce za pohyb mnohých baktérií a archaea. Bakteriálny flagelárny motor využíva energiu iónového gradientu a dokáže sa otáčať rýchlosťou až 100 000 otáčok za minútu. Niektoré baktérie využívajú H^+ elektrochemický gradient, iné gradient Na^+ iónov.

Napr. motilita *Vibria alginolyticus* je závislá na Na^+ gradiente a Na^+ ióny pre pohyb flagely využívajú taktiež aj niektoré alkalofilné *Bacilly,* pretože vzhľadom na pH prostredia je ich protónmotívna sila nízka[37]. Funkčné vlastnosti motoru sa zdajú byť objasnené, ale molekulárny mechanizmus je zatiaľ neznámy, čo vyplýva z neobyčajnej zložitosti týchto motorov.

5.4. F_1F_o ATP syntáza využívajúca spriahajúce sodné ióny

F_1F_o ATPázy sa nachádzajú u baktérií rovnako ako aj v mitochondriách a chloroplastoch eukaryotov. Obyčajne využívajú energiu H^+ gradientu na syntézu ATP. U *P.modestum* bolo zistené, že vlastní špeciálnu F_1F_o ATPázu (EC 3.6.3.15), ktorá využíva ako spriahajúce ióny Na^+ (cit.[38]). ATPázy s podobnými vlastnosťami boli nájdené aj u iných mikroorganizmov napr. *Acetobacterium woodii*[39] a *Ilyobactera tartaricus*[40]. Na^+ translokujúca F_1F_o ATPáza má typické podjednotkové zloženie ako eubakteriálna ATPáza.

F_1 časť je zložená z piatich rôznych podjednotiek α_3, β_3, γ, δ, ε a F_o časť sa skladá z troch odlišných podjednotiek a, b_2, c_{9-12}. Porovnanie veľkosti a identity podjednotiek z *P.modestum* a *E.coli* naznačuje, že obe ATPázy sú fylogeneticky príbuzné, pričom α a β podjednotky sú vysoko konzervované.

Počas syntézy ATP dochádza k transportu Na^+ iónov z periplazmy cez kanál statoru (podjednotka a) na Na^+ väzbové miesta na rotore (podjednotka c). Po rotácii rotora sa Na^+ ión uvoľní do cytoplazmy.

Elektrochemický gradient $\Delta\tilde{\mu}_{Na}{}^+$, ktorý poháňa syntézu ATP, pozostáva z dvoch zložiek, z koncentračného gradientu Na^+ iónov Δp_{Na+} a membránového potenciálu $\Delta\psi$. Uvedené zložky boli dlho považované za termodynamické a kinetické ekvivalenty, ale zistilo sa, že ATP syntéza je za fyziologických podmienok závislá na $\Delta\psi$. Ukázalo sa totiž, že len $\Delta\psi$ dokáže indukovať krútiaci moment, ktorý poháňa protismernú rotáciu a a c podjednotky F_o motora *Propionigenium modestum* ATP syntázy[41].

5.5. Cyklus sodných iónov u bakteriálnych patogénov

Genómová analýza ukázala, že genómy mnohých ľudských a živočíšnych patogénov kodujú primárne membránové Na^+ pumpy, Na^+ transportujúce dekarboxylázy,

Na^+ translokujúce NADH:ubichinón oxidoreduktázy a viacero Na^+ dependentných permeáz[42]. Tieto zistenia naznačili, že patogény podobne ako aj iné baktérie môžu využívať Na^+ ióny namiesto H^+ vo svojej energetike ako spriahajúce ióny. Využívanie Na^+ cyklu môže byť významným faktorom virulencie u tak nebezpečných patogénov ako *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica serovar Typhi* a *Yersinia pestis*. U *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae* môže Na^+ gradient slúžiť ako jediný zdroj energie pre poháňanie sekundárnych transportérov. Aj keď mnohé patogény využívajú Na^+ vo svojich fyziologických funkciách, úloha Na^+ bioenergetiky v bakteriálnej virulencii je stále nerozriešená. Z uvedených dôvodov, porozumenie Na^+ závislej bioenergetiky vo svete baktérií a archaea predstavuje veľmi zaujímavú výzvu pre bioenergetickú vedeckú obec. Naše poznanie v tomto smere je len vo svojich počiatkoch, ale hojné rozšírenie Na^+ cyklu vo svete patogénov naznačuje, že výskyt Na^+ závislej bioenergetiky môže výrazne zvyšovať verzatilitu membránovej bioenergetiky aj u týchto mikroorganizmov. V tejto súvislosti je potrebné spomenúť, že dnes poznáme niektoré látky (napr. korormicin) fungujúce ako inhibítory Na^+ cyklu v energetickom metabolizme niektorých ľudských patogénov, čo naznačuje, že Na^+ pumpy by mohli byť sľubným potenciálnym terčom účinkovania špecifických liečiv.

6. Záver

Donedávna bolo všeobecne akceptované, že H^+ slúžia ako spriahajúce ióny, ktoré spájajú endergonické a exergonické bunkové procesy prebiehajúce na bunkových membránach. Postupne sa získali experimentálne údaje, ktoré ukázali, že Na^+ ióny môžu za špecifických rastových podmienok nahradiť H^+ ako spriahajúce ióny. U mnohých baktérií boli popísané viaceré primárne Na^+ pumpy – generátory $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$, ako aj konzumenti $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$. Cyklus Na^+ zložený z takýchto generátorov a konzumentov $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$, bol v súčasnej dobe popísaný u mnohých aeróbnych a anaeróbnych baktérií, ale aj u archaea vrátane methanoarchaea. Nie je potom prekvapujúce, že existencia Na^+ cyklu bola popísaná aj u mnohých závažných humánnych a živočíšnych patogénov. Tieto zistenia ukazujú, že Na^+ cyklus paralelne s H^+ cyklom zohráva významnú funkciu v adaptácii baktérií na prostredie, v ktorom žijú, a že jeho rozšírenie v biosfére má nezastupiteľnú funkciu.

LITERATÚRA

1. Mitchell P.: Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. *41*, 445 (1966).
2. Dimroth P.: FEBS Lett. *122*, 234 (1980).
3. Dimroth P.: Microbiol. Rev. *51*, 320 (1987).
4. Skulachev V. P.: Biokhimiia *50*, 179 (1985).
5. Dimroth P., Ballmoos Ch., Meier T.: EMBO *7*, 3 (2006).
6. Becher B., Müller V., Gottschalk G.: J. Bacteriol. *174*, 7656 (1992).
7. Gärtner P., Ecker A., Fischer R., Linder D., Fuchs G., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. *213*, 537 (1992).
8. Weiss D. S., Gärtner P., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. *226*, 799 (1994).
9. Hedderich R.: J. Bioenerg. Biomembr. *36*, 1 (2004).
10. Karrasch M., Borner G., Enssle M., Thauer R. K.: FEBS Lett. *253*, 226 (1989).
11. Borner G., Karrasch M., Thauer R. K.: FEBS Lett. *290*, 31 (1991).
12. Schmitz R. A., Richter M., Linder D., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. *207*, 559 (1992).
13. Schmitz R. A., Linder D., Stetter K. O., Thauer R. K.: Arch. Microbiol. *156*, 427 (1991).
14. Murata T., Yamato I., Kakinuma Y.: J. Bioenerg. Biomembr. *37*, 411 (2005).
15. Mukohata Y. a Ihara K., v knihe: *Bioenergetics*: (Kim C. H., Ozawa T., ed.). Plenum Press, New York 1990.
16. Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., FitzGerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S., Venter J. C.: Science *273*, 1058 (1996).
17. Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokowski S., Curchen G. M., Daniels C. J., Mao J. I., Rice P., Nolling J., Reeve J. N.: J. Bacteriol. *179*, 7135 (1997).
18. Šmigáň P., Majernik A., Greksák M.: FEBS Lett. *349*, 424. Erratum in: FEBS Lett. *353*, 230 (1994).
19. Pisa K. Y., Huber H., Thomm M., Muller V.: FEBS J. *274*, 3928 (2007).
20. Schwarz E., Oesterhelt D., Reinke H., Beyreuther K., Dimroth P.: J. Biol. Chem. *263*, 9640 (1988).
21. Dimroth P., Jockel P., Schmid M.: Biochim. Biophys. Acta. *1505*, 1 (2001).
22. Galivan J. H., Allen S. H.: Arch. Biochem. Biophys. *126*, 838 (1968).
23. Buckel W., Semmler R.: FEBS Lett. *148*, 35 (1982).
24. Hilbi H., Dehning I., Schink B., Dimroth P.: Eur. J. Biochem. *207*, 117 (1992).
25. Oh S., Kogure K., Ohwada K., Simidu U.: Appl. Environ. Microbiol. *57*, 1844 (1991).
26. Tokuda H., Unemoto T.: J. Biol. Chem. *259*, 7785 (1984).
27. Dimroth P., Thomer A.: Arch. Microbiol. *151*, 439 (1989).
28. Gemperli A. C., Dimroth P., Steuber J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 839 (2003).
29. Turk K., Puhar A., Neese F., Bill E., Fritz G., Steuber J.: J. Biol. Chem. *279*, 21349 (2004).

30. Wilson T. H., Ding P. Z.: Biochim. Biophys. Acta *1505*, 121 (2001).
31. Dimroth P., Thomer A.: J. Biol. Chem. *265*, 7721 (1990).
32. Dimroth P.: Biochim. Biophys. Acta *1318*, 11 (1997).
33. Hunte C., Screpanti E., Venturi M., Rimon A., Padan E., Michel H.: Nature *435*, 1197 (2005).
34. Krulwich T. A.: Mol. Microbiol. *15*, 403 (1995).
35. Šurín S.: Chem. Listy *99*, 633 (2005).
36. Majerník A.: Chem. Listy *91*, 114 (1997).
37. Imae Y., Atsumi T.: J. Bioenerg. Biomembr. *21*, 705 (1989).
38. Laubinger W., Dimroth P.: Eur. J. Biochem. *168*, 475 (1987).
39. Reidlinger J., Müller V.: Eur. J. Biochem. *223,* 275. Erratum in: Eur. J. Biochem. *226*, 1079 (1994).
40. Neumann S., Matthey U., Kaim G., Dimroth P.: J. Bacteriol. *180*, 3312 (1998).
41. Dimroth P., Kaim. G., Matthey U.: J. Exp. Biol. *203*, 51 (2000).
42. Hase C. C., Fedorova N. D., Galperin M. Y., Dibrov P. A.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. *65*, 353 (2001).

Z. Nováková and P. Šmigáň *(Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic):* **Cycle of Sodium Ions in Bacteria and Methanoarchaea**

This review discusses the progress of bioenergetic studies on the role of Na^+ in bacteria and Archaea. Na^+ ions have at least four functions in bacterial and Archaeal cells, namely in the Na^+-ion X cotransport system, Na^+-coupled energy transformation, pH homeostasis mechanisms, and activation of special enzymes. Thus, in a number of bacteria and Archaea, endergonic and the exergonic membrane-associated processes are linked by the cycling of Na^+ ions which shows that Na^+, under certain conditions, can substitute H^+ as the coupling ions. This review also discusses some problems related to the Na^+ cycle in human pathogens.

Chem. Listy *102*, 327−337 (2008) Referát

METODY STANOVENÍ LEPKOVÝCH BÍLKOVIN V POTRAVINÁCH

PETR HULÍN[a], PAVEL DOSTÁLEK[a] a IGOR HOCHEL[b]

[a] Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, [b] Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
petr.hulin@vscht.cz

Došlo 2.6.07, přijato 19.7.07.

Klíčová slova : ječmen, prolaminy, lepek, alergenní struktury, imunoanalýza

Obsah

1. Úvod
2. Prolaminy a jejich struktura
   2.1. Prolaminy pšenice
   2.2. Prolaminy ječmene
3. Alergenní vlastnosti prolaminů – celiakie, bezlepkové potraviny
   3.1. Denní příjem lepku
   3.2. Alergenní peptidové struktury
4. Metody stanovení prolaminů
   4.1. Extrakce
   4.2. Metody stanovení lepkových bílkovin – ELISA
      4.2.1. ELISA s použitím polyklonálních protilátek
      4.2.2. ELISA s použitím monoklonálních protilátek
      4.2.3. Přehled publikovaných metod s využitím monoklonálních protilátek
      4.2.4. Komerční soupravy používané pro imunochemické stanovení prolaminů v potravinách
   4.3. Další metody využitelné pro stanovení lepkových bílkovin
      4.3.1. Elektroforetické metody
      4.3.2. Chromatografické metody
      4.3.3. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)
      4.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)
5. Závěr

1. Úvod

Obiloviny čeledi lipnicovitých trav mohou způsobovat podmíněnou alergii při vdechnutí nebo inhalaci. Daleko větší pozornosti se ale dostává proteinům těchto obilovin, které jsou spojovány s celiakií. Toto geneticky podmíněné onemocnění se vyskytuje u 0,5 % evropské populace a jedinou doposud používanou léčbou je striktní dodržování „bezlepkové diety“, která je založena na potravinách s vyloučením obsahu bílkovin pšenice, ječmene a žita.

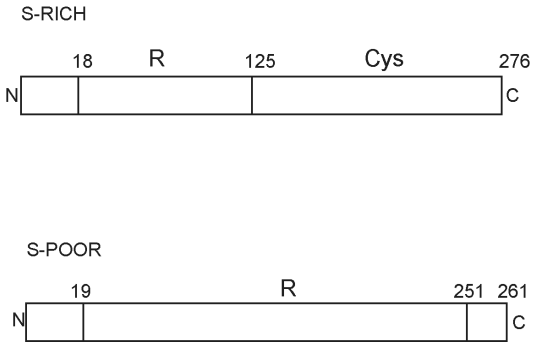
Proteiny odpovědné za tuto imunitní odezvu představuje především tzv. prolaminová frakce obilných bílkovin, která je historicky vyčleněna na základě sekvenční extrakce jako rozpustná v ethanolu. Prolaminy obecně obsahují vysoké procentuální zastoupení glutaminu a prolinu a společně s gluteninovými bílkovinami potom představují lepek, elastickou hmotu obilnin se značným technologickým významem.

Pro potravinářskou kontrolu „bezlepkových“ potravin je nutná přítomnost skupiny věrohodných a dostatečně specifických analytických systémů. Pro stanovení prolaminové frakce cereálních proteinů bývá používána široká paleta elektroforetických, chromatografických a imunochemických metod. Posledně jmenované se díky své citlivosti a specifitě dostávají v poslední době do popředí zájmu potravinářských chemiků. Imunochemické metody jsou také ve srovnání s ostatními technikami levnější a poskytují výsledky v relativně krátkém čase.

V posledních desetiletích bylo publikováno velké množství prací, které se zabývaly přípravou protilátky a sestavením testu na stanovení zejména gliadinů pšenice většinou pomocí metody ELISA v sendvičovém uspořádání.

2. Prolaminy a jejich struktura

Klasifikace zásobních proteinů obilovin je historicky založena na tzv. Osbornově[1] postupné extrakci a rozdílné rozpustnosti bílkovin, což vedlo k jejich rozdělení do čtyř základních skupin: *1*) albuminy rozpustné ve vodě; *2*) globuliny rozpustné ve vodných roztocích solí; *3*) prolaminy rozpustné ve vodných roztocích alkoholů (např. ethanol, propanol); *4*) gluteliny rozpustné až v roztocích kyselin nebo zásad. Jelikož každá z těchto skupin obsahuje velké množství jednotlivých proteinů s částečně rozdílnými vlastnostmi, byly vypracovány další pohledy na klasifikaci těchto látek. Nové možnosti získávání dat o bílkovinných strukturách a vlastnostech umožňují rozdělovat proteiny na základě poznání vztahu aminokyselinových sekvencí a trojrozměrných struktur, což umožňuje klasifikaci tzv. bílkovinných čeledí, zahrnujících i jinak značně odlišné proteiny. Nejrozsáhlejší databází rostlinných bílkovin je Pfam databáze sestavená na Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK. Podle strukturních a funkčních vlastností byly prolaminy rozděleny do tří skupin a to na S-Poor (chudé na síru), S-Rich (bohaté na síru) (obr. 1) a HMW prolaminy. Cysteinové zbytky se přitom u S-Rich prolaminů vyskytují převážně v *C*-koncové části peptidového řetězce. Sekvence a homologie domén cereálních proteinů umožňuje identifikaci prolaminové „nadčeledě“, která je jednou z nejrozšířenějších skupin rostlinných bílkovin a zahrnuje zásobní proteiny semen obilovin, nízko-



Obr. 1. **Schéma rozdílné struktury S-Rich a S-Poor prolaminů;** R – úseky složené z repetitivních sekvenci (PQQPFPQ), Cys – výskyt cysteinových můstků[3,4,6]

molekulární proteiny bohaté na síru a některé glykoproteiny buněčné stěny, stejně jako několik hlavních typů rostlinných alergenů[2–5].

Prolaminové frakce bílkovin obilovin podčeledi *Triticeae* jsou nazývány gliadiny u pšenice, hordeiny u ječmene, sekaliny u žita a aveniny u ovsa. Nacházejí se především v aleuronové vrstvě zrna, kde plní zejména zásobní funkci při klíčení a vývoji rostliny. Obsah zásobního dusíku je zajištěn vysokým zastoupením glutaminu a prolinu[6].

Lepkové bílkoviny pšenice je možno dále rozdělit do pěti skupin podle molekulové hmotnosti. Rozdělení proteinů ostatních cereálií metodou HPLC se od pšenice značně liší, např. žito obsahuje hydrofilní ω-sekaliny a hydrofobní γ-sekaliny, naproti tomu ječmen neobsahuje hydrofilní frakce. Nižší afinitu k nepolární fázi mají C-hordeiny následované hydrofobními B-hordeiny. Chromatogram proteinů lepku ovsa je tvořen dvěma blízkými hydrofobními frakcemi[7].

Mezi vysokomolekulární složky prolaminů je možno zahrnout příbuzné HMW podjednotky gluteninů a podobné proteiny ječmene a žita (D-hordein, HMW sekalin). Gluteninové podjednotky představují asi 10 % lepkových bílkovin a jsou rozdělovány podle počtu cysteinových zbytků v *N*-koncové části řetězce na X-typy (mol. hm. ~ 83 až 88 kDa) a Y-typy (mol. hm. ~ 67–74 kDa). Gluteninové podjednotky obsahují vysoké procento glycinu, prolinu a glutaminu. V nativní formě tvoří polymerní struktury, které mohou obsahovat i podjednotky S-Rich prolaminů. HMW a LMW podskupiny gluteninů je možno snadno identifikovat pomocí SDS-PAGE po předešlém vyloučení gliadinových frakcí[2,4,8].

Všechny repetitivní sekvence S-rich proteinů obsahují sekvenční motiv tetrapeptidu PQQX* (tedy PQQPFPQ u γ-gliadinů a γ-sekalinů, PQQPFPQQ u γ-hordeinů, PQQPT u α-gliadinů, PQQQPPFS u agregovaných pšeničných prolaminů a PQQPX u B_1-hordeinů) a do jisté míry korespondují se sekvencemi QQPT a PQQPFPQQ u C-hordeinů. Logickým vysvětlením této podobnosti se zdá být domněnka o společném evolučním základu těchto proteinů[4,6,9].

V molekule S-rich prolaminů se nacházejí 3 nerepetitivní sekvence u *C*-koncové části, které obsahují 25–30 aminokyselinových zbytků a jsou označovány A, B a C. Sekvence A, B, C jsou obsaženy také v molekule HMW prolaminů, ale v tomto případě jsou místa A a B umístěna na *N*-koncové části molekuly a úsek C na *C*-koncové části molekuly. S-poor prolaminy (např. hordein C) se patrně vyvinuly z S-rich prolaminů postupnou amplifikací repetitivních domén následovanou delecí nerepetitivních domén s výjimkou pozůstatku C regionu[4,6,7].

Tabulka I udává podílové zastoupení jednotlivých skupin bílkovin v různých obilovinách, hodnoty jsou ale do jisté míry závislé na odrůdě, pěstební lokalitě a ročníku sklizně.

2.1. Prolaminy pšenice

Nejvíce prozkoumanou skupinou prolaminů z hlediska chemické struktury jsou gliadiny pšenice. Jejich aminokyselinové složení je typické vysokým obsahem glutaminu (36–45 %) a prolinu (14–30 %). Naopak nízké je zastou-

Tabulka I
Zastoupení jednotlivých skupin bílkovin v běžných obilovinách[7]

Obilovina	Albumin [%]	Globulin [%]	Prolamin [%]	Glutelin [%]
Pšenice	14,7	7,0	32,6	45,7
Žito	44,4	10,2	20,9	24,5
Ječmen	12,1	8,4	25,0	54,5
Oves	20,2	11,9	14,0	53,9
Rýže	10,8	9,7	2,2	77,3
Kukuřice	4,0	2,8	47,9	45,3

* jednopísmenné zkratky pro značení aminokyselin: A=Ala, C=Cys, D=Asp, E=glu, F=Phe,G=Gly, H=His, I=Ile, K=Lys, L=Leu, M=Met, N=Asn, P=Pro, Q=Gln, R=Arg, S=Ser, T=Thr, V=Val, W=Trp, Y=Tyr

pení aminokyseliny tryptofanu a poněkud méně jsou obsaženy kyseliny asparagová a glutamová a bazické aminokyseliny. Nízký obsah polárních aminokyselin souvisí s malou rozpustností gliadinu ve vodě. Gliadin je složen z celé řady bílkovinných komponent, jejichž počet se odhaduje na cca padesát jednotlivých proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 30–75 kDa (cit.[4,9]).

První pokusy o jejich rozdělení gelovou elektroforézou nebo katexovou chromatografií vyústily v jejich rozdělení na α- ,β- , γ- a ω-gliadiny podle klesající mobility. Pozdější studie aminokyselinových sekvencí těchto proteinů prokázaly, že neexistuje zcela přímá spojitost mezi pohyblivostí proteinů v gelu a jejich základní strukturou, takže se nakonec α- a β-gliadiny sloučily do jedné skupiny jako α-gliadin, dále došlo k rozdělení ω-gliadinů na ω-5 a ω-1,2 gliadiny (cit.[9]).

ω-Gliadiny se skládají téměř výhradně z repetitivních aminokyselinových sekvencí složených z jednotek jako PQQQF nebo PQQPFPQQ. Prolin, glutamová kyselina a fenylalanin reprezentují téměř 80 % aminokyselin, naopak cystein se nevyskytuje vůbec. γ-Gliadin se liší od α- a β-gliadinů v aminokyselinovém složení, a to přítomností asparagové kyseliny, prolinu, methioninu, tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu. Podle rozdílné *N*-koncové sekvence vznikly tři podskupiny ω-gliadinů, které byly dále vztaženy k C-hordeinu a ω-sekalinu. α- a β-Gliadiny obsahují ve svých řetězcích šest molekul cysteinu, které tvoří tři intramolekulární disulfidové můstky (tab. II). Nerepetitivní úsek obsahuje značné množství α-helixů, repetitivní doména je ve srovnání s γ-gliadiny značně nepravidelná. γ-Gliadiny obsahují v *C*-koncovém úseku osm molekul cysteinu tvořících intramolekulární disulfidové vazby. Jednotlivé skupiny se rozlišují hlavně podle *N*-koncového aminokyselinového složení. Jejich zastoupení v rámci celkových gliadinů je variabilní podle odrůdy a růstových podmínek rostlin, přesto je možno říci, že nejvíce je zastoupen α-typ následovaný γ-typem, zatímco ω-typy se vyskytují v mnohem menší míře[6,7,9–12].

Pšeničný lepek (gluten) byl poprvé popsán Beccarim v roce 1745 (cit.[4]). Tato hmota se vyznačuje vysokou elasticitou vlivem obsahu polymerních gluteninů a viskozitou, která je způsobena hlavně přítomností monomerních gliadinů. Právě tyto neobvyklé vlastnosti mají zásadní vliv na využití pšenice v potravinářské výrobě. V současné době lze nashromáždit několik známých definicí lepku (glutenu)[7,13]:

1. Viskoelastická hmota, složená ze dvou třetin z vody a z jedné třetiny z hydratovaných gliadinových a gluteninových proteinů[7].
2. Viskoelastická hmota, která zbude z pšeničného těsta po vymytí ostatních složek vodou[11].
3. Směs vodou nerozpustných proteinů vyskytující se u některých obilovin (pšenice, žito, ječmen)[14].
4. Proteiny pšenice, žita a ječmene rozpustné v ethanolu, které u citlivých jedinců vyvolávají imunitní odpověď vedoucí k histologickým změnám sliznice tenkého střeva[15].
5. Směs nerozpustných proteinů obilovin s rovnoměrným zastoupením gliadinu a gluteninu[16].

Z uvedených definic je patrné, že výhodnější a srozumitelnější je se pojmu lepek vyhnout a zabývat se pouze prolaminy, které představují již tak značně komplexní analyt.

2.2. Prolaminy ječmene

Hordeinová frakce ječmene zahrnuje HMW (výšemolekulární frakce) D-hordein, C-hordein a LMW (nížemolekulární frakce) B-hordein. D-Hordeiny jsou značně podobné HMW frakci pšeničných proteinů.

C-Hordeiny se sestávají ze 4–15 jednotlivých proteinů, v závislosti na kutlivaru a jejich molekulová hmotnost se obvykle pohybuje mezi 55–70 kDa, jejich typickým znakem jsou repetitivní sekvence složené převážně z oktapeptidu PQQPFPQQ, dále pak pentapeptidu PQQPT poblíž *N*-koncové části. Složení repetitivního oktapeptidu (4× Gln, 3× Pro, 1× Phe) odpovídá i poměrnému zastoupení těchto aminokyselin v celém proteinu. C-Hordeiny neobsahují cystein, v jednom molu obsahují 1 methionin a 0–2 lysinové zbytky. Sekundární struktura těchto bílkovin se vyznačuje výskytem repetitivních sekvencí vedoucích ke vzniku β-ohybu a β-hřebenů[4,6,7,17].

B-hordeiny tvoří 80–90 % všech prolaminů ječmene a jejich aminokyselinové složení je zhruba podobné se složením ostatních S-Rich prolaminů, tedy α- , β- , γ-gliadinů a γ-sekalinů. Struktura B-hordeinů obsahuje ob-

Tabulka II
Aminokyselinová sekvence α-gliadinu[9]

Doména Ia	1	VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFLG
	33	QQQP-FP-PQQPYPQPQP-FP-SQQPYLQLQP-FPQPQLPYSQPQP-FR-PQQP
Doména Ib	80	YPQPQPQYSQPQQPIS
Doména II	96	QQQQQQQQQQQQQQQQ
	114	ILQQILQQQLIFCMDVVLQQHNIAHGRSQV----
Doména III	148	LQQSTYQLLQELCCQHLQWQIPEQSQCQAIHNVVHAIIL
Doména IV	182	HQQQKQQQQPSSQVSFQQPLQQYPLGQGSFRPSQQN
Doména V	218	PQAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALQTLPAMCNVYIAPYC-TI-APFGIFGTN

vykle *C*-koncovou část složenou z repetitivních sekvencí bohatých na prolin, *N*-koncovou část obsahující cysteinové řetězce a konformačně se značně podobá odpovídajícím proteinům gliadinové frakce pšenice s mírně zvýšeným podílem β-hřebenů. Molekulová hmotnost bílkovin této frakce se pohybuje obvykle v rozmezí 20−50 kDa. Dvourozměrná elektroforetická analýza B-hordeinových frakcí je rozdělila na B_1- a B_3-hordeiny s molekulovými hmotnostmi okolo 35 kDa a 45 kDa. Jednotlivé proteiny B_1-hordeinů se mezi sebou liší inzercí, delecí či substitucí jednotlivých aminokyselin, zatímco B_3-hordeiny se navíc ještě vzájemně odlišují organizací repetitivních domén[7,10,11,17,18].

3. Alergenní vlastnosti prolaminů – celiakie, bezlepkové potraviny

Ekvivalentními pojmy k celiakii jsou glutensenzitivní enteropatie, Gee-Harterův syndrom, alergie na lepek apod. Osoby trpící tímto geneticky podmíněným onemocněním jsou odkázány na doživotní dodržování tzv. bezlepkové diety, musí tedy ze své stravy vyloučit prakticky jakékoliv množství bílkovin a peptidů pocházejících z prolaminů obilovin podčeledi *Triticeae*.

Poprvé byla celiakie popsána Samuelem Gee v roce 1888 jako nemoc objevující se nejčastěji u dětí. Teprve roku 1941 publikoval Willem Dicke své objevy ohledně blahodárného účinku „bezpšenične“ diety na pacienty stižené celiakií. Od té doby se již objasnilo, že komponentou pšenice, která je toxická pro celiaky, jsou zásobní lepkové bílkoviny. Lepkové bílkoviny obsahují velké procento glutaminu a prolinu (odtud anglický název gluten).

Požití lepku u pacientů trpících celiakií vede k poškození sliznice tenkého střeva. Rozsah těchto změn ve střevní architektuře může být klasifikován pomocí modifikované Marshovy stupnice od intraepiteliální lymfocytosy až po naprostou atrofii střevních klků.[15] Příznaky, které je možné sledovat u osob stižených celiakií, zahrnují typické projevy alergie na potravu, tedy průjem, malabsorbci, bolesti kostí, v některých případech anémii a přidruženou kožní vyrážku (dermatitis herpetiformis). Dodržováním striktní bezlepkové diety dochází k eliminaci příznaků a regeneraci poškozené střevní tkáně. Základní a doposud užívanou diagnostickou metodou je v případě celiakie histologické vyšetření poškození tenkého střeva pomocí duodenální biopsie.

Patogenetický mechanismus působení alergenních bílkovin není ještě zcela objasněn, je však zřejmé, že prolaminové proteiny jsou parciálně hydrolyzovány trávícími enzymy a vzniklé peptidy prochází stěnou střevní sliznice do prostřední epitelové vrstvy (lamina propria). Mechanismus tohoto průchodu není plně objasněn. Další interakce se účastní enzym tTG (tissue transglutaminase EC 2.3.2.13), který specificky deaminuje část molekul glutaminu na glutamovou kyselinu. To peptidu umožní specificky nekovalentně interagovat s buňkami prezentující antigen (APC-antigen presenting cell) HLA–DQ2, nebo DQ8, které zajišťují reakci peptidu s T-lymfocytem, čímž dochází k alergenní odezvě. Mechanismus zahrnuje tedy větší množství faktorů[19,20].

Z epidemiologického hlediska je celiakie onemocnění vyskytující se převážně u lidí euroasijského typu, postihuje častěji ženy než muže a do nedávné doby bylo toto onemocnění považováno za vzácné. Nedávné studie však objevily rozšíření celiakie v populaci v míře okolo 0,4 %, čímž se tato nemoc stává jednou z nejběžnějších alergií na potravu vůbec[21]. Vývin celiakie je podmíněn jednak vnějšími faktory, jednak životním prostředím. Z hlediska dědičnosti hraje klíčovou roli gen pro kódování dimerního imunoproteinu HLA-DQ, který je u nemocných lidí pozměněn. Pravděpodobnost společného výskytu celiakie u sourozenců je 0,1 (děleno výskytem v populaci 0,004 udává relativní koeficient pravděpodobnosti 25), u dvouvaječných dvojčat 0,2 a u jednovaječných dvojčat 0,86, což poukazuje jednak na silné genetické podmínění výskytu choroby, na druhé straně potvrzuje vliv dalších geneticky nepodmíněných faktorů vzniku onemocnění. Mezi tyto faktory patří charakter konzumace lepku v postkojeneckém období u dětí[19]. Riziko onemocnění celiakií snižují malé dávky lepku ještě v době kojení, naopak toto riziko se zvyšuje s velkými nárazovými dávkami v potravě bez předešlé přípravy. Další faktory nejsou ještě zcela prozkoumány, ale je pravděpodobné, že riziko onemocnění mohou zvyšovat různé infekce a existence jiných autoimunitních onemocnění. Je také prokázáno, že se celiakie vyskytovala více u dětí narozených v létě než u lidí narozených v jiných měsících[21,22].

3.1. Denní příjem lepku

Bezlepkové potraviny pro celiaky by v optimálním případě neměly obsahovat jakékoliv stopová množství alergenních peptidů, v zásadě by měly pocházet ze surovin s vyloučením i příměsí relevantních obilovin. Z technických a praktických důvodů je však dodržení takto striktních podmínek téměř neproveditelné. Dlouhodobý denní příjem lepku v potravě celiaků, který by byl tolerovatelný z hlediska vymizení symptomů a regenerace stěny tenkého střeva je značně individuální a nebyl doposud jednoznačně určen[23−25].

Představitelem tolerantnějšího přístupu k dennímu příjmu lepku je práce Collina a spol.[26], ve které limit příjmu okolo 30 mg lepku za den nebyl zjištěn jako závadný z hlediska fyziologických změn tkáně tenkého střeva. K měření koncentrací byla použita komerční souprava Ridascreen Gliadin kit (R-Biopharm). Situaci však komplikuje individuální reakce pacientů na příjem lepku a jeho každodenní množství.

3.2. Alergenní peptidové struktury

Alergenní účinky prolaminů jsou úzce spjaty s vysokým obsahem glutaminu a prolinu v aminokyselinovém řetězci. Toxicita gliadinu je široce známa a není eliminována po hydrolýze těchto bílkovin trávícími enzymy

(pepsin, trypsin, pankreatin). Toxické jsou dokonce i peptidy s molekulovou hmotností pod 1000 Da. Intaktní terciární struktura ani zachování disulfidových můstků není podmínkou pro vyvolání imunitní odpovědi, jejímu vyvolání zamezí pouze celková hydrolýza nebo kompletní deamidace glutaminu v prolaminových štěpech[9,11,27,28].

Nepříliš jednoznačně se jeví alergenní aktivita gluteninových bílkovin. De Vincenzi a spol.[29] prokázali toxicitu gluteninu *in vitro*, zvláště pak účinky LMW gluteninů, které obsahují peptidové sekvence značně podobné gliadinovým. Gluteninové bílkoviny je zároveň značně problematické zbavit prolaminových příměsí.

Toxicita prolaminových frakcí pocházejících z pšenice, žita a ječmene byla dostatečně prokázána. Názory na alergenní vlastnosti ovesných bílkovin se doposud různí, ovesné prolaminy tvoří asi jen 10 % celkových bílkovin, což by mohlo zdůvodnit vyšší míru tolerance u některých pacientů. Problematická je také možná kontaminace ovesného zrna jinými druhy obilovin[9,30].

Bylo provedeno srovnáním primární struktury a toxicity pepsin-tryptických štěpů α-gliadinu, tedy strukturně podobných peptidů B3141-B3146, odvozených od *N*-koncové části A-gliadinu (např. aminokyselinové složení štěpu B3143 je PVPQLQPQNPS-QQQPQEQVPLVQQQ-QFPGQQQQFPPQQPYPQPQPFPSQQPYL). Tyto proteiny jsou z hlediska své prokázané alergenní aktivity vhodnými představiteli gliadinů a byly vyvinuty postupy jejich rutinní přípravy[9,27].

Berti a spol.[31] testovali reakci IgA frakce protilátek získaných od pacientů s neléčenou celiakií. Kompetitivní ELISA vyvinutá k účelu kvantifikace reakce těchto IgA s různými proteiny v potravě odhalila nulovou křížovou reakci se zeiny a hovězím sérovým albuminem, zato však nenulovou křížovou reakci s kaseiny (kravského a kozího mléka). Tato křížová reakce naznačuje tendenci IgA celiaků vázat se převážně na lineární epitopy.

4. Metody stanovení prolaminů

4.1. Extrakce

Prvním krokem je extrakce prolaminových bílkovin ze vzorku zředěným ethanolovým roztokem. Koncentrace ethanolu se obvykle pohybuje mezi 40 % a 70 % (v/v). Vlastnosti získaného roztoku ovlivňuje kromě koncentrace ethanolu řada parametrů, jako např. teplota, použití ultrazvuku, případně přidání redukčních činidel k extrakčnímu roztoku[32–37].

Pro získání lépe definovatelných skupin látek je dále možno frakcionovat extrahované peptidy a proteiny elektroforetickými a chromatografickými metodami[35,38,39].

4.2. Metody stanovení lepkových bílkovin – ELISA

Pro stanovení lepkových bílkovin v potravinách jsou určující limity zavedené v Codexu Alimentarius (revidovaný standard CX/NFSDU 00/1). Pro analytické účely se běžně předpokládá, že lepek je z poloviny tvořen prolaminy a z poloviny gluteniny.

Hlavním problémem stanovení koncentračních limitů je neúplná charakterizace heterogenního analytu, který navíc může podléhat různým tepelným a enzymovým degradacím při technologických úpravách[11].

V poslední době bylo publikováno velké množství metod pro stanovení lepku v potravinách. Jejich principem bývá buď detekce prolaminových bílkovin, nebo detekce pšeničné DNA.

Nejpoužívanější metodou ke stanovení prolaminů je enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA), založená na interakci specifické protilátky s antigenem.

Nejčastěji bývá ELISA prováděna v tzv. sendvičovém uspořádání, které je založeno na postupném vytvoření zakotvených komplexů protilátka-antigen-enzymově značená protilátka.

Dalším častým typem technik ELISA je kompetitivní imunochemické stanovení, které dovoluje detegovat antigeny s jedním vazebným místem pro protilátku, případně antigeny, jejichž prostorové uspořádání nedovoluje vytvoření „sendvičového" komplexu se dvěma navázanými protilátkami[40–42]. Výsledky různých uspořádání se pro řadu analytů mohou výrazně různit i za použití stejné protilátky[43,44].

Analýza prolaminů v reálném vzorku je závislá i na fyzikálně-chemických dějích v průběhu technologického procesu výroby. Zahřátí extrahovaného materiálu na teploty kolem 100 °C a výše výrazně ovlivňuje extrahovatelnost a imunochemickou reaktivitu extraktů[37,45].

4.2.1. ELISA s použitím polyklonálních protilátek

Použití polyklonálních protilátek (PAb) pro tento druh imunochemických stanovení má své opodstatnění z hlediska nižší ceny a jednodušší přípravy. Většina experimentů s PAb proběhla v 80. letech minulého století, než se staly specifičtější monoklonální protilátky lépe dostupné. Byly testovány různé formáty a analytické schopnosti sestavených metod[46–48].

Ciclitira a spol.[46] vyvinuli kompetitivní radioimunoanalýzu pro stanovení α-gliadinů bez schopnosti detegovat proteiny příbuzných cereálií (žito, ječmen, oves).

Troncone a spol.[49] sestavili sendvičovou metodu se dvěma různými protilátkami pro stanovení gliadinu pšenice. Toto uspořádaní dosáhlo větší citlivosti než inhibiční EIA, avšak vykazovalo křížové reakce i s bílkovinami rozpustnými v ethanolu kukuřice a rýže.

Chirdo a spol.[41] použili polyklonální protilátky proti komerčnímu gliadinu (Sigma Chemical Co.) k sestavení nepřímé kompetitivní ELISA metody s detekčním limitem pro stanovení lepku 1 ppm. Bylo provedeno srovnání detekční schopnosti této metody s komerční soupravou (Cortecs diagnostics, UK). Citlivost dané metody se řádově snižovala pro jiné analyty než čistý gliadin, jako jsou prolaminy příbuzných obilovin nebo tepelně opracované výrobky. Autoři dále zaznamenali negativní vliv zvýšené koncentrace ethanolu (4 %) na imunoreaktivnost protilátek.

4.2.2. ELISA s použitím monoklonálních protilátek

Příprava monoklonálních protilátek (MAb) je z principu náročnější, delší a finančně nákladnější. Nicméně výhody definovaného individua získané imunoglobulinové frakce jsou pro sestavení imunochemické metody stěží nahraditelné. Dřívější metody využívající polyklonálních protilátek proti prolaminové frakci určitého druhu obiloviny dosahovaly logicky nižší specifity vůči potenciálně alergenním peptidům a pro kvantifikaci prolaminů v nízkých koncentracích se již nepoužívají. Volba vhodných protilátek je klíčovým krokem celého stanovení. Je třeba, aby protilátky reagovaly s prolaminovými bílkovinami všech toxických druhů obilovin.

ELISA s použitím monoklonálních protilátek proti ω-gliadinu

Tyto monoklonální protilátky obvykle bývají specifické k repetitivním aminokyselinovým úsekům specifickým pro jednu bílkovinnou frakci, což může negativně ovlivňovat přesnost stanovení z důvodu rozdílné kompozice obiloviny standardu a vzorku. V případě stanovení bílkovin ječmene se protilátky spojují se sekvencemi hordeinové frakce s repetitivními sekvencemi, které jsou ekvivalentní k sekvencím ω-gliadinové frakce. Vzhledem k tomu, že ω-gliadiny se téměř celkově skládají z repetitivních aminokyselinových sekvencí, je možné předpokládat, že většina monoklonálních protilátek postavených proti specifické repetitivní sekvenci bude mít patrně vyšší afinitu k ω-gliadinové frakci než k ostatním skupinám gliadinů[11,14].

ELISA s použitím protilátek proti toxickému peptidovému úseku

Monoklonální protilátky jsou zde specifické vůči jednomu danému aminokyselinovému úseku, případně s přidružením úseků velmi podobných. Protilátky detegující předpokládanou toxickou sekvenci proteinového řetězce jsou v poslední době často využívány pro stanovení lepku. Sekvence bývají voleny na základě poznatků o struktuře a alergenní aktivitě gliadinů, většinou na základě primární struktury repetitivních domén peptidů s klinicky prokázanou toxicitou[11,14].

4.2.3. Přehled publikovaných metod s využitím MAb

Prvním opravdu úspěšným pokusem na sestavení ELISA metody byla práce Skerritta a Hillové, která využívala monoklonální protilátky proti tepelně odolným ω-gliadinům. Metoda dosahovala detekčního limitu okolo 10 ppm s možností kvantifikace lepku nad 100 ppm. Jako referenčního materiálu pro kvantifikaci bylo použito gliadinového standardu, připraveného extrakcí pšeničné mouky 40% ethanolem. Tato metoda byla dlouhou dobu jako jediná přijata AOAC (Association of Official Analytical Chemists) pro stanovení lepku v potravinách a stala se základem prvních komerčních kitů. Tepelně odolné ω-gliadiny jsou nicméně minoritní prolaminovou frakcí bílkovin pšenice a strukturně se skládají převážně z repetitivních domén[50–52]. Vlivem vazby protilátky na sekvence minoritně zastoupených ω-gliadinů může značná heterogenita nedefinovaného analytu s proměnným podílem jednotlivých bílkovinných frakcí vést k zavádějícím výsledkům zastoupení všech lepkových bílkovin ve vzorku. Tyto nedostatky byly o to citelnější, dokud byla tato protilátka jedinou uznávanou alternativou. Určitou výhodu této metody lze naopak spatřovat v minimalizaci problémů při stanovení proteinů, které prošly tepelnou úpravou[9,50].

Ellis a spol.[36,53] použili pro metody stanovení gliadinu monoklonální protilátku, která byla získána imunizací myší peptidem B3144. Tento peptid je podobný A-gliadinu a vzniká při štěpení α-gliadinu pepsinem a trypsinem. Autoři dále vyvinuli metodu ELISA založenou na monoklonální protilátce proti peptidu tvořenému 19 aminokyselinami, který je obsažen v A-gliadinu. A-Gliadin je tvořen skupinou plně definovaných agregovatelných proteinů patřících mezi α-gliadiny, které prokazatelně vyvolávají alergenní reakci u osob s celiakií[9]. Detekční limit v sendvičovém uspořádání s polyklonální králičí protilátkou zachycenou na pevné fázi a sekundární monoklonální protilátkou činil pro α-gliadin 0,08 mg na kg extrahovaného materiálu, pro β- a γ-gliadin byl asi 4× vyšší a pro ω-gliadin a prolaminy jiných alergenních cereálií se citlivost snižovala již řádově. Autoři ovšem zaznamenali, že metoda značně podhodnocuje obsah prolaminů po předchozím zahřátí vzorku na teploty nad 90 °C (cit.[36]).

Stejná protilátka byla později použita pro konstrukci nepřímé kompetitivní ELISA metody s detekčním limitem 0,128 ppm gliadinu. V různých uspořádáních byla protilátka schopna detegovat jak specificky pouze gliadin, tak i prolaminy ostatních cereálií. Autoři zároveň zkoumali vliv přídavku redukujících činidel v extrakčním kroku a zaznamenali značné snížení citlivosti metody. Problém s detekcí gliadinu v tepelně opracovaných vzorcích tedy vyřešen nebyl[54].

Předešlé metody poměrně úspěšně kvantifikovaly gliadiny pšenice ve vyšších koncentracích, posléze byly vyvinuty další postupy, které umožňovaly detekci prolaminů pšenice, žita i ječmene. Např. ELISA se dvěma imobilizovanými protilátkami pro zachycení prolaminových antigenů a třetí konjugovanou protilátkou umožnila stanovit hordeiny s detekčním limitem 1,5 ppm (cit.[34]).

Brett a spol.[55] charakterizovali skupinu široce specifických monoklonálních protilátek zaměřených proti gluteninové frakci pšeničných bílkovin, které reagovaly jak s gliadiny, tak i s vysokomolekulárními prolaminy ječmene a ovsa.

Dalším zásadním krokem k určení problematických koncentrací prolaminů bylo použití monoklonální protilátky R5, která byla připravena imunizací myší ethanolovým extraktem žita. Tato protilátka je specifická k peptidovým úsekům QQPFP, QQQFP, LQPFP a QLPFP s předpokládanou alergenní aktivitou. Byla použita v sendvičové metodě ELISA, která umožňuje stanovit alergenní prolaminy většiny obilovin s výjimkou prolaminů ovsa. Detekční limit stanovení byl 3 ppm lepku v potravinách. Metoda byla validována a uvedena v Codexu Alimentarius (IV_E20) jako referenční metoda. V současné době tvoří také základ několika komerčních souprav[56–60].

Protilátka R5 byla využita i v kompetitivním uspořádání metody ELISA. Toto uspořádání eliminuje chybu stanovení vzniklou přítomností nízkomolekulárních prolaminových peptidů a jejich neschopností vytvářet komplex protilátka-antigen-značená protilátka[61].

Chirdo a spol.[40,41] použili pro kvantifikaci gliadinu streptavidin-biotinový amplifikační systém v sendvičovém i kompetitivním imunochemickém stanovení. Použitá monoklonální protilátka byla specifická ke gliadinu, hordeinu a sekalinu. Detekční limit kompetitivní ELISA metody byl 20 ng gliadinu na ml, detekční limit metody v sendvičovém uspořádání dosahoval hodnot 1 ng gliadinu na ml.

Analýza jiných než pšeničných prolaminů závisí na specifitě konkrétní protilátky v daném uspořádání. Rovněž není uspokojivě dořešena problematika záchytu produktů tepelných a enzymových přeměn hordeinů[42,43,62].

4.2.4. Komerční soupravy používané pro imunochemické stanovení prolaminů v potravinách

Protilátky vyvinuté pro metody ELISA nacházejí více či méně úspěšně komerční uplatnění při výrobě analytických souprav pro stanovení prolaminů. Následující tabulka uvádí přehled prodávaných sestav a jejich základní charakteristiky. Použitá protilátka je obvykle buď specifická k ω-gliadinu, nebo k pentapeptidu QQPFP (R5). Soupravy, jejichž výrobci deklarují schopnost analytického systému detegovat prolaminy všech tří alergenních obilovin (pšenice, ječmen, žito), bývají založené na kombinované metodě ELISA, ve které je použito kombinace protilátek proti různým prolaminům.

Následující tabulka III udává přehled některých souprav uvedených na trh. Uvedené charakteristiky jednotlivých výrobků odpovídají údajům uváděným výrobcem případně vlastnostem zjištěných při vývoji metod nebo srovnávacích studiích. Koncentrační údaje jsou uvedeny v ppm gliadinu, což bývá obvykle chápáno jako polovina obsahu lepku (glutenu).

Protilátka proti ω-gliadinům je principiálně výhodnější pro stanovení potravin, které prošly tepelnou úpravou. V poslední době se ale více prosazují protilátky specifické proti toxickým sekvencím α-gliadinů, neboť jejich specifita a afinita lépe reprezentuje celkovou skupinu prolaminových bílkovin. Bylo provedeno srovnání komerční metody na bázi protilátky proti ω-gliadinům a metody ELISA s protilátkou R5 na třech skupinách vzorků. Toto srovnání bylo provedeno mezi komerčními kity Ridasreen Gliadin Kit a Transia Plate Gluten[70]. Rozdílnost výsledků byla zdůvodněna několika faktory:

1. Použití jiného standardu v každé soupravě, dokonce o jiné skutečné koncentraci prolaminů.
2. Použití alternativního „koktejlového“ extrakčního činidla pro analýzu s protilátkou R5 oproti klasické ethanolové extrakci v druhém případě. Složení tohoto činidla nebylo autory v odborné literatuře blíže specifikováno, pravděpodobně se jedná o vícesložkové rozpouštědlo, které zvyšuje výtěžek extrakce[56].
3. Možnost interference některých látek extrahovaných z komplexní matrice vzorku.

Kromě souprav určených pro laboratorní použití byly vyvíjeny i produkty umožňující semikvantitativní domácí stanovení lepkových bílkovin v potravinách[71].

Tabulka III
Přehled komerčních analytických souprav[63–69]

Výrobce	Produkt	LOD [ppm]	Rozmezí stanovení [ppm]	Specifita PL
Neogen	Alert (Qualitative)	10		prolaminy
	Veratox	5	5–50	prolaminy
R-Biopharm	RidaScreen Gluten	5		ω-gliadin
	RidaScreen Gliadin	1,5	2,5–40	QQPFP
	RidaScreen Fast	5	5–40	QQPFP
Tepnel	Gluten Assay Kit	5	50–1000	pšenice žito
	nebo High sensitivity	0,5	5–100	pšenice žito
Hallmark	HAVen Gluten	5	50–1000	ω-gliadin
	nebo High sensitivity	0,5	5–100	ω-gliadin
Diffchamb	Transia Plate Gluten	5	5–100	ω-gliadin
	Transia Plate Prolamins	1,5	0,8–12,5	prolaminy
ELISA systems	Gliadin Kit		5–100	ω-gliadin
Ingenasa	Ingezim Gluten	0,75	1,6–25	QQPFP

Pozn.: LOD – detekční limit, PL – protilátka, ppm – odpovídá mg kg^{-1} (mg l^{-1})

4.3. Další metody využitelné pro stanovení lepkových bílkovin

4.3.1. Elektroforetické metody

Elektroforéza je jednou z hlavních metodik používanou pro analýzu cereálních bílkovin. Mezi hlavní skupiny těchto metod můžeme zařadit elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným (SDS-PAGE), elektroforézu v kyselém prostředí (acid-PAGE), izoelektrickou fokusaci (IEF), kapilární zónovou elektroforézu (CZE) a vysokoúčinnou dvourozměrnou HPLC-HPCE[36]. Separace a charakterizace zásobních proteinů obilovin probíhá u těchto technik na základě velikosti molekul nebo jejich pohyblivosti v elektrickém poli.

Dodecyl sulfát sodný vytváří s proteiny komplexy, jejichž náboje jsou následně srovnatelné, a tedy migrují v elektrickém poli stejnou rychlostí, k jejich rozdělení tedy dojde na jednotlivé frakce pouze na základě molekulové hmotnosti. SDS-PAGE představuje relativně levnou možnost separace obilných bílkovin. Má však tři základní nevýhody, problematickou kvantifikaci izolovaných proteinových frakcí, nutnost vizualizace separovaných proteinů a práci s nebezpečným akrylamidem[39].

Byly analyzovány bílkoviny rozpustné v ethanolu celé řady obilovin v konstantním i gradientovém gelu, avšak podmínky stanovení jsou vždy závislé na konkrétním analytu[35,39,72–76].

Elektroforetické metody bývají spojovány s metodami western blot nebo imunoblot. Po elektroforetické separaci proteinů, se rozdělené frakce přenesou na nitrocelulosovou nebo PVDF membránu elektropřenosem nebo obtiskovou metodou. Imunochemická detekce separovaného analytu se provádí pomocí specifické protilátky. Vzniklý komplex antigen-protilátka je detegován pomocí sekundární značené protilátky. Ellis a spol.[72] označili v bílkovinném spektru ječmene frakce 45 a 20 kDa za příslušné k hordeinům. Pirocheau a spol.[73] provedli dvojrozměrnou elektroforézu ječných proteinů s následnou identifikací gelu hmotnostní spektrometrií.

Užitečným nástrojem pro identifikaci jednotlivých proteinů je dvojrozměrná elektroforéza buď v tradičním provedení, nebo v modifikovaných uspořádáních jako dvourozměrná elektroforéza v kyselém prostředí kombinovaná s elektroforézou s dodecyl sulfátem sodným (2D-A-PAGE-SDS-PAGE), případně dvourozměrná nativní elektroforéza v kyselém nebo zásaditém prostředí[74,75].

Acid-PAGE (A-PAGE) rozděluje proteiny v kyselém prostředí v závislosti na velikosti i náboji molekul v gelu. Hlavním využitím je analýza specifického zastoupení gliadinových frakcí (fingerprint) v jednotlivých odrůdách cereálií, převážně pšenice. Podobně jako SDS-PAGE se i v této metodě běžně používají jak lineární, tak i gradientové gely. Kromě gliadinů bývá využívána i pro separaci gluteninových proteinů a hordeinů ječmene. Přitom všechny tyto skupiny je možno frakcionovat semipreparativně i preparativně. Bílkoviny ostatních cereálií (oves, rýže, kukuřice, čirok) je možné také charakterizovat metodou A-PAGE, v některých případech je nutný přídavek močoviny pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních proteinů[39].

Izoelektrická fokusace (IEF) bývá používána k separaci některých cereálních proteinů, přičemž zvláště rozpustnost analytu hraje zásadní roli pro vhodnost tohoto stanovení. Z tohoto důvodů bývá ke vzorku přidáno silné rozpouštěcí činidlo (např. 8M močovina, alkoholy)[77,78].

Podobně jako A-PAGE i kapilární zónová elektroforéza (FZCE) separuje molekuly analytu na základě jejich nábojové hustoty a bývá také převážně používána pro analýzu čistoty odrůdy. Řada prací se zabývala optimalizací podmínek této metody pro separaci gliadinů a gluteninů pšenice[76,79–81].

Kapilární zónová elektroforéza ve vysokoúčinné modifikaci (HPCE) využívá malého průměru separační kapiláry (25−100 μm) ke zvýšení pracovního napětí (až 30 kV), což umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení v krátkém čase. Moderní HPCE jsou také plně automatizované a oproti klasické elektroforéze produkují méně nebezpečné odpady[76,82].

Spojením dvou moderních metod vznikla dvourozměrná vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s vysokoúčinnou kapilární zónovou elektroforézou (2D-HPLC-HPCE), která byla využita k separaci gliadinu i hordeinu. Podobně jako u 2D elektroforézy vzniká dvojrozměrná mapa proteinů (případně trojrozměrná pro kvantitativní analýzu) s možností identifikovat jednotlivé zásobní proteiny obilovin[83].

4.3.2. Chromatografické metody

Přístroje HPLC se poslední dobou používají k analýze prakticky jakýchkoliv látek. Pro separaci a stanovení proteinů byly vyvinuty metody, jako je gelově permeační HPLC (size exclusion HPLC, SE-HPLC), HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) a HPLC na iontoměničích. Takto provedené stanovení je značně nespecifické, nicméně podává cenné informace o rozdělení prolaminů do jednotlivých podskupin a o vlastnostech těchto frakcí. Dalším využitím chromatografických technik je příprava lépe definovatelných skupin proteinů a jejich přečištění[84–90].

4.3.3. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

Hmotnostní spektrometrie, při níž se bílkoviny ionizují dusíkovým laserem ve vhodné nízkomolekulární matrici, která zabraňuje rozpadnutí makromolekul. Vzniklé ionty jsou posléze urychleny na krátkém úseku silným stejnosměrným elektrickým polem. Měří se doba letu iontů k detektoru v trubici bez elektrického pole, která je úměrná poměru jejich hmotnosti ku jejich náboji. Metoda slouží v tomto provedení k určení známých peptidů, její nevýhodou je vysoká přístrojová a finanční náročnost. MALDI-TOF se využívá hlavně jako kontrolní srovnávací metoda pro odhalení falešně pozitivních výsledků imunoanalytických měření[91–96].

4.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Druhou principiální možností odhalení kontaminace vzorku příměsí potenciálně toxických obilovin je stanovení a kvantifikace přítomnosti genetického materiálu da-

ných plodin[97].

Tato metoda je schopna detegovat stopy nepoškozené DNA alergenních obilovin v potravinách a je tedy potenciálně vhodnou alternativou k imunochemickým metodám. Vykazuje vyšší citlivost než metody ELISA, její nevýhodou je právě nutnost přítomnosti pomnožitelné deoxyribonukleové kyseliny ve vzorku a schopnost detegovat kontaminaci vzorku nukleovými kyselinami právě jedné obiloviny. Köppel a spol.[98] testovali použití metody PCR oproti výsledkům komerčního ELISA kitu (Ridascreen, R-Biopharm) pro stanovení kontaminace ovesné mouky pšeničnými bílkovinami. Detekční limit pro metodu ELISA byl stanoven jako 2 ppm, zatímco PCR vykázala cca 10× lepší citlivost. Další práce zabývající se paralelním stanovením prolaminové kontaminace v „bezlepkových" potravinách prokázaly poměrně dobrou shodu obou metod a možnost jejich vzájemné kontroly. Negativní výsledek imunochemického stanovení při pozitivním výsledku PCR může značit přítomnost deproteinovaného pšeničného škrobu a v obráceném případě přítomnost čistého gliadinu bez příměsi DNA[99,100].

Henterich a spol.[101] vypracovali systém real-time PCR pro stanovení gliadinu, ve kterém byla použita protilátka R5 (viz kap. 4.2.3.) s navázaným oligonukleotidem. Detekční limit metody byl 0,16 ppm.

5. Závěr

Komplikovanost stanovení lepkových bílkovin v potravinách spočívá především v nejednoznačně definovaném analytu, který se navíc ve vzorcích vyskytuje ve značně heterogenní formě zahrnující proteiny, peptidy a různé nízkomolekulární štěpy. Heterogenita prolaminů se dále může zvyšovat, pokud v průběhu výroby dochází k teplotním, enzymovým nebo jiným změnám bílkovin. Zastoupení jednotlivých proteinů i celých frakcí prolaminů navíc značně kolísá v závislosti na pěstebním ročníku, oblasti a odrůdě dané obiloviny. Z hlediska analýzy látek s alergenní aktivitou navíc situaci komplikuje značně individuální imunitní odpověď jednotlivých pacientů.

Pro analýzu obilných proteinů bylo použito velkého počtu analytických metod, založených na principech elektroforézy, kapalinové chromatografie a specifických imunochemických stanovení. Vzhledem k důležitosti alergenních účinků těchto proteinů je ELISA dnes hlavní volbou pro stanovení prolaminů v nízkých koncentracích, ačkoliv ostatní techniky mohou stále poskytovat užitečné informace. Během let byl vyvinut velký počet metod ELISA s různými protilátkami, které vykazovaly značnou míru specifity a citlivosti vůči prolaminovým bílkovinám, což předurčuje možnosti jejich využití pro daná stanovení.

Účinnost imunochemických stanovení je primárně závislá na kvalitě protilátky, tedy na její specifitě a afinitě ke konkrétním frakcím gliadinu, hordeinu a sekalinu. Dalšími určujícími faktory je formát metody ELISA a v neposlední řadě také způsob extrakce prolaminů ze vzorku.

Protilátky zaměřené proti prokazatelně toxickým sekvencím gliadinů se v současné době jeví jako nejvhodnější pro stanovení lepkových bílkovin ječmene a pro potravinářskou kontrolu, nicméně schopnost křížových interakcí s ječnými a žitnými proteiny může být stále problémem, stejně jako věrohodnost výsledků analýzy částečně hydrolyzovaných a tepelně degradovaných peptidů. Peptidové fragmenty prolaminů jsou přitom velmi častým výsledkem působení výrobního potravinářského procesu.

Existence oficiálního neměnného standardu v rámci všech prováděných analýz by zamezila některým komplikacím souvisejícím se špatnou definovatelností analytu.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (1M0570 a MSM6046137305).

LITERATURA

1. Osborne T. B.: Carnegie Ins. 1907.
2. Gianibelli M. C., Larroque O. R., MacRitchie F., Wrigley C. W.: Cereal Chem. *78*, 635 (2001).
3. Shewry P. R., Sayanova O., Tatham A. S., Tamas L., Turner M., Richard G., Hickman D., Fido R., Halfordd N. G.: J. Plant Physiol. *145*, 620 (1995).
4. Shewry P. R., Halford N. G.: J. Exp. Bot. *53*, 948 (2002).
5. Bateman A., Birney E., Cerruti L.: Nucl. Acid Res. *30*, 276 (2002).
6. Shewry P. R., Tatham A. S.: Biochem. J. *267*, 1 (1990).
7. Yada R.Y., v knize : *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2004.
8. Sontag-Strohm T.: J. Cereal Sci. *24*, 87 (1996).
9. Wieser H.: Acta Paediatr. *412*, 3 (1996).
10. Velíšek J.: *Chemie potravin I*. Ossis, Praha 2002.
11. Stern M., Ciclitira P. J., van Eckert R., Feighery C., Janssen F. W., Méndez E., Mothes T., Troncone R., Wieser H.: Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *13*, 741 (2001).
12. Kasarda D. D., Okita T. W., Bernardin J. E., Baecker P. A., Nimmo C. C., Lew E. J., Dietler M. D., Greene F. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 4712 (1984).
13. Tatham A. S., Shewry P. R.: Trends Biochem. Sci. *25*, 567 (2000).
14. Denery-Papini S., Nicolas Y., Popineau Y.: J. Cer. Sci. *30*, 121 (1999).
15. Wahab P. J., Crusius J. B., Meijer J. W., Mulder C. J.: Am. J. Gastroenterol. *96*, 1464 (2001).
16. Linden G., Lorient D., v knize: *New Ingredients in Food Processing: Biochemistry and Agriculture*. Woodhead publishing, Cambridge 1999.
17. Forde B. G., Kreis M., Williamson M. S., Fry R. P., Pywell J., Shewry P. R., Bunce N., Miflin B. J.: EMBO J. *4*, 9 (1985).
18. Shewry P. R., Kreis M., Parmar S., Lew E. J.-L., Kasarda D. D.: FEBS Lett. *190*, 61 (1985).
19. Jabri B., Sollid L. M.: Nat. Clin. Pract. Gastroenter. Hepatol. *3*, 516 (2006).

20. Cornell H. J.: Amino Acids *10*, 1 (1996).
21. Auricchio S., Troncone R.: Eur. J. Pediatr. *155*, 427 (1996).
22. Feighery C.: Br. Med. J. *319*, 236 (1999).
23. Biagi F., Campanella J., Martucci S., Pezzimenti D., Ciclitira P. J., Ellis H. J., Corazza G. R.: A Case Report. Nutr. Rev. *62*, 360 (2004).
24. Collin P., Mäki M., Aukinen K. K.: Nutr. Rev. *60*, 490 (2004).
25. Hischenhuber C., Crevel R., Jarry B., Maki M., Moneret-Vautrin D. A., Romano A., Troncone R., Ward R.: Aliment. Pharmacol. Ther. *23*, 559 (2006).
26. Collin P., Thorell L., Kaukinen K., Maki M.: Aliment. Pharmacol. Ther. *19*, 1277 (2004).
27. Wieser H., Belitz H. D.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. *194*, 229 (1992).
28. Rauchová H., Rauch P.: Chem. Listy *91*, 189 (1997).
29. De Vincenzi M., Luchetti R., Peruffo A. D., Curioni A., Pogna N. E., Gasbarrini G.: J. Biochem. Toxicol. *11*, 205 (1996).
30. Janatuinen E. K., Pikkarainen P. H., Kemppainen T. A., Kosmo V. M., Jarvinen R. M. K., Uusitupa M. I. J., Julkunen R. J. K.: N. Engl. J. Med. *333*, 1033 (1995).
31. Berti C., Trovato C., Bardella M. T., Forlani F.: Food Agric. Immunol. *15*, 217 (2003).
32. Dona V. V., Fossati C. A., Chirdo F. G.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity*. *Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 51. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
33. Wieser H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. *207*, 128 (1998).
34. Sorell L., Lopez J. A., Valde´s I., Alfonso P., Camafeita A. B., Chirdo F., Galvilondo J., Mendez E.: FEBS Lett. *439*, 46 (1998).
35. Rumbo M., Margheritis A. I., Chirdo F. G., Giorgieri S. A., Fossati C. A., Anon M. C.: Eur. Food Res. Tech. *214*, 198 (2002).
36. Ellis H. J., Rosen-Bronson S., O'Reilly N., Ciclitira P. J.: Gut *43*, 190 (1998).
37. Morel M. H., Dehlon P., Autran J. C., Leygue J. P., Bar-L'Helgouac'h C.: Cereal Chem. *77*, 685 (2000).
38. Tatham A. S., Shewry P. R., Belton P. S.: Adv. Cereal Sci. Technol. *10*, 1 (1990).
39. Bean S. R., Lookhart G. L.: J. Chromatogr., A *881*, 23 (2000).
40. Chirdo F. G., Anon M. C., Fossati C. A.: Food Agric. Immunol. *10*, 143 (1998).
41. Chirdo F. G., Anon M. C., Fossati C. A.: Food Agric. Immunol. *7*, 333 (1995).
42. Mičková B., Rauch P., Fukal L.: Chem. Listy *98*, 970 (2004).
43. Dostálek P., Hochel I., Gabrovská D., Rysová J.: *Proceedings of the 19th Meeting wokring group on prolamin analysis and toxicity*. *Prague, 30 September – 3 October 2004.* (Stern M., ed.), str. 69. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2005.
44. Dostálek P., Hochel I., Mendez E., Hernando A., Gabrovska D.: Food Addit. Contam. *23*, 1074 (2006).
45. Rumbo M., Chirdo F. G., Fossati C. A., Anon M. C.: Food Agric. Immunol. *8*, 195 (1994).
46. Ciclitira P. J., Lennox E. S.: Clin. Sci. *64*, 655 (1984).
47. Friis S. U.: Clin. Chim. Acta *178*, 261 (1988).
48. Ayob M. K., Rittenburg J., Allen J. C., Smith C. J.: Food Hydrocolloids *2*, 39 (1988).
49. Troncone R., Vitale M., Donatiello A., Farris E., Roos G., Auricchio S.: J. Immunol. Methods *92*, 21 (1986).
50. Skerritt J. H., Hill A. S.: J.- Assoc. Off. Anal. Chem. *74*, 257 (1991).
51. Skerritt, J.H., Hill A.S.: J. Agric. Food Chem. *38*, 1771 (1990).
52. Skerritt J. H., Wrigley C. W., Underwood P. A.: (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia) : AU 572955 B2 19880519 (CAN 110:191088).
53. Ellis H. J., Doyle A. P., Wieser H., Sturgess R. P., Day P., Ciclitira P. J.: J. Biochem. Biophys. Methods *28*, 77 (1994).
54. Bermudo Redondo M. C., Griffin P. B., Garzon R. M., Ellis H. J., Ciclitira P. J., O'Sullivan C. K.: Anal. Chim. Acta *551*, 105 (2005).
55. Brett G. M., Mills E. N. C., Goodfellow B. J., Fido R. J., Tatham A. S., Shewry P. R., Morgan M. R. A.: J. Cer. Sci. *29*, 117 (1999).
56. Valdes I., Garcia E., Llorente M., Mendez E.: Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *15*, 465 (2003).
57. Kahlenberg F., Mendez E., Mothes T.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity*. *Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 71. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
58. Kahlenberg F., Sanchez D., Lachmann I., Tuckova L., Tlaskalova H., Mendez E., Mothes T.: Eur. Food Res. Technol. *222*, 78 (2006).
59. *Proceedings of the 17th Meeting working group on prolamin analisys and toxicity. London, 3–6 October, 2002.* (Stern M., ed.), str. 45. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2003.
32. Osman A. A., Uhlig H. H., Valdes I., Amin M., Mendez E., Mothes T.: Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *13*, 1189 (2001).
33. Ferre S., Garcia E., Mendez E.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analisys and toxicity*. *Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.), str. 65. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
34. Kanerva P., Sontag-Strohm T., Lehtonen P.: J. Inst. Brew. *111*, 61 (2005).
35. http://www.neogen.com/foodallergens.htm, staženo 14.05.2007.
36. http://www.tepnel.com/ag_bio_and_food_testing/downloads/BK%20P%20Gluten96%20Flyer%20.LA0058.pdf, staženo 14.05.2007.
37. http://www.r-biopharm.com/general/main.php?

p_range=foodandfeed&p_nav=allergens&layer=on&n_range=foodandfeed&act=foodandfeed&action=&id=&conti=, staženo 14.05.2007.
38. http://www.hallmarkav.com/page3.html, staženo 14.05.2007.
39. http://www.diffchamb.com/website//archive/templates/item/product_list.asp?iSecId=624&category=624, staženo 14.05.2007.
40. http://www.noackgroup.com/mmedia/2006.06.06/1149596502.pdf, staženo 14.05.2007.
41. http://www.elisas.com.au/allergens/allergen_11/index.htm, staženo 14.05.2007.
70. Hasselberg A., Kruse B., Yman I. M.: *Proceedings of the 18th Meeting working group on prolamin analysis and toxicity. Stockholm, 2–5 October, 2003.* (Stern M., ed.) str. 109. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2004.
71. Skerritt J. H., Hill A. S.: Lancet *337*, 379 (1991).
72. Ellis H. J., Freedman A. R., Ciclitira P. J.: Clin. Chim. Acta *189*, 123 (1990).
73. Perrocheau L., Rogniaux H., Boivin P., Marion D.:. Proteomics *5*, 2849 (2005).
74. Lafiandra D., Kasarda D. D.: Cereal Chem. *62*, 314 (1985).
75. Morel M. H.: Cereal Chem. *71*, 238 (1994).
76. Werner W. E., Wiktorowicz J. E., Kasarda D. D.: Cereal Chem. *71*, 397 (1994).
77. Curioni A., Dal Belin Peruffo A., Pogna N. E.: Electrophoresis *11*, 462 (1990).
78. Sondergaard I., Jensen K., Krath B. N.: Electrophoresis *15*, 584 (1994).
79. Lookhart G. L., Bean S. R.: Cereal Chem. *73*, 81 (1996).
80. Day L., Greenwell P., Lock S., Brown H.: J. Chromatogr., A *836*, 147 (1999).
81. Bean S. R., Lookhart G. L.: Electrophoresis *19*, 3190 (1998).
82. Lookhart G. L., Bean S. R., Jones B. L.: Electrophoresis *20*, 1605 (1999).
83. Bean S. R., Lookhart G. L.: Cereal Chem. *74*, 758 (1997).
84. Van Eckert R., Jordan T. W.: *Proceedings of the 19th Meeting working group on prolamin analisys and toxicity. Prague, 30 September – 3 October, 2004.* (Stern M., ed.), str. 27. Verlag Wissenschaftliche Scripten, Zwickau 2005.
85. Batey I. L., Gupta R. B., MacRitchie F.: Cereal Chem. *68*, 207 (1991).
86. Bietz J. A.: J. Chromatogr., A *255*, 219 (1983).
87. Bietz, J. A., Simpson D. G.: J. Chromatogr., A *624*, 53 (1992).
88. Huebner F. R., Bietz J. A.: Cereal Chem. *70*, 506 (1993).
89. Larroque O. R., Gianibelli M. C., Batey I. L., MacRitchie F.: Electrophoresis *8*, 1064 (1997).
90. Popineau Y., Pineau F.: J. Cereal Sci. *5*, 215 (1987).
91. Camafeita E., Alfonso P., Acevedo B., Mendez E.: J. Mass Spectrom. *32*, 444 (1997).
92. Hernando A., Valdes I., Mendez E. J.: Mass Spectrom. *38*, 862 (2003).
93. Cunsolo V., Foti S., Saletti R.: Eur. J. Mass Spectrom. *10*, 359 (2004).
94. Cornell H. J., McLachlan A., Cullis P. G.: J. Biochem., Mol. Biol. Biophys. *6*, 151 (2002).
95. Šalplachta J., Allmaier G., Chmelík J.: Chem. Listy *99*, 967 (2005).
96. Řehulka P., Allmaier G., Chmelík J.: Chem. Listy *100*, 1111 (2006).
97. Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P.: Chem. Listy *99*, 467 (2005).
98. Koppel E., Stadler M., Jurg L., Hubner P.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. *206*, 399 (1998).
99. Dahinden I., Von Buren M., Luthy J.: Eur. Food Res. Technol. *212*, 228 (2001).
100. Sandberg M., Lundberg L., Ferm M., Malmheden Y. I.: Eur. Food Res. Technol. *217*, 344 (2003).
101. Henterich N., Osman A., Mendez E., Mothes T.: Nahrung. *47*, 345 (2003).

P. Hulín[a], P. Dostálek[a], and I. Hochel[b]
([a] Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, [b] Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic): **Methods for Determination of Gluten Proteins in Food**

The prolamin protein fraction from wheat, barley and rye can cause some adverse effects when ingested by people with the coeliac disease. The only treatment of coeliac sprue consists in the adherence to a strict diet free of toxic cereal proteins even in trace amounts. It is one of the most frequent food allergies occurring presumably in one in 300 people in Europe. There is still a need for analytical methods with acceptable reliability and specificity in food control and food analysis of gluten, i.e. prolamins. Electrophoresis and chromatography are widely used for fractionation of a complex mixture of hordeins, but immunochemical techniques are utilized in a very sensitive and specific determination of hordein and its derivatives. A number of ELISA systems have been produced, mainly for the purpose of wheat gliadin detection. The systems are usually based on monoclonal antibodies. The immunochemical analytical systems used for prolamin detection are reviewed.

Chem. Listy *102*, 338−345 (2008) Referát

HUMÍNOVÉ KYSELINY. INTERAKCIE HUMÍNOVÝCH KYSELÍN S KONTAMINANTAMI

MARIANNA SKOKANOVÁ a KATARÍNA DERCOVÁ

Oddelenie biochemickej technológie, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
marianna.skokanova@stuba.sk

Došlo 3.5.07, prijaté 27.11.07.

Kľúčové slová: humínové kyseliny, humínové látky, imobilizácia, pesticídy, pentachlórfenol, PCP, remediácia, xenobiotiká

Obsah

1. Úvod
2. Možnosti využitia humínových kyselín
3. Interakcie humínových kyselín s xenobiotikami
   3.1. Druhy väzieb
   3.2. Interakcie humínových kyselín s kovmi, organickými látkami a mikroorganizmami
      3.2.1. Kovy
      3.2.2. Organické látky
      3.2.3. Biologická aktivita humínových kyselín a ich väzba na mikroorganizmy
   3.3. Úloha enzýmov ako katalyzátorov pri imobilizácii xenobiotík na humínové kyseliny
4. Záver

1. Úvod

Existuje niekoľko spôsobov dekontaminácie pôd využívajúcich chemické, fyzikálno-chemické a biologické postupy[1]. Mnohé z týchto spôsobov sú však mimoriadne energeticky a ekonomicky náročné a využívajú sa hlavne na silne znečistených lokalitách. Väčšina pôdneho fondu však nevykazuje extrémne hodnoty znečistenia, ale v podstate každá lokalita obsahuje pomerne rôznorodú zmes anorganických i organických polutantov, ktoré za určitých podmienok môžu kontaminovať potravinový reťazec, resp. prenikať do podzemných vôd. Avšak je potrebné si uvedomiť, že každá z týchto dekontaminačných metód, najmä fyzikálne a fyzikálno-chemické, viac či menej negatívne ovplyvňuje prirodzenú pôdnu mikroflóru, a tým rovnováhu pôdneho prostredia a pôdnu schopnosť samočistenia. Bolo dokázané, že dochádza k znižovaniu počtu kultivovateľných baktérií, ako aj k redukcii mikrobiálnej respirácie a utilizácii uhlíkatých substrátov. Táto časť príspevku nadväzuje na časť prvú s názvom *Pôvod a štruktúra humínových kyselín*[2]. Humínové kyseliny (HK) sú vďaka svojim vlastnostiam využiteľné pre potenciálne zdokonalenie remediačného procesu práve s dôrazom na zachovanie živých organizmov, keďže každú metódu je potrebné aplikovať veľmi šetrne vo vzťahu k danému prostrediu a prítomným živým organizmom[3].

Pôda má schopnosť eliminovať kontaminanty (kovy, organické látky) a to ich interakciou s anorganickými (ílové minerály) a organickými (humínové kyseliny) pôdnymi zložkami, čím sa znižuje ich horizontálny a vertikálny pohyb. Práve táto prirodzená tlmiaca schopnosť pôdy (tzv. natural attenuation) sa v posledných rokoch využíva ako alternatívna metóda remediácie[4]. Tento spôsob odstraňovania kontaminantov väzbou na HK (imobilizáciou) v pôde je vhodný najmä na ich „hrubé“ odstránenie zo silne znečistených lokalít, čo ďalej dáva možnosť využitia biologických metód prostredníctvom mikroorganizmov schopných tieto kontaminanty rozkladať v procese bioremediačných technológií. Využitie HK pre environmentálne účely je atraktívne najmä preto, že sa jedná o látky prírodného pôvodu s dostatočnými zásobami v prírodných matriciach[5], teda sa jedná o obnoviteľné zdroje (tab. I).

2. Možnosti využitia humínových kyselín

Priaznivý vplyv humínových kyselín v pôde je mnohostranný a spočíva v kladnom ovplyvnení všetkých pôd-

Tabuľka I
Obsah humínových kyselín a fulvokyselín v prírodných matriciach[6]

Prírodný zdroj	Obsah humínových a fulvokyselín [%]
Leonardit/humát	40–85
Čierna rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnedé uhlie	10–30
Hnoj	5–15
Kompost	2–5
Pôda	1–5
Kal	1–5
Čierne uhllie	0–1

nych vlastností pôsobiacich rozhodujúcou mierou na obsah živín v pôde aj na pôdnu úrodnosť. HK sú využiteľné vo viacerých oblastiach[6].

1. HK fyzikálne modifikujú štruktúru pôdy:
- zdokonaľujú štruktúru pôdy: predchádzajú vysokým stratám vody a živín v ľahkých, piesočnatých pôdach. Tým, že dochádza súčasne k ich rozkladu, pôda sa stáva úrodnejšou. V ťažkých a kompaktných pôdach zlepšujú prevzdušnenie a retenciu vody, tým aj kultivačné vlastnosti,
- pomáhajú pôdu prekypriť a rozdrobiť a tak zvýšiť jej prevzdušnenie a zlepšiť obrábateľnosť.

2. HK chemicky menia fixačné vlastnosti pôdy:
- neutralizujú kyslé aj zásadité pôdy – regulujú pH hodnotu pôd,
- zlepšujú a optimalizujú príjem živín a vody rastlinami,
- sú bohaté na organické aj minerálne látky nevyhnutné pre rast rastlín,
- vyznačujú sa vysokou katiónovo-výmennou kapacitou,
- uvoľňujú CO_2 z pôdneho $CaCO_3$ a umožňujú mu zúčastňovať sa fotosyntézy,
- redukujú dostupnosť toxických látok v pôdach.

3. HK biologicky stimulujú rastlinu a aktivitu pôdnych mikroorganizmov:
- stimulujú rastlinné enzýmy a zvyšujú ich produkciu,
- stimulujú rast a rozširovanie vhodných mikroorganizmov v pôdach,
- zvyšujú prirodzenú rezistenciu rastlín voči chorobám a škodcom,
- podporujú rozvoj chlorofylu, cukrov a aminokyselín v rastlinách a tým napomáhajú fotosyntéze,
- zlepšujú klíčenie a životaschopnosť semien.

4. Ekonomické – HK chelatujú zlúčeniny nutrientov v pôde vo forme vhodnej pre ich utilizáciu rastlinami. Týmto spôsobom je zabezpečený optimálny prísun živín do rastliny. Pomocou prídavku HK sa teda dosahujú vyššie výťažky (až do 70 %), ako aj 30% redukcia v používaní pesticídov. HK zvyšujú aj pôdnu kapacity zádrže vody, čím prispievajú k zníženiu spotreby vody použitej na zavlažovanie pestovaných rastlín.

5. Ekologické – HK predstavujú prospešné a účinné riešenia problémov životného prostredia, jeho ochrany a zachovania:
- pôdy s vysokým obsahom HK zabezpečujú nízke vymývanie nitrátov a optimálnu úroveň živín. Dobre vyvinutý koreňový systém dosiahnutý vysokým obsahom HK zabraňuje úniku nitrátov a pesticídov do spodných vôd. Nízky obsah nitrátov je indikátorom a podmienkou pre tzv. organické poľnohospodárstvo. Nitráty sa dostávajú do pôdy tak, že pestovatelia používajú viac hnojív ako sú rastliny schopné prijať,
- HK redukujú presolenie pôd, ku ktorému dochádza nadmerným používaním vo vode rozpustných priemyselných minerálnych hnojív. HK sú schopné znížiť obsah soli a tým znížiť toxicitu pôdy,
- HK predstavujú účinný prostriedok proti pôdnej erózii. Zabezpečuje sa to najmä väzbovou schopnosťou koloidov a podporovaním koreňového systému a vývoja rastliny.

3. Interakcie humínových kyselín s xenobiotikami

3.1. Druhy väzieb

Z hľadiska využiteľnosti humínových látok v oblasti ochrany životného prostredia, napr. v sanačných technológiách, je dôležitá znalosť možných väzbových interakcií týchto látok s kontaminujúcimi látkami prítomnými v prostredí. Približnú predstavu o možných väzbových interakciách môžme odvodiť predovšetkým z dosiaľ známych informácií o štruktúre a z niektorých ďalších vlastností humínových látok. Na základe dostupných informácií teda môžeme predpokladať niekoľko typov väzbových interakcií medzi humínovými látkami a cudzorodými látkami – kontaminantami, prítomnými v pôde[5].

Iónová väzba

Tento typ väzby vychádza z pôsobenia elektrostatických síl medzi fixnými nábojmi prítomných funkčných skupín a iónmi vyskytujúcimi sa v roztoku. Keď zoberieme do úvahy iónovú väzbu, potom sa môžeme v zjednodušenom pohľade pozerať na humínové látky ako na ionexy, ktorým môžeme v niektorých prípadoch prisudzovať vlastnosti porovnateľné so syntetickými ionexami. Vznik elektrostatickej väzby sa dá u humínových látok predpokladať napr. v prípade alkalických kovov a amoniaku.

Koordinačná väzba

Z hľadiska imobilizácie toxických kovov predstavuje najdôležitejší typ väzbovej interakcie koordinačná väzba medzi makromolekulovými matricami humínových látok a iónmi kovov schopnými tento typ väzby vytvárať. Potenciál vzniku koordinačných väzieb je tu daný najmä značným zastúpením karboxylových, fenolických a ďalších funkčných skupín v štruktúre humínových látok. Predpovedanie priebehu komplexotvorných reakcií pre konkrétny typ humínových látok je však vzhľadom na zložitosť makromolekulárnej štruktúry veľmi obtiažne. Vytváranie koordinačných vazieb je teda dôležité najmä pri odstraňovaní toxických kovov nachádzajúcich sa napr. v podzemných alebo odpadových vodách. Na vzniku koordinačných väzieb sa v humínových látkach najviac podieľajú karboxylové a fenolické funkčné skupiny, kde zastúpenie týchto dvoch funkčných skupín je okrem iného ovplyvnené hodnotou pH a tým aj mierou disociácie týchto funkčných skupín. V slabo kyslej oblasti sa na vzniku koordinačných väzieb podieľajú hlavne karboxylové skupiny a k nim sa pri vzraste pH nad 7 a po disociácii protónu z fenolického hydroxylu pridávajú významne aj tieto funkčné skupiny. Všeobecne stabilita vznikajúcich komplexov so vzrastom

pH stúpa, a to najmä u tých iónov (napr. Cu^{2+}), ktoré tvoria silné karboxylát-fenolické komplexy.

Kovalentná väzba

Interakcie vedúce ku vzniku kovalentných väzieb tu môžu byť rozdelené na dve skupiny – reakcie prebiehajúce bez využitia aktivity enzýmov a reakcie s využitím biokatalýzy. Poznatok, že v makromolekulovej štruktúre humínových látok môže dochádzať k trvalej fixácii kontaminantov kovalentnou väzbou, je známy už dávno. Interakcia kovalentného typu bola preukázaná na prelome 70. a 80. rokov minulého storočia a jej príkladom tu môže byť kovalentná väzba antracénu na humínové kyseliny izolované z pôdy znečistenej zmesou polyaromatických uhľovodíkov. V metabolicky aktívnom systéme bolo zistené približne 40% zabudovanie antracénu (nesúceho izotop ^{14}C) do kovalentnej formy v štruktúre humínových kyselín. Z hľadiska sanácie pôd kontaminovaných práve polyaromatickými uhľovodíkmi je potom možnosť kovalentnej väzby na humínové látky zvlášť zaujímavá, pretože sa tu jedná o stabilnú väzbu na polymérnu štruktúru, o ktorej je preukázané, že je nemutagénna a v jej prítomnosti dokonca aj niektoré mutagénne látky znižujú svoju mutagenitu. Možnosť vzniku kovalentnej väzby medzi makromolekulárnou štruktúrou humínových látok a kontaminantu je z praktického hľadiska predpokladom na imobilizáciu kontaminantu. V tejto súvislosti je dôležité poznať, či proces vedúci ku vzniku kovalentnej väzby môžeme považovať za reverzibilný alebo ireverzibilný.

Vodíkové mostíky

Aj napriek skutočnosti, že presná štruktúra humínových látok zostáva stále nedoriešená, je možné predpokladať na základe preukázanej prítomnosti niektorých funkčných skupín (amidová, laktámová, nitrilová) možnosť vzniku vodíkových mostíkov. Tieto väzby sa aj napriek svojmu nízkemu energetickému obsahu môžu významne podieľať na väzbových schopnostiach medzi humínovými látkami a kontaminantami. Zastúpenie vodíkových mostíkov na väzbových interakciách bolo objektívne preukázané napr. pre iminoskupiny v molekulách herbicídov.

Hydrofóbne interakcie

Tento typ väzby vzniká pri kontakte nepolárnych skupín (napr. alkylových) nesených molekulami, ktoré sa nachádzajú vo vodnom roztoku, kde tieto interakcie môžu napr. vychádzať z pôsobenia van der Waalsových síl alebo presunu π-elektrónov. Hydrofóbne interakcie sú najčastejšou predpokladanou väzbovou interakciou humínových látok s hydrofóbnymi a alifatickými kontaminantami. Touto interakciou je napr. vysvetľovaná skutočnosť, že insekticíd parathion stráca za prítomnosti humínových látok časť svojej toxicity. Vysvetľuje sa ňou aj imobilizácia atrazínu a hydroxyatrazínu. Hydrofóbne interakcie sú predpokladané aj v prípade významnej skupiny s-triazínových herbicídnych látok.

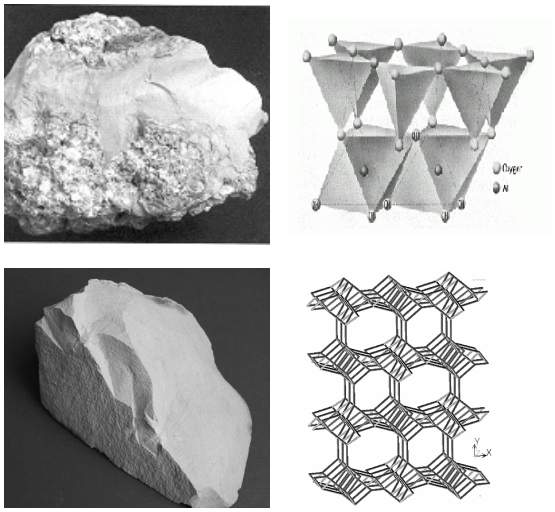
3.2 Interakcie HK s kovmi, organickými látkami a mikroorganizmami

Xenobiotiká sa dostávajú do pôdy pri modernom a extenzívnom poľnohospodárstve a priemysle najčastejšie vo forme pesticídov. Väčšina xenobiotík sa podieľa na syntéze humínových látok, či už sú to samotné pesticídy alebo aj ich degradačné produkty. Tieto zlúčeniny majú schopnosť tvoriť stabilné komplexy s pôdnymi organickými zložkami, čo má veľký význam pre ich ďalšie chemické pôsobenie v pôde. Vzrastá ich perzistencia v pôde, čo môže mať za následok rôzne vplyvy na životné prostredie[7]. Ich toxicita a chemické pôsobenie sa môže aktivovať, alebo naopak môžu stratiť svoju identitu a správanie sa ako xenobiotika. Viacerí autori[8–10] uvádzajú organickú hmotu ako jeden z najdôležitejších parametrov pôdneho prostredia, ktoré najviac ovplyvňujú mobilitu, resp. sorpciu kontaminantov v pôde. Jednou z takýchto prírodných organických zlúčenín môžu byť aj humínové kyseliny. V tejto súvislosti uvádzajú aj ďalší autori vynikajúce sorpčné schopnosti humínových kyselín[11–15]. Väzba xenobiotík na HK sa teda stáva jednou z majoritných reakcií, ktorou môžu byť antropogénne zlúčeniny v prírode transformované[16,17].

Tuhé povrchy vo viacerých zložkách prostredia môžu výrazne ovplyvňovať aktivitu pôvodných mikroorganizmov. Aktívnymi povrchmi môžu byť ílovité minerály, organická frakcia pôdy alebo sedimentu, predovšetkým humínové látky, komplexy uhlíkatej hmoty, alebo aj amorfné oxidy Fe a Al alebo hydroxidy. Tuhé povrchy často spôsobujú adsorpciu, čo značí zadržiavanie látok pôvodne prítomných v roztoku povrchom tuhého materiálu. Absorpcia znamená zadržiavanie látky vnútri tuhej fázy, nie na povrchu. Termín sorpcia zahrňuje popis oboch javov. Mnohé procesy týkajúce sa sorpcie na povrchoch ílovitých minerálov a humínových materiálov majú veľkú plochu na jednotku hmoty, napr. gram ílu môže mať povrch od 20 do 80 m^2 (cit.[18]).

Pri eliminácii kontaminantov sorpciou na pôdne častice dochádza k zníženiu mobility a tým v podstate aj toxicity príslušného kontaminantu, nakoľko časť kontaminantu viazaná na pôdne štruktúry je v podstate inertná voči mikrobiálnemu ataku. Kontaminanty sú pevne zakomponované do pôdnej štruktúry, sú imobilizované. Avšak toto spojenie nemusí byť trvalé. Väzby medzi sorbentom a kontaminantom môžu byť narušené. Biologické a fyzikálno-chemické faktory, ako sú aktivita mikroorganizmov a kyslé dažde sú považované za primárne faktory zodpovedné za uvoľnenie viazaných reziduí[19]. Napriek tomu sa desorbuje do pôdneho roztoku v prírode len malé množstvo kontaminantov, ktoré môže byť následne mineralizované pomocou pôdnej mikroflóry, hydrolytickými podmienkami a inými environmentálnymi faktormi[20].

Štúdiom mechanizmu väzby humínových kyselín na prírodný materiál zeolit (klinoptilolit) sa zaoberali Kabelová a Novotná[21]. Proces imobilizácie podporuje prirodzenú schopnosť pôd eliminovať kontaminanty, viazať ich a tým zabrániť ich prieniku napr. do podzemných vôd. Reháková



Obr. 1. **Štruktúra kaolínu a zeolitu**

a spol.[22] opisujú využitie zeolitov z ekologického hľadiska pri znižovaní obsahu škodlivín v pôde sorpciou polárnych i nepolárnych, anorganických i organických kontaminantov. V súčasnosti sa zvýšenie účinnosti zeolitov dosahuje jednak prípravou syntetických zeolitov[23,24], ale tiež naviazaním rôznych organických zlúčenín na zeolit[25].

Výsledky viacerých štúdií dokazujú, že dekontaminácia poľnohospodárskych pôd môže byť založená aj na aplikácii organo-minerálneho komplexu (OMK), pripraveného na báze lignitových humínových kyselín (organická zložka) a zeolitu alebo kaolínu (anorganická zložka) (obr. 1). Nakoľko oba komponenty sú prírodného pôvodu, uvedená metóda by mala byť prijateľná pre životné prostredie. Dercová a spol.[26] stanovili pri sorpčných experimentoch s PCP lepšiu retenčnú schopnosť takéhoto komplexu v porovnaní s čistým zeolitom. Takisto bola dokázaná priama úmernosť medzi adsorpčnou schopnosťou OMK a množstvom HK viazanej na zeolit. Imobilizačný efekt OMK vo vzťahu k pentachlórfenolu (PCP) závisí od jeho koncentrácie, od koncentrácie naviazanej HK a množstva pôdneho organického uhlíka[27,28]. Množstvo PCP viazaného na ílový materiál predstavuje len 3–19 %, zatiaľ čo v prípade čistej izolovanej HK predstavuje táto sorpcia až 78 % (cit.[16,17]).

3.2.1. Kovy

Na odstraňovanie toxických kovov z prostredia môžu byť využité rôzne metódy. Keďže kovy ako také nie je možné rozložiť, metódy biodegradácie sú vylúčené. Avšak existujú dve skupiny vhodných metód odlišných svojou podstatou. Prvou z nich je fytoremediácia kovov, ktorá využíva rastliny na fixáciu a akumuláciu kovov, druhú skupinu tvoria metódy využívajúce mikroorganizmy, ktoré sú schopné uskutočňovať aktívny transport, extracelulárnu tvorbu komplexov, biosorpciu, precipitáciu alebo konverziu ťažkých kovov na menej toxické formy[29,30].

Szabová a spol.[31] uvádzajú využívanie ílových minerálov (kaolín, bentonit, zeolity) v snahe vytvoriť predpoklady pre zníženie koncentrácie ťažkých kovov v pôdnom roztoku a tým znížiť ich príjem rastlinami. Na imobilizáciu ťažkých kovov sa v súčasnosti využívajú už spomenuté syntetické zeolity[23,24]. Kwiatkowska a Maciejewska[32] úspešne využili sorbenty na báze humínových kyselín izolovaných z rašelín a hnedého uhlia na zníženie mobility ťažkých kovov v pôde. V prirodzenom pôdnom prostredí sú však anorganické i organické zložky pôdy vo vzájomnej interakcii a z toho dôvodu viacerí autori[12,33] skúmajú retenčnú schopnosť organo-minerálnych komplexov účinne znižovať mobilitu ťažkých kovov v pôde.

Sorpciou a desorpciou ťažkých kovov, konkrétne kadmia, na humínové kyseliny sa zaoberali aj Barančíková a spol.[34]. Retenčné experimenty potvrdili, že rôzne typy pôd preukazujú rôznu retenčnú schopnosť voči kadmiu.

Predbežné výsledky týkajúce sa účinku OMK pri znižovaní mobilných foriem ťažkých kovov poukazujú na zníženie mobility kadmia a olova. Zníženie prístupných foriem kadmia sa odzrkadlilo aj v znížení jeho koncentrácie v zrne jačmeňa pestovaného na sledovaných pôdach[35]. Mohan a Chander[36] študovali vplyv teploty a pH na sorpciu niektorých kovových katiónov (Fe(II), Fe(III), Mn (II), Zn(II)) na lignit. Adsorpcia niektorých iónov (Fe^{2+}) na lignit sa s narastajúcou teplotou zvyšovala, kým u Mn^{2+} bol tento trend opačný. Oren a Chefetz[28] však zistili, že sorpčná schopnosť humínových látok klesá po ich naviazaní na anorganický nosič. Sorpcia kadmia na izolované humínové kyseliny bola približne 7× väčšia ako v prípade pôd, z ktorých boli tieto kyseliny izolované[34].

3.2.2. Organické látky

Neprístupnosť organickej molekuly môže byť výsledkom jej sorpcie na tuhé zložky prostredia, jej prítomnosť v nevodnej fáze, alebo jej uchytenie sa vnútri fyzikálneho matrixu pôdy, sedimentu alebo vodnej zložky[37]. HK sú mimoriadne aktívne pri interakciách rôznych organických a anorganických kontaminantov, ovplyvňujú ich mobilitu, bioprístupnosť, degradáciu a fytotoxicitu[38]. Tento fakt je možné na druhej strane využiť na sorpciu hydrofóbnych polutantov, napr. na organo-minerálny nosič a tým zabrániť ich ďalšiemu šíreniu napr. do podzemných vôd. Pri vysokých koncentráciách organických látok (napr. PCP) v prostredí by táto metóda mohla slúžiť ako „predúprava“ následnej biodegradácie organických xenobiotík[39].

Sorpciu organických zlúčenín ovplyvňuje viacero faktorov. Patria medzi nich typ a koncentrácia látky v roztoku, typ a kvalita ílovitých minerálov, množstvo organickej hmoty v pôde alebo v sedimente, pH, teplota, typ katiónu (Fe, Ca alebo vodíkové ióny), výmenná kapacita a špecifický povrch ílov. Sorpciu PCP zo spodných vôd pomocou pórovitých organo-ílov študovali aj Ake a spol.[40].

Pu a Cutright[41] skúmali sorpčno-desorpčné správanie sa PCP na pôdnu organickú hmotu (POH) a ílové minerály. Dospeli k záveru, že sorpcia je funkciou ako POH (kvantita aj kvalita), tak aj ílových minerálov (typ a kvan-

tita), ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri maximálnej sorpcii a minimálnej desorpcii PCP. Avšak molekulová hmotnosť HL nehrá u hydrofóbnych organických polutantov takmer žiadnu rolu vo vzťahu k ich sorpčnej kapacite[42].

Vplyvom pH na sorpciu chlórovaných fenolov na mokrú vrstvu piesku a štúdovaním typov interakcií prebiehajúcich pri týchto procesoch sa zaoberali Amiri, Börnick a Worch[43].

3.2.3. Biologická aktivita HK a ich väzba na mikroorganizmy

Humínové kyseliny, resp. ich zdroje sú známe aj pre svoju biologickú aktivitu[44] najmä vďaka ich antioxidačným, antitoxickým, rádioprotektívnym a antimutagénnym vlastnostiam[45] a používajú sa ako nešpecifické stimulátory pri pestovaní kultúrnych rastlín[46,47]. Biologická aktivita humínových kyselín sa zisťuje napríklad pomocou merania dĺžky koreňového systému rastliny. Poľnohospodárske rastliny, na ktoré pozitívne pôsobia humínové kyseliny, sú rozdelené do štyroch skupín[48]: rastliny bohaté na uhľohydráty – veľmi pozitívne pôsobenie, obilniny – mierny vplyv, na proteíny bohaté rastliny – len minimálny vplyv a olejnaté rastliny, u ktorých sa zistil negatívny vplyv humínových kyselín na vývoj rastlín. Vzťah medzi zložením a biologickou aktivitou humátov skúmali aj Bogoslivskiy a spol.[49].

Baktéria *Rhodococcus erythrophylis* CCM 2595, ktorá disponuje schopnosťou degradovať fenolické zlúčeniny, bola vybraná ako modelový prokaryotický organizmus v sorpčných experimentoch humínových kyselín na povrch týchto bakteriálnych buniek[50] (obr. 2). Miera sorpcie humínovej kyseliny závisí od množstva sorbentu, čiže v tomto prípade od koncentrácie biomasy. Ďalším, ešte dôležitejším faktorom je vplyv pH, kde sa zistila nepriama závislosť. Lepšie výsledky sorpcie HK na biomasu boli zaznamenané pri nižšej hodnote pH. Počas biodegradácie organických xenobiotík bol skúmaný vplyv HK na mikroorganizmy a zistilo sa, že sa ľahko a rýchlo sorbujú na povrch mikroorganizmu. Sledoval sa aj vplyv prídavku fenolu (ako stresového faktora) do kultivačného média, ktorý pravdepodobne ovplyvnil iniciáciu sorpcie HK na biomasu. V experimentoch bez prídavku fenolu bola zaznamenaná nižšia sorpcia PCP na bakteriálny povrch ako v jeho prítomnosti[50].

Vrstva sorbovanej humínovej kyseliny slúži pravdepodobne ako transportná bariéra znižujúca priechod molekúl do vnútrobunkového priestoru. Tak zrejme chráni bunku pred nepriaznivými podmienkami prostredia (nízke pH, vysoká koncentrácia toxických látok) a napomáha rastu a biologickej aktivite mikroorganizmu a biodegradácii, aj po pridaní vyššej koncentrácie toxickej látky[52,53]. Negatívny toxický účinok organických xenobiotík na mikroflóru sa prejavil v poklese rastu bakteriálneho kmeňa *Kocuria varians*, ktorý disponuje schopnosťou degradovať chlórfenoly. Takisto došlo k zníženiu indexu nenasýtenia mastných kyselín dvoch hlavných membránových lipidov, fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu. Bolo zistené, že účinkom chlórfenolov na bunkovú membránu dochádzalo k inhibícii Δ^9 a Δ^{12} desaturáz, čo sú enzýmy lokalizované v bunkovej membráne zodpovedné za biosyntézu nenasýtených mastných kyselín[54].

Zistilo sa, že biologická aktivita humínových kyselín závisí od pôvodu (suroviny) a od spracovania, teda postupu ich izolácie. Nie všetky humínové kyseliny sú biologicky aktívne, niektoré môžu pôsobiť dokonca inhibične[44]. Humínové kyseliny sprostredkovávajú prenos živín a spoluvytvárajú štruktúru pôdy.

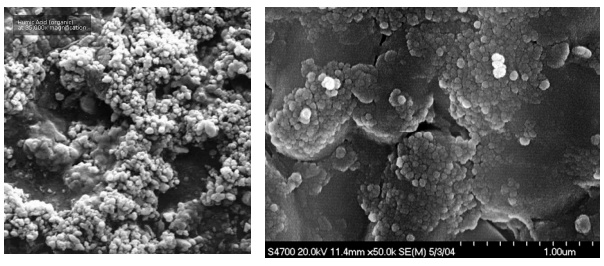
Novák a spol.[55] skúmali možnosť využitia odpadového uhlia zvýšením obsahu humínových látok oxidáciou. Bolo zistené, že biologická aktivita takto pripravených humínových látok je porovnateľná s aktivitou humínových látok extrahovaných z oxyhumolitu.

3.3. Úloha enzýmov ako katalyzátorov pri imobilizácii xenobiotík na humínové kyseliny

Proces imobilizácie vyskytujúci sa v pôdach má veľký environmentálny význam, pretože môže viesť k značnému zníženiu bioprístupnosti pesticídov a tým aj ich toxických účinkov[56,57]. Imobilizačný proces sprostredkovávajú enzýmy alebo abiotické katalyzátory. Jednou z najdôležitejších katalytických reakcií v pôde je oxidačná väzba, ktorá viaže prírodne sa vyskytujúce a tiež xenobiotické zlúčeniny, ako sú napr. pesticídy, na organickú hmotu. Táto reakcia môže byť sprostredkovaná oxidoreduktázami a môže mať detoxifikačný efekt. A tak imobilizácia pesticídov väzbou na pôdne komponenty, napr. zabudovaním do štruktúry humínových kyselín, môže byť uvažovaná ako alternatívna metóda na dekontamináciu pôd[16].

Xenobiotické fenoly sú najprv enzymaticky oxidované na aryl-oxy voľné radikály alebo chinóny, čo následne umožňuje ich väzbu na humínové zložky. Napríklad, keď Sarkar a spol.[58] inkubovali 2,4-dichlórfenol s fulvo kyselinou, žiadna väzba nebola pozorovaná až do prídavku oxidoreduktáz, napr. hubovej tyrozinázy, chrenovej peroxidázy, alebo lakkázy z *Trametes versicolor* alebo *Rhizoctonia praticola.*

a b



Obr. 2. **Humínové kyseliny sorbované (a) na povrchu pôdnej častice** (cit.[6]), **(b) a na povrchu baktérie *Rhodococcus erythrophylis*** (cit[51])

Avšak použitie mikrobiálnych extracelulárnych enzýmov ako katalyzátorov je sťažené skutočnosťou, že voľné enzýmy sú za drsných podmienok v pôde rýchlo inaktivované. Tento problém môže byť prekonaný imobilizáciou voľných enzýmov na tuhé nosiče. Bolo dokázané, že imobilizácia zvyšuje termostabilitu enzýmov, zabraňuje ich degradácii proteázami, a zvyšuje ich polčas rozpadu. Avšak enzýmová aktivita po imobilizácii závisí na metóde imobilizácie a podstate tuhého nosiča[58,59].

Použitie enzýmovej väzby na detoxifikáciu vyvoláva určité znepokojenie nad konečným osudom viazaných pesticídov. Dostupné dáta však indikujú, že ak sú už raz xenobiotiká inkorporované do pôdy, uvoľňujú sa veľmi pomalou rýchlosťou a v minimálnom rozsahu. Postupné uvoľňovanie by nemalo spôsobovať následné nebezpečie pre zdravie, pretože postupne uvoľnené zlúčeniny môžu byť mineralizované na CO_2 alebo reimobilizované do pôdnej matrice.

Za účelom praktickej aplikácie enzymatickej dekontaminácie je potrebný rozsiahly výskum pre analyzovanie akumulácie, bioprístupnosti a toxicity viazaných reziduí pesticídov za pôdnych podmienok. Výskum by mal byť sústredený na vývoj nových metód pre maximalizáciu väzbového procesu, napr. s použitím imobilizovaných enzýmov, abiotických katalyzátorov, alebo kopolymérnych činidiel. Všetky doterajšie výsledky naznačujú, že enzymatická alebo abiotická inkorporácia xenobiotík do humusu poskytuje účinnú metódu pre detoxifikáciu nebezpečných polutantov[16].

Hydrofóbne látky, globálne kontaminanty životného prostredia, sú nebezpečné najmä vtedy, ak sa v pôde vyskytujú dlhodobejšie, čím sa úmerne zvyšuje ich perzistencia. Dochádza k výraznému zníženiu ich biodostupnosti pre potenciálnych mikrobiálnych degradérov, čím sa zhoršujú možnosti redukovania týchto látok prirodzenou biologickou cestou. V takomto prípade je možné na zníženie ich hydrofóbnosti použiť povrchovo aktívne látky, ktoré avšak môžu negatívne ovplyvňovať degradačnú aktivitu prítomných mikroorganizmov a v konečnom dôsledku sa aj tieto látky, tzv. biosurfaktanty, pokiaľ nie sú biodegradovateľné, stávajú kontaminantami.

Napriek pochybnostiam niektorých autorov[60], Fava a spol.[61,62] úspešne využili vyššie opísané pozitívne vlastnosti humínových látok ako prirodzene sa vyskytujúcich povrchovo aktívnych látok na podporu aktivity pôdnych mikroorganizmov v prostredí kontaminovanom vysokými koncentráciami polyaromatických uhľovodíkov (PAH) a polychlórovaných bifenylov (PCB). V experimentoch dokázali, že prídavok HL výrazne ovplyvnil aktivitu prítomnej mikroflóry a tiež biodegradáciu PCB. V prítomnosti HL bola preukázaná vyššia odolnosť mikroorganizmov voči PCB v porovnaní so vzorkami bez prídavku HL. Tým bola dosiahnutá až o 100 % vyššia dechlorácia a biodegradácia PCB. Takisto bol študovaný vplyv HL na aeróbnu bioremediáciu pôdy kontaminovanej PAH. HL umožňovali zvýšenie biodostupnosti PAH, v dôsledku čoho bola redukcia týchto látok v prítomnosti HL rýchlejšia a intenzívnejšia, čo spôsobilo aj výrazné zníženie pôdnej ekotoxicity.

Chlórované fenoly, najmä pentachlórfenol, tiež patria k častým kontaminantom životného prostredia a vyznačujú sa podobnými vlastnosťami ako vyššie uvedené hydrofóbne látky. Humínové látky, resp. humínové kyseliny sú využívané aj pri laboratórnych experimentoch na bioremediáciu PCP v pôde[26,27,35,39]. Cieľom je potvrdenie a doplnenie už existujúcich jednoznačných dôkazov, získaných na PCB a PAH, čo by znamenalo možné využitie HK v bioremediačných technológiách aj pri dekontaminácii PCP a pesticídov, ktorých sú často hlavnou zložkou.

4. Záver

Je známe, že fenolické zlúčeniny slúžia ako prekurzory humínových kyselín. Tento fakt je možné využiť pri imobilizácii a detoxifikácii pôdnych kontaminantov. Medzi ne často patria chlórfenoly známe ako základné zložky mnohých pesticídov. Štruktúra prírodných humínových kyselín je vhodná pre sorpčné, iónovo-výmenné a biodegradačné procesy. Dokonalá znalosť vlastností týchto látok je nevyhnutná pre ich širšie uplatnenie aj v remediačných technológiách.

Zoznam skratiek

HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
FK	fulvokyseliny
OMK	organo-minerálny komplex
PAH	polyaromatické uhľovodíky
PCB	polychlórované bifenyly
PCP	pentachlórfenol
POH	pôdna organická hmota

LITERATÚRA

1. Hansen H. C. B., Kobza J., Schmidt R., Szakál P. Borgaard O. K., Holm P. E., Kanianska R., Bognarova S., Makovníková J., Matúšková L., Mičuda R., Styk J., v knihe: *Environmental Soil Chemistry,* str. 191. Pedagogická spoločnosť Jána Ámosa Komenského, Banská Bystrica 2001.
2. Skokanová M., Dercová K.: Chem. Listy *102*, 262 (2008).
3. Lear G., Harbottle M. J., Sills G., Knowles C. J., Semple K. T., Thompson I. P.: Environ. Pollut. *146 (1)*, 139 (2007).
4. Moore B. J., Headley V., Dupont R. R., Doucette W. D., Armstrong J. E.: J. Environ. Sci. Health *A37*, 425 (2002).
5. Veselá L., Kubal M., Kozler J., Innemanová P.: Chem. Listy *99*, 711 (2005).
6. http://www.humintech.com/, stiahnuté 26.3.2007.
7. Tan K. H.: *Environmental Soil Science.* Marcel Dekker, New York 2000.

8. Brüeß A., Turion G., Noltner T. A., Schweikle V.: Mitteil. DBG *76*, 1461 (1995).
9. Malcolm R. E., v knihe: *Developments in Plant and Soil Sciences*, str. 2. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht 1985.
10. Podlešáková E., Němeček J., Roth A.: Rostl. Výroba *45*, 337 (1999).
11. Seki H., Suzuki A.: J. Coll. Inter. Sci. *171*, 490 (1995).
12. Taylor M. D., Theng B. K. G.: Commun. Soil. Sci. Pl. Anal. *26*, 765 (1995).
13. Klučáková M., Omelka M.: Chem. Pap. *58 (3)*, 170 (2004).
14. Klučáková M., Pekař M., v knihe: *Humic Substances: Natures's Most Versatile Materials* (Ghabbour E., Davies G., ed.), str. 263. Taylor and Francis, New York 2004.
15. Klučáková M.: CHEMagazín *14 (3)*, 8 (2004).
16. Agathos N. S., Reineke W.: *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation* (Hofman M., Anné J., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
17. Bollag J. M., v knihe: *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation* (Agathos N., Reineke W., ed.), str. 93. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
18. Simpson A., Kingery W., Foan E., Hatcher P.: *11th International meeting of the Humic Substances Society: Humic Substances: Natures's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, str. 447.
19. Alexander M.: Environ. Sci. Technol. J. *29*, 2713 (1995).
20. Dec J., Bollag J. M.: Soil Sci. Soc. Am. J. *52*, 1366 (1988).
21. Kabelová Z., Novotná M.: ChemZi *1*, 266 (2005).
22. Reháková M., Čuvanová S., Gavaľová Z., Rimár J.: Chem. Listy *97*, 260 (2003)
23. Oste A. L., Lexmond T. M., Riemsdijk van H.: J. Environ. Qual. *31*, 813 (2002).
24. Vácha R., Podlešáková E., Němeček J., Poláček O.: Plant Soil Environ. *48*, 335 (2003).
25. Huttenloch O., Roehl K. E., Czurda K.: Environ. Sci. Technol. *35*, 4260 (2001).
26. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J.: Int. Biodeter. Biodegr. *58*, 248 (2006).
27. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J.: Chemosphere *66*, 783 (2007).
28. Oren A., Chefetz B.: Chemosphere *61*, 19 (2005).
29. Dercová K., Barančíková G., Makovníková J., Sejáková Z., Žuffa J.: Chem. Listy *99*, 682 (2005).
30. Makovníková J., Barančíková G., Dlapa P., Dercová K.: Chem. Listy *100*, 424 (2006).
31. Szabová T., Búgel M., Leščinská M: Acta Montan. Slovaca *4*, 61 (1999).
32. Kwiatkowska J., Maciejewska A.: *11th International meeting of the Humic Substances Society: Humic Substances: Natures's most versatile materials, Boston 2002*. Proceedings, str. 295.
33. Arias M., Barral M. T., Mejuto J. C.: Chemosphere *48*, 1081 (2002).
34. Barančíková G., Brečková V., Dlugoš J.: Rostl. Výroba *43*, 107 (1997).
35. Dercová K., Barančíková G., Makovníková J., Sejáková Z., Skokanová M.: Vedecké práce VÚPOP *28*, 22 (2006).
36. Mohan D., Chander S.: J. Colloid Interface Sci. *299*, 76 (2006).
37. Passo N., Peuravouri J., Lehtonen T., Pihlaja K.: Environ. Int. *28*, 173 (2002).
38. Clapp C. E., Hayes M. H. B., Senesi N., Bloom P. R., Jardine P. M. (ed.): *Humic Substances and Chemical Contaminants*. Soil Science Society of America, Madison 2001.
39. Dercová K., Sejáková Z., Skokanová M., Barančíková G., Makovníková J., Ružička J.: Chem. Listy *101, 799 (2007)*.
40. Ake C. L., Wiles M. C., Huebner H. J., McDonald T. J., Cosgriff D., Richardson M. B., Donnely K. C., Phillips T. D.: Chemosphere *51*, 835 (2003).
41. Pu X., Cutright T. J.: Chemosphere *64*, 972 (2006).
42. Voskamp M., Gergi A., Kopinke F.-D.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 853.
43. Amiri F., Börnick H., Worch E.: Water Res. *39*, 933 (2005).
44. Antošová B., Kozler J., Novák J., Kubíček J., Horová D., Vondrová I.: ChemZi *1*, 256 (2005).
45. Gostishcheva M., Inisheva L. I., Fedko I.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 445.
46. Pekař M., Klučáková M., Omelka L., Zedníčková P.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1029.
47. Imbufe A. U., Patti A. F., Surapaneni A., Jackson W. R., Norng S.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1013.
48. Khristeva L. A.: Pochvivedenie *10*, 46 (1953).
49. Bogoslovskiy V. N., Levinskiy B. V., Kalabin G. A.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006*. Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 1025.
50. Feifičová D., Čejková A., Masák J., Siglová M., Jirků V.: *Third European Bioremediation Conference, Crete, Chania, Greece 2005*. Proceedings (Kalogerakis N., ed.), str. 143.
51. Feifičová D., Šnajdr J., Siglová M., Čejková A., Masák J., Jirků V.: Chimia 59, 749 (2005).
52. Feifičová D., Čejková A., Masák J., Siglová M: *Sanační technológie VIII, Uherské Hradiště 2005*. Zborník príspevkov (Burkhard J., Halousková O., ed.), str. 123.
53. Tchaikovskaya O., Sokolova I., Karetnikova E., Iva-

nova E.: *13th Meeting of the International Humic Substances Society, Karlsruhe, Germany 2006.* Proceedings (Frimmel F. H., Abbt-Braun G., ed.), str. 925.
54. Dercová K., Čertík M., Maľová A., Sejáková Z.: Int. Biodeter. Biodegr. *54*, 251 (2004).
55. Novák J., Kozler J., Antošová B.: ChemZi *1*, 275 (2005).
56. Alexander M.: *Biodegradation and Bioremediation.* Academic Press, San Diego 1994.
57. Hatzinger P., Alexander M.: Environ. Sci. Technol. *29*, 537 (1995).
58. Sarkar J., Malcom R., Bollag J. M.: Soil Sci. Soc. Am. Inc. J. *52*, 688 (1988).
59. Ruggiero P., Sarkar J. M., Bollag J. M.: Soil. Sci. *147*, 361 (1989).
60. Siglová M., Daňha D., Čejková A., Masák J., Jirků V., Minařík M.: *Sanační technológie VIII, Uherské Hradiště 2005.* Zborník abstraktov (Burkhard J., Halousková O., ed.), str. 127.
61. Fava F., Piccolo A.: Biotechnol. Bioeng. *88 (2)*, 214 (2004).
62. Fava F., Berselli S., Conte P., Picollo A., Marchetti L.: Biotechnol. Bioeng. *77 (2)*, 214 (2002).

M. Skokanová and K. Dercová *(Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic):* **Interactions of Humic Acids with Contaminants**

Humic acids are the most important and a major part of naturally occurring humic substances. They form a complex amorphous heterogeneous mixture containing reactive structures such as aromatic rings and phenolic and carboxylic functional groups. Humic acids have excellent sorption properties and thus are widely used in remediation methods by immobilization of toxic contaminants.

Chem. Listy *102*, 346−352 (2008) Referát

FYTOREMEDIACE A MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ JEJICH ÚČINNOSTI

PETR SOUDEK[a], ŠÁRKA PETROVÁ[a], DAGMAR BENEŠOVÁ[a,b], JAN KOTYZA[a,b] a TOMÁŠ VANĚK[a]

[a] *Laboratoř rostlinných biotechnologií, Společná laboratoř ÚEB AV ČR, v.v.i. a VÚRV, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje,* [b] *Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6*
soudek@ueb.cas.cz

Došlo 16.8.07, přijato 27.9.07.

Klíčová slova: fytoremediace, rostliny, akumulace, toxické kovy, organické sloučeniny, hyperakumulátory, fytochelatiny, kořenové exudáty, chelatace, GMO

Obsah

1. Co jsou to fytoremediace?
2. Rozdělení fytoremediačních technik
   2.1. Fytodegradace
   2.2. Rhizodegradace
   2.3. Fytostabilizace
   2.4. Fytoakumulace
   2.5. Rhizofiltrace
   2.6. Fytovolatilizace
3. Proč fytoremediace?
4. Zdroje kontaminace
5. Proč rostliny přijímají toxické kovy?
6. Hyperakumulátory
7. Molekulární mechanismus příjmu toxických kovů
8. Zvýšení účinnosti fytoremediace
   8.1. Somatická hybridizace
   8.2. Genetická manipulace
9. Plánování a aplikace fytoremediace
10. Závěr

1. Co jsou to fytoremediace?

Jednou z možností, jak odstranit kontaminaci z životního prostředí, je využít tzv. přirozenou atenuaci. Proces „přirozeného snižování kontaminace“ (přirozená atenuace – MNA) je definován jako souhrn dějů přirozeně se vyskytujících v životním prostředí, které bez lidského zásahu vedou k omezení množství, toxicity, mobility, objemu nebo koncentrace kontaminantů.

Naproti tomu byly fytoremediace definovány jako využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů z životního prostředí. Při fytoremediacích se mohou uplatňovat čtyři různé procesy: extrakce kontaminantů z půdy a vody (hlavně těžkých kovů a radionuklidů), degradace organických sloučenin, volatilizace organických sloučenin (ale také některých anorganických jako např. Hg, Se a As) a stimulace mikrobiálního metabolismu v rhizosféře. Přesná klasifikace fytoremediačních technik je uvedena v tab. I. Fytoremediační techniky se dělí podle typu kontaminantu a jeho zpracování rostlinami. V posledním sloupci jsou popsány typické rostliny, které bývají užívány pro jednotlivé aplikace[1].

Mechanismus fytoremediace těžkých kovů může být zjednodušeně popsán jako odstranění kovů z půdy jejich transportem do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně sklizeny a odstraněny a plocha je opět osázena rostlinami do té doby, než se koncentrace kovů v půdě sníží na přijatelnou hladinu[2].

V případě organických látek se enzymy v kořenech rostlin účastní degradace organických kontaminantů. Fragmenty jsou pak zabudovány v nové rostlinné biomase[2]. Fytodegradace využívá některé ze stejných enzymů, které se podílejí na akumulaci v tkáních. Enzymy schopné modifikovat organické látky tím, že vytvářejí postranní skupiny na organických sloučeninách a tím zvyšují rozpustnost a umožňují konjugaci, hrají ve výchozích krocích fytodegradace významnou roli. Mezi tyto skupiny enzymů účastnících se fytodegradace patří dehalogenasy, mono- a dioxygenasy, peroxidasy, peroxygenasy, karboxylesterasy, laccasy, nitrilasy, fosfatasy a nitroreduktasy[4].

2. Rozdělení fytoremediačních technik

2.1. Fytodegradace

Fytodegradace je proces, při němž dochází k absorpci, přeměně a odbourávání kontaminantu uvnitř rostliny. Za fytodegradaci lze považovat i proces snižování kontaminantu v důsledku uvolňování enzymatických metabolitů rostliny do půdy. Fytodegradace se používají především pro odstraňování organických polutantů[5] (PAH, PCB, výbušniny, detergenty). Při fytodegradacích je potřeba zajistit, aby nedocházelo k přeměnám na metabolity, které jsou toxičtější, než samotný polutant.

2.2. Rhizodegradace

Metoda pracuje na základě zvýšení množství půdních bakterií v půdě díky kořenovému systému vysázených rostlin, což umožňuje snížit množství kontaminantu v půdě[6]. Kořeny vylučují do půdy mnoho organických

Tabulka I
Typické rostliny použité při různých fytoremediačních aplikacích[3]

Aplikace	Médium	Kontaminanty	Typické rostliny
Fytotransformace	půda, podzemní voda, výluhy ze skládek, aplikace odpadních vod na půdy	herbicidy; chlorované alifatické uhlovodíky (např. TCE); aromatické uhlovodíky (např. BTEX); explosiva (TNT, RDX, HMX, perchlorát); živiny (dusičnany, amoniak, fosfáty)	freatofytické stromy (čeleď Salix, včetně topolu, vrby, amerického topolu); trávy (žito, kostřava, troskut prstnatý, čirok, proso panenské, rákos, lesknice kanárská); Fabaceae (jetel, vojtěška, vigna)
Rhizosferní bioremediace	půda, sedimenty, aplikace na půdu, omezené skládky	biodegradovatelné organické látky (BTEX, TPH, PAHs, PCBs, pesticidy)	traviny s vláknitými kořeny (troskut prstnatý, kostřava, žito); uvolňovače fenolických látek (moruše, jabloň, *Maclura aurantica*), freatofytické stromy
Fytostabilizace	půda	kovy (Pb, Cd, Zn, As, Cu, Cr, Se, U); hydrofobní organické sloučeniny, které nejsou degradovatelné	freatofytické stromy pro hydraulickou kontrolu; trávy s vláknitými kořeny pro kontrolu eroze
Fytoextrakce	půda, sedimenty, brownfields	kovy (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu)	hořčice sareptská (*Brassica juncea*); slunečnice (*Helianthus* spp.); *Thlaspi carulescens*
Rhizofiltrace	podzemní voda, odpadní voda přes umělé mokřady	kovy (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu); radionuklidy, hydrofobní organické sloučeniny	vodní rostliny: mokřadní (orobinec, růžkatec, *Potamogeton nodosus*, maranta třtinová); vodní (řasy, parožnatka, stolístek vodní, *Hydrilla* spp.)
Fytovolatilizace	půdy a sedimenty	Se, As, Hg, těkavé organické sloučeniny (např. MTBE)	*Brassica juncea*; mokřadní rostliny; freatofytické stromy pro zachycení podzemních vod

Pozn.: BTEX – benzen, toluen, ethylbenzen a celkový xylen; HMX – oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin; MTBE – methyl-*terc*-butylether; PAHs – polycyklické aromatické uhlovodíky; PCBs – polychlorované bifenyly; RDX – hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin; TCE – trichloroethylen; TNT – 2,4,6-trinitrotoluen; TPH – celkové ropné uhlovodíky

sloučenin (např. cukry nebo alkoholy), jež se stávají potravou pro půdní bakterie. Díky dostatku živin počet mikroorganismů rapidně vzrůstá a dochází také ke stimulaci jejich aktivity, což je důležité pro odbourávání okolních polutantů.

2.3. Fytostabilizace

Fytostabilizace využívá rostliny k imobilizaci vodních a půdních kontaminantů. Závisí na chemických, biologických a fyzikálních vlastnostech půdy. Kořenový systém díky adsorpci, absorpci, komplexaci a precipitaci snižuje možnost vymývání kontaminantu z půdy, sedimentů a kalů. Při fytostabilizaci se dále uplatňuje vliv produkce huminových látek, které váží kontaminant v půdě. Svým vzrůstem také zabraňují vodní a větrné erozi, čímž zabraňují rozptylu kontaminace na povrchu. Fytostabilizace lze užít tam, kde je potřeba obnovit vegetační pokrývku, ale kvůli vysoké kontaminaci nelze na zasaženém území aplikovat běžnou vegetaci. Užívá se pro finální úpravu ploch, kde byly k odstranění znečištění použity jiné sanační technologie.

2.4. Fytoakumulace

Je metoda založená na absorpci kontaminantu kořeny rostliny s následnou akumulací v nadzemní části rostliny. Po této fázi následuje sklizeň rostlin, se kterými je nutno zacházet jako s odpadem a je tedy nutné před samotnou aplikací rostlin dobře uvážit, jakým způsobem bude s takto vzniklým odpadem dále nakládáno. Nutným předpokladem pro fungování metody je hyperakumulační vlastnost rostlinného druhu vůči sanovanému kontaminantu. Metoda se s úspěchem používá při sanaci těžkých kovů, polokovů (As, Se), radionuklidů a nekovů (např. B), avšak není příliš vhodná pro organické látky, které mohou být rostlinou metabolisovány na ještě toxičtější sloučeninu nebo mohou být rostlinou vydýchány do ovzduší.

Jednou z možností využití fytoakumulace je fytomining. Fytomining využívá rostlin pro zpracování neekonomické rudy. „Rostlino-horníci“ budou pěstovat a sázet hyperakumulující rostlinné druhy. Následně sklidí rostlinnou biomasu a spálí ji a vyprodukují „bio-rudu“.

Fytomining má následující jedinečné možnosti:

- nabízí možnost využití rud a zrudněných půd, které je neekonomické zpracovávat konvenčními metodami,
- „bio-ruda“ je prakticky bezsirná a její tavba vyžaduje méně energie než sulfidické rudy,
- obsah kovu v „bio-rudě“ je obvykle mnohem vyšší než v rudě běžné, a proto potřebuje méně skladovacího místa,
- fytomining je „green“ technologie, která jako alternativa k povrchovému dolování podřadných rud, by umožnila nepřesunovat půdní materiál.

2.5. Rhizofiltrace

Rhizofiltrace se aplikuje při odstraňování kontaminantu z povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod použitím kořenového systému rostlin. Dochází k precipitaci kontaminantu na kořenovém systému nebo k absorpci přímo v kořenech. Na rozdíl od fytoextrakce jsou při rhizofiltraci cílovou částí rostliny kořeny. Metoda je cenově výhodná pro případy znečištění velkých objemů vody malými koncentracemi polutantů. S úspěchem se používá např. v Černobylu, kde se díky slunečnicím odstraňují isotopy Cs a Sr z povrchových vod[7].

2.6. Fytovolatilizace

Při fytovolatizaci dochází k příjmu kontaminantu kořenovým systémem rostliny a transportu do nadzemní části, v některých případech ještě následovaný biotransformací kontaminantu. Poté proběhne transpirace těkavého kontaminantu, těkavého produktu metabolismu nebo těkavé formy původně netěkavé látky. Metodu lze aplikovat spíše při odstraňování organických polutantů, jako je např. MTBE a jiné složky benzinu. Příkladem je použití topolu žlutého na půdy znečištěné rtutí. Topol může díky bakteriím obsahujícím rtuť-reduktasu redukovat HgII na kovovou rtuť a tu následně vydýchat do ovzduší[8]. Použití fytovolatizace je nicméně kontroverzní, neboť nedochází k odstranění kontaminace, ale pouze k přesunu kontaminantu z půdy do ovzduší.

3. Proč fytoremediace?

Jednou z největších výhod fytoremediací je množství kontaminovaného materiálu, který je nutno likvidovat v porovnání s klasickým vytěžením kontaminované půdy. Dalšími výhodami těchto metod jsou[9]:

- aplikace *in situ* (není potřeba transportovat kontaminovanou půdu),
- pasivní metoda (pro čištění není potřeba lidského personálu, kromě setí a některých agronomických technik),
- využívá solární energii (pro fotosyntézu, která je zdrojem energie pro všechny biochemické procesy v zelených rostlinách),
- transfer kontaminantů je rychlejší než přírodní atenuace,
- vysoce akceptovatelné veřejným míněním (lidé mají mnohem více rádi zelenou přírodu než měsíční krajinu),
- snížení plynných a vodních emisí (např. snížení prašnosti),
- půda zůstává na místě a je možné ji využít k jinému účelu (např. pěstování energetických a technických plodin),
- slučitelné s „klasickými“ dekontaminačními technologiemi (např. fytoremediace jako konečná metoda pro dočištění na požadovanou úroveň).

Na druhou stranu mají tyto metody samozřejmě také mnoho nevýhod nebo omezení[10]:

- nízká tolerance rostlin vůči polutantům (mnoho sloučenin je toxických ve vysokých koncentracích, přestože jsou rostliny mnohem více rezistentní než zvířata či člověk),
- obvykle nízký transport kontaminantů z kořenů do nadzemních částí (důležité protože jsme obvykle schopni sklidit pouze nadzemní část rostlin),
- malá velikost rostlin schopných remediace (kontaminanty redukují růst rostlin a hyperakumulátory jsou obvykle rostliny s nízkou produkcí biomasy),
- chybí cena a prováděcí údaje (potřeba kalkulace ceny),
- neobeznámenost s technologií u dozorčích orgánů (lidé a speciálně úředníci mají skepsi vůči novým neznámým metodám),
- ukládání kontaminovaného rostlinného materiálu (potřeba speciálních skládek a nebo řízené spalování),
- nebezpečí kontaminace potravního řetězce (kontaminované rostliny mohou být spásány živočichy),
- kontaminace pod dosahem kořenové zóny (kontaminace může být rozšířena mimo tenkou vrstvu půdy, ve které koření většina rostlin),
- dlouhodobý proces (až desítky let),
- kontaminant je v biologicky nedostupné formě (například hydrofobní organické sloučeniny, nerozpustné anorganické sloučeniny),
- chybí rostlinné druhy vhodné pro remediaci (mnoho hyperakumulátorů roste v subtropickém pásmu).

4. Zdroje kontaminace

Zdroje kontaminace pocházejí z antropogenní činnosti[10] (chemické závody, metalurgie, energetika, doprava atd. a v neposlední řadě pak městská odpadní voda). Hlavní kontaminanty, které produkujeme a které kontaminují vodu, půdu a ovzduší, jsou:

- těžké kovy (Cd, Pb, Cr, As atd.),
- radionuklidy (uran, tricium, ^{60}Co, ^{137}Cs a ^{90}Sr),
- explosiva (TNT, NG atd.),

- barviva a jejich prekurzory,
- pesticidy,
- PCB,
- PAH,
- „nové“ kontaminanty (farmaka, vůně, detergenty atd.).

5. Proč rostliny přijímají toxické kovy?

K růstu a dokončení životního cyklu potřebují rostliny nejen makronutrienty (N, P, K, S, Ca a Mg), ale také esenciální mikronutrienty, jako jsou Fe, Zn, Mn, Ni, Cu a Mo. Rostliny vyvinuly vysoce specifický mechanismus příjmu, translokace a ukládání těchto nutrientů. Navíc citlivé mechanismy udržují intracelulární koncentrace iontů kovů uvnitř fyziologického rozmezí. Obecně lze říci, že mechanismus příjmu je selektivní, rostliny upřednostňují příjem některých iontů před jinými. Mnoho těžkých kovů jako např. Zn, Mn, Ni a Cu jsou esenciální mikronutrienty. Rostliny neakumulují pouze vysoké hladiny esenciálních mikronutrientů, ale také absorbují významná množství neesenciálních kovů, jako je např. Cd. Mechanismus akumulace Cd není dosud objasněn. Je možné, že příjem tohoto kovu v kořenech je přes systém účastnící se transportu jiného esenciálního dvojmocného mikronutrintu, zřejmě Zn^{2+}. Kadmium je chemický analog zinku a rostliny nejsou schopny rozlišovat mezi těmito dvěma ionty[10].

6. Hyperakumulátory

Hyperakumulátory jsou obvykle definovány jako druhy schopné akumulovat kovy v hladinách 100× vyšších než jsou koncentrace stanovené v běžných neakumulujících rostlinách. Čili hyperakumulátory jsou schopny koncentrovat více než: 10 ppm Hg; 100 ppm Cd a Se; 1000 ppm Co, Cr, Cu, Ni a Pb; 10 000 ppm Mn a Zn. Do současnosti bylo popsáno asi 450 rostlinných druhů z více než 45 rostlinných čeledí schopných hyperakumulovat kovy. Nejvíce hyperakumulátorů biokoncentruje Ni, okolo 30 absorbuje buď Co, Cu, a/nebo Zn, ještě méně druhů akumuluje Mn, Cd a Pb (cit.[10]).

Například rozšíření všech niklových hyperakumulátorů ve světě bylo lokalizováno v jedné ze sedmi oblastí. Je potřeba poznamenat, že hyperakumulátory nebyly nikdy nalezeny v oblastech předchozího zalednění zřejmě proto, že 10 000 let od poslední doby ledové není dostatečně dlouhou dobou pro vývoj vlastností hyperakumulace[11].

Nejznámější hyperakumulátor niklu *Sebertia acuminata* je klasickým příkladem hyperakumulujících rostlin. Je schopen koncentrovat více než 1,8 % Ni (na sušinu) v xylemové tkáni. Jeho modro-zelený latex obsahuje více než 1,12 % niklu (na čerstvou biomasu) a je to zřejmě nejvyšší koncentrace niklu, která byla nalezena v živém organismu. Nikl je zde ve formě nízkomolekulárního, ve vodě rozpustného organického komplexu[11].

Rostliny z rodu *Thlaspi* jsou rozšířeny hlavně ve střední a jižní Evropě a mezi nimi se vyskytuje řada hyperakumulátorů zinku, olova, niklu a kadmia[11].

7. Molekulární mechanismus příjmu toxických kovů

Akumulace přechodných kovů rostlinami předpokládá přítomnost propracovaného molekulárního mechanismu. Ionty kovů jsou mobilizovány pomocí sekrece chelatorů a okyselením rhizosféry. Příjem hydratovaných iontů kovů nebo komplexů kov-chelát je zprostředkován řadou příjmových systémů sídlících v plasmatické membráně. V buňkách jsou kovy chelatovány a přebytečný kov je detoxifikován transportem do vakuoly. Z kořenů jsou přechodné kovy transportovány do nadzemních částí rostlin xylémem. Pravděpodobně největší část kovů se dostane do xylemu přes kořenový symplast. Apoplastický průchod může nastat v kořenové špičce. V xylému se kovy vyskytují jako hydratované ionty nebo komplexy kov-chelát. Po dosažení apoplastu listů jsou kovy různě zachyceny různými typy listových buněk a přesunuty z buňky do buňky přes plasmodesmu. Jsou přednostně ukládány v trichomech. Příjem do listových buněk je opět umožňován různými transportéry. Vnitrobuněčná distribuce esenciálních přechodných kovů je zprostředkována specifickými metalochaperony a transportéry lokalizovanými v endomembránách[12].

Pro zvýšení ochrany proti toxickým těžkým kovům musely rostlinné buňky vyvinout mechanismy, pomocí nichž jsou ionty kovů, které se dostanou do cytosolu buňky, ihned komplexovány a inaktivovány. Sloučeniny, které se účastní komplexace kovů, zahrnují organické kyseliny, volné aminokyseliny, glutathion, fytochelatiny, metalothioneiny, metalochaperony a „heat shock“ proteiny. Metalothioneiny jsou polypeptidy bohaté na cystein, které jsou kódovány skupinou genů. Na druhou stranu fytochelatiny jsou skupinou enzymaticky syntetizovaných peptidů bohatých na cystein[13,14].

Detoxifikace obecně zahrnuje konjugaci následovanou aktivním uložením ve vakuole a apoplastu, kde je polutant nejméně nebezpečný. Rostliny mohou uvolnit sloučeniny ze svých kořenů a tím zvýšit rozpustnost polutantů a jeho příjem rostlinou. Uvnitř rostlinných tkání hrají tyto chelatory roli v toleranci, uložení a transportu anorganických a organických látek. Chelatované kovy mohou být v kořenech uloženy ve vakuole nebo mohou být exportovány do nadzemních částí xylémem. Jak bylo řečeno výše, mohou být organické látky konjugovány a uloženy a nebo enzymaticky degradovány[4].

8. Zvýšení účinnosti fytoremediace

Fytoremediace je v podstatě agronomický postup a její úspěch závisí nakonec na agronomických znalostech aplikovaných na plochu. Díky tomuto faktu jsou hnojení

půdy, zvyšování biodostupnosti pomocí syntetických chelatorů, selekce rostlin, hustota rostlin při výsadbě, střídání plodin a podpora plodin (hubení škůdců a zavlažování) schopny zlepšit účinnost fytoremediací. Velice důležité jsou informace z výzkumu. Výzkum je potřebný pro identifikaci fytoremediujících druhů schopných udržet stálou rychlost extrakce kovu. Mnoho informací je také potřebných pro optimalizaci doby sklizně. Rostliny by měly být sklizeny v době, kdy se snižuje rychlost akumulace kovu rostlinou. To by mohlo minimalizovat dobu každého vegetačního cyklu a umožnit sklízet mnohem více biomasy v jedné sezóně[10].

Transgenní rostliny mohou být novou a moderní cestou, jak zvýšit účinnost fytoremediací. Mnoho genů se účastní příjmu kovů, translokace, ukládání a transferu. To může vést k rozvoji transgenních rostlin v závislosti na strategii, pro kterou budou zkonstruovány. Například pro akumulaci vysokých koncentrací kovů ve skliditelných částech. Transfer nebo overexprese genů povede ke zvýšení příjmu kovů, jejich lepší translokaci, uložení nebo mezibuněčnému zacílení. Genetická úprava syntézy chelatorů kovů v rostlinách zlepší jejich schopnosti přijímat kovy. Pro rozvoj účinných transgenních rostlin pro fytoremediaci musí být do běžných rostlin vneseny geny z hyperakumulátorů nebo jiných zdrojů. Některé z možných oblastí genetické manipulace jsou uvedeny v tab. II. Výzkum se zaměřuje na metalothioneiny, fytochelatiny a chelatory kovů, na transportéry kovů, na enzymatické transformace a na alternativní metabolické dráhy nebo mechanismy oxidativního stresu a na změny v kořenech (zvýšení kořenové plochy a větvení kořenů) nebo na produkci biomasy[13].

8.1. Somatická hybridizace

Somatická hybridizace je jednou z možností jak připravit rostliny s potřebnými vlastnostmi. Gleba a spol.[15] připravili asymetrické somatické buněčné hybridy mezi *B. juncea* (akumulátor olova produkující velké množství biomasy) a *T. caerulescens* (známým jako Zn a Ni hyperakumulátor). Hybrid vykazoval zvýšení rezistence k Pb, Ni a Zn a celkové množství fytoextrahovaného Pb bylo mnohem vyšší díky vysokému množství produkované biomasy. Tento užitečný pokus somatické buněčné hybridizace mezi rostlinami s vysokou produkcí biomasy a hyperakumulátory s nízkou produkcí biomasy proto může pomoci vyvinout hybridy s vysokou produkcí biomasy a hyperakumulační kapacitou[13].

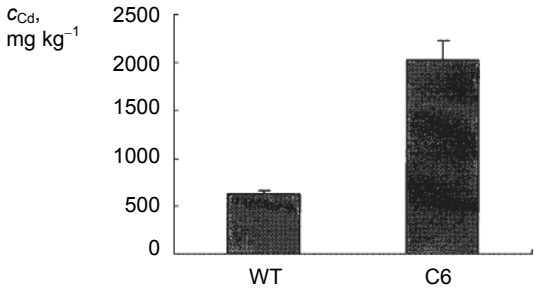
8.2. Genetická manipulace

Remediační kapacita rostlin může být významně zlepšena technologiemi genetické manipulace a transformace rostlin. Identifikace specifických genů z hyperakumulátorů a jejich následný transfer do rychle rostoucích druhů se ukázala být velkým přínosem, jak bude demonstrováno na následujících dvou příkladech[16]. Tabulka II prezentuje přehled overexprimovavých genů použitých v současných pracích zabývajících se zlepšením fytoremediační kapacity rostlin transgenními postupy.

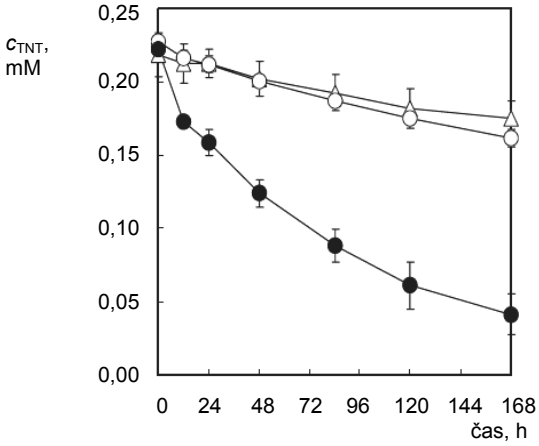
První příklad je z Číny. Li a spol.[16] izoloval cDNA fytochelatin synthasy (*CdPCS1*) z troskutu prstnatého (*Cynodon dactylon* L. cv. Goldensun). Tato travina je vy-

Tabulka II
Produkty overexprese genů v současných transgenních rostlinách[17]

Fytoextrakce	Fytovolatilizace	Fytodegradace
metallothionein	Hg(II) reduktasa	PETN reduktasa
glutathion synthetasa	organomerkurial lyasa	nitro-reduktasa
(γ-Glu-Cys) synthetasa	cystathionin-γ-synthasa	γ-ECS a GS
ATP sulfurylasa	selenocystein methyltransferasa	lidský cytochrom
serin acetyl transferasa		savčí cytochrom
fytochelatin synthasa		krysí mono-oxygenasa
glutathion reduktasa		
cystein synthasa		
selenocystein methyltransferasa		
cystathionin-γ-synthasa		
arsenát reduktasa		
kationtový kanál		
vakuolový transportér		
Zn a Fe transportér		
transportér těžkých kovů		
transportní protein		
ferric reduktasa		



Obr. 1. **Koncentrace Cd v rostlinách tabáku po 3 týdnech kultivace se 100 μmol L^{-1} $CdCl_2$**; WT – divoce rostoucí rostliny, C6 – transgenní linie, převzato z lit.[16]



Obr. 2. **Koncentrace TNT c_{TNT} v závislosti na čase;** deset dnů staré semenáčky rostoucí asepticky byly inkubovány v médiu obsahujícím 0,25 mM TNT po dobu 7 dní. Koncentrace TNT v médiu je zobrazena v závislosti na čase inkubace v přítomnosti divoce rostoucích (WT; □) nebo transgenních (Tr1; □) rostlin a bez přítomnosti rostlin (NP; D), převzato z lit.[18]

soce rezistentní a schopna akumulovat velká množství kadmia. Gen *CdPCS1* z této traviny byl vložen do rostlin tabáku. Hladina fytochelatinu se v některých liniích transgenního tabáku zvýšila 3,88× než v divoce rostoucích rostlinách a obdobně akumulace kadmia v těchto transgenních rostlinách byla zvýšena 3,21× (obr. 1). Výsledky ukazují, že v budoucnosti by *CdPCS1* mohl být využit jako genový prvek pro fytoremediace.

Druhý příklad je z Japonska. Kurumata a spol.[18] transformoval *Arabidopsis thaliana* chimérickým genem nitroreduktasy z *Escherichia coli* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Divoce rostoucí typ rostlin nevykazoval žádný růst v přítomnosti 0,1 mM TNT oproti transgenním rostlinám, které rostly v těchto podmínkách téměř normálně. Když semenáčky plovaly na prámku na roztoku s TNT, pak se příjem TNT díky expresi bakteriální NTR zvýšil 7 až 8×. To ukazuje, že exprese bakteriální NTR zlepšuje schopnost rostlin degradovat TNT (obr. 2).

9. Plánování a aplikace fytoremediace

Při rozvaze, zda je fytoremediace vhodná pro naši kontaminovanou plochu, si musíme položit následující otázky. Podporuje půda a klima růst rostlin? Je růst vybraných rostlin slučitelný s přítomností kontaminantu? Je možné na kontaminované půdě kultivovat rostliny? Není kontaminace hlouběji než 3 metry? Máme k dispozici čas delší než dva roky? Pokud na všechny otázky odpovíme kladně, pak lze použít fytoremediaci.

Následně musíme učinit další úvahy. Potřebujeme znát, co si počneme s rostlinnou biomasou po sklizni. Zda máme dostatečný prostor pro čištění vody (je hydraulická rychlost odstraňování kontaminantů dostatečná?) Jaká je ochrana plodin před zvířaty (ať už z důvodu možné kontaminace potravního řetězce, tak z důvodu zničení rostlin). Jaká je toxicita kontaminantů v rostlinné biomase pro zvířata a pro člověka. Je k dispozici potřebná ochrana před škůdci a kontrolovaný přístup?

A v průběhu fytoremediace je potřeba provádět monitorování probíhajících procesů. Sleduje se růst rostlin, rostlinné tkáně (uložení kontaminantů), rostlinná míza a korelace jejího toku s meteorologickými daty, odpařované plyny z povrchu rostlin (hlavně v případě volatilizace kontaminantů) a spodní voda a půda.

10. Závěr

Další výzkum biochemických procesů xenobiotik by měl být zaměřen na fytotoxická omezení rostlin. Genetické inženýrství dovolí rostlinám tolerovat vysoké koncentrace chemikálií. Tyto nové znalosti budou umožňovat mnohem rozšířenější a efektivnější aplikaci fytoremediace než dosud[3].

Tato práce byla podporována projektem GA ČR 522/06/P002, projektem 1MO6030 a projektem AVOZ 50380511.

LITERATURA

1. Cluis C.: BioTeach Journal *2*, 61 (2004).
2. Freshwater Management Series No. 2: An Introductory Guide To Decision-Makers, http://www.unep.or.jp/Ietc/Publications/Freshwater/FMS2/2.asp, staženo 20.7.2007.
3. Dietz A. C., Schnoor J. L.: Environ. Health Perspect. *109*, 163 (2001).
4. Pilon-Smits E.: Annu. Rev. Plant. Biol. *56*, 15 (2005).
5. Vaněk T., Soudek P., Tykva R., Kališová I.: Hornická Příbram ve vědě a technice http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/Zahlazovani/Z07/P_07.htm, staženo 20.7.2007.

6. U. S. Environmental Protection Agency: EPA/600/R-99/107, http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf, staženo 20.7.2007.
7. Miller R.: Technologies Analysis Center, Series O, Vol. 3 (1996).
8. Rugh C. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *93*, 3182 (1996).
9. Alkorta I., Hernández-Allica J., Becerril J. M., Amezaga I., Albizu I., Garbisu C.: Rew. Environ. Sci. Bio/Tech. *3*, 71 (2004).
10. Lasat M. M.: J. Hazard. Subst. Res. *2*, 5/1 (2000).
11. Baker A. J. M., Brooks R. R.: Biorecovery *1*, 81 (1989).
12. Clemens S., Palmgren M. G., Kramer U.: Trends Plant Sci. *7*, 309 (2002).
13. Eapen S., D'Souza S. F.: Biotechnol. Adv. *23*, 97 (2005).
14. Hall J. L.: J. Exp. Botany *53*, 1 (2002).
15. Gleba D., Borisjuk N. V., Borisjuk L. G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y. Y., Raskin I.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 5973 (1999).
16. Li J., Guo J., Xu W., Ma M.: J. Integr. Plant Biol. *48*, 928 (2006).
17. Cherian S., Oliveira M. M.: Environ. Sci. Technol. *39*, 9377 (2005).
18. Kurumata M., Takahashi M., Sakamoto A., Ramos J. L., Nepovim A., Vanek T., Hirata T., Morikawa H.: Z. Naturforsch. *60c*, 272 (2005).

P. Soudek[a], Š. Petrová[a], D. Benešová[a,b], J. Kotyza[a,b], and T. Vaněk[a] *([a] Laboratory of Plant Biotechnologies, Joint Laboratory of the Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic and Research Institute for Plant Production, Prague, [b] Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague):* **Fytoremediation and Possibilities of Increasing Its Effectivity**

Phytoremediation involves the use of plants for extraction, sequestration and detoxication of pollutants. This method is considered as an ecologically responsible alternative to the environmentally destructive physical remediation methods currently practised. A number of plants have been identified as hyperaccumulators in the phytoextraction of a variety of metals; some of them have been used in field applications. Many plant species are able to degrade organic compounds by their enzymatic apparatus. This paper reviews various phytoremediation methods, their advantages and limitations and potential improvement of the methods by using genetically modified plants.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VLIV DLOUHODOBÉHO UŽÍVÁNÍ PERVITINU NA METABOLISMUS VÁPNÍKU A FOSFORU V KOSTECH

SOŇA JIRSÁKOVÁ, RICHARD PIKNER a VÁCLAV VYSKOČIL

II. interní klinika – Osteocentrum, Fakultní nemocnice Plzeň-Bory, tř. Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
jirsakova.sona@seznam.cz

Došlo 14.12.07, přijato 15.1.08.

Klíčová slova: pervitin, kostní metabolismus, metabolismus vápníku a fosforu

Úvod

Zneužívání drog, abusus, nejčastěji v podobě nadužívání, je stav buď jednorázový, málo častý, či trvalý[1]. Kromě „drog v užším slova smyslu“ se závislost týká i alkoholu, kofeinu, tabáku a některých léků. Drogová závislost je chorobný stav, který se vyznačuje nezvladatelnou touhou po opakovaném užití drogy, často s tendencí zvyšování dávek. Při nedostatku drogy může vzniknout abstinenční syndrom podmíněný existencí psychické či fyzické závislosti. Řada zneužívaných látek se podílí na vzniku nemocí, jako např. kouření na rakovině plic, alkohol na onemocnění jater apod. V těchto případech je příčinná souvislost dobře známa a popsána. I kost patří mezi tkáně, na něž byl prokázán škodlivý vliv alkoholu a nikotinu. Bylo doloženo, že tyto závislosti kostem škodí a mohou být rizikovým faktorem rozvoje osteoporózy, neboli prořídnutí kostí[2–4].

Dosud ale chybí literární údaje o vlivu drog v užším slova smyslu („tvrdých drog“) na kostní tkáň.

Osteoporóza je metabolické onemocnění, při němž ubývá organická i minerální složka kostní hmoty, dochází ke zhoršení architektoniky a ke snížení mechanické odolnosti kostí. Vzniká nepoměrem mezi kostní novotvorbou, za niž jsou odpovědné buňky osteoblasty, které produkují organickou kostní hmotu. Ta mineralizuje převážně ionty vápníku a fosforu a tvoří hydroxyapatit. Na druhé straně je kost odbourávána činností buněk osteoklastů, které pomocí enzymů odbourávají její organickou i anorganickou složku. Kost potom nestačí plnit svou podpůrnou úlohu a při působení již poměrně malého násilí dochází ke zlomeninám[5,6].

Rizikové faktory vzniku osteoporózy se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. [5,6,7] Mezi ovlivnitelné faktory patří příjem vápníku, bílkovin a tuků ve stravě, hladina vitaminu D, pohybová aktivita a zlozvyky – kouření, nadměrné požívání alkoholu, nadměrné pití černé kávy i užívání jiných návykových látek.

Kouření zvyšuje sekreci katecholaminů. Výsledkem je zrychlená kostní resorpce. Nikotin inhibuje i činnost osteoblastů, proto vázne novotvorba kosti. Ženy kuřačky mají dříve přechod (menopauzu). Často se uvádí i vyšší nemocnost kuřáků (např. cévní mozkové příhody, infarkty srdeční, plicní infekce) s následnou imobilitou.

Příjem alkoholu větší než 2 standardní jednotky denně[3] (1 standardní jednotka v České republice odpovídá 10 gramům čistého alkoholu[8]), vede k signifikantnímu zvýšení rizika zlomeniny krčku kosti stehenní nebo dalším osteoporotickým zlomeninám, což prokazuje analýza údajů studií provedených u obou pohlaví[3]. Nadměrné požívání alkoholu působí toxicky přímo na osteoblasty, poruchou jaterních a ledvinných funkcí se snižuje přeměna vitaminu D na jeho aktivní metabolity. Většina alkoholiků má snížený příjem vápníku a bílkovin v potravě, častá nechutenství a zvracení. Alkoholici trpí větším počtem zlomenin pro časté nekoordinované pády ze ztráty rovnováhy[5,6].

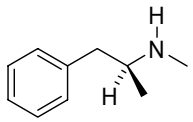
O vlivu ostatních návykových látek na metabolismus vápníku a fosforu v kostech není mnoho známo. V současné době nejsou k dispozici literární údaje o poruchách metabolismu vápníku a vitaminu D u uživatelů návykových látek.

U drogově závislých není metabolismus vápníku a fosforu v kostech pravidelně sledován či vyšetřován. Je však předpoklad, že by tito jedinci mohli mít porušenou vápníkofosfátovou homeostázu.

Uplatňovat se může několik rizikových vlivů: např. nízký příjem vápníku a plnohodnotných bílkovin v potravě, nedostatek vitaminu D, snížená pohybová aktivita, nízká tělesná hmotnost, případně nelze vyloučit i vliv drogy samotné. Podílet se může i negativní vliv častých infekcí, současné nadměrné požívaní alkoholu a kouření s jiným typem návykové látky.

Pervitin je zástupcem skupiny amfetaminových drog, derivátů základní stimulační látky – amfetaminu (obr. 1). Tyto látky stimulují nervový systém, rozptylují únavu a vytvářejí pocit čilosti. Pervitin je po marihuaně zřejmě druhá nejrozšířenější droga v České republice. Závislost na něm představuje v ČR více než polovinu všech léčených závislostí na nealkoholových drogách a smrt z předávkování asi třetinu drogové úmrtnosti.

Pašováním pervitinu se naše republika „proslavila“ v zahraničí a droga začala být označována jako „čeko“. Mylně se soudilo, že je pervitin českým vynálezem. Ve skutečnosti se první syntéza pervitinu uskutečnila v Japonsku roku 1888. Japonci jej používali jako dopink pro sebevražedné piloty, „kamikadze“. Do Evropy se droga dostala v první polovině třicátých let 20. století. Již roku 1941 byl

Metamfetamin	
	
Chemický název	(*S*)-*N*-methyl-1-fenylpropan-2--amin
Registrační číslo CAS	537-46-2
Sumární vzorec	$C_{10}H_{15}N$
Molární hmotnost	149,2 g mol^{-1}

Obr. 1. **Metamfetamin (pervitin)**[9,11]

pervitin podáván před seskokem parašutistům nacistické německé armády.

Pervitin (metamfetamin, „tschecho“, „čeko“, „perník“, „piko“, „péčko“, „peří“, pergo, psaníčko, peříčko, péčko, P, tweak, v méně čisté formě speed) je syntetická droga ve formě bílého prášku, nebo krystalků.

V polovině sedmdesátých let 20. století člen pražského drogového podsvětí přezdívaný „Freud“ objevil způsob výroby ze stimulační látky efedrinu, který lze získat z kompozitních léků, či z dřeviny chvojníku. Po extrakci lze pak efedrin pomocí louhu, červeného fosforu a dalších chemikálií přeměnit na metamfetamin[8−11].

Produkce efedrinu, pro farmaceutické účely, dlouho závisela jen na úrodě chvojníků. Byla ale potřeba se pojistit proti neúrodě, a proto se začala prosazovat chemická syntéza, která probíhá ve dvou stupních. Na prvním stupni se podílí speciální kvasinkový kmen, poté následuje katalyzovaná chemická reakce.

Kondenzací benzaldehydu s acetaldehydem v přítomnosti kvasinek vzniká opticky aktivní 1-fenyl-1-hydroxypropan-2-on. Reakci katalyzuje enzym pyruvátdekarboxylasa pocházející např. z kvasinek *Saccharomyces coreanus*, *Candida* a *Hansenula*.

Kvasinky se touto reakcí brání jedovatému účinku benzaldehydu a vytvářejí produkt, který se dá chemicky přeměnit na (1*R*,2*S*)-1-fenyl-2-(methylamino)propan-1-ol, zvaný též (−)-efedrin (cit.[10]).

Velmi účinná je pravotočivá forma pervitinu ((+)-methamfetamin-hydrochlorid, (*S*)-metamfetaminium-chlorid), který vypadá jako tříštivé lesklé krystalky, proto se nazývá ice (led). Pervitin (získaný redukcí efedrinu jodovodíkem za přítomnosti fosforu) je také prakticky čistě pravotočivým isomerem (s příměsemi vedlejších produktů reakce, např. jodefedrinu a jodbenzenu). Pseudoefedrin je levotočivá forma, která je méně účinná.

Pervitinu je chemicky příbuzná extáze (3,4-(methylendioxy)methamfetamin, madam, E, X, Adam, XTC, droga lásky)[8,9,11].

Dávka pervitinu 100 mg i více může být užívána:

- inhalací (při zahřívání vydává výpary, které se vdechují),
- šňupáním (krystaly se rozmělní na jemný prach, který se šňupe podobně jako šňupací tabák),
- injekční aplikací (krystaly se rozpustí ve vodě a roztok se vpichuje do žíly).

Působí obvykle 3 až 12 hodin.

Mezi účinky patří pocit zvýšené fyzické i psychické výkonnosti, euforie, hovornost, potlačení pocitu únavy a chuti k jídlu, zvýšená bdělost, při vyšších dávkách potřeba překotné činnosti, neklid a nespavost, zrychlené psychomotorické tempo, zostřené vnímání tónů a barev, úzkost, náladovost a hádavost. Viditelné příznaky užívání zahrnují rozšířené zornice, zrychlený tep, třes, pocení, bledost a hubnutí. Předávkování se projevuje těžkou bolestí hrudníku a jedno- až dvouhodinovým bezvědomím. Po odeznění účinků nastává „dojezd“: skleslost, deprese, strach, únava, ospalost a vyčerpání.

Po delším užívání může být poškozeno srdce, játra (více při požívání nečisté drogy), zubní sklovina a oslabuje se imunitní systém. V chronické fázi klesá inteligence, převažuje apatie a bezradnost, vyšší je i nebezpečí sebevraždy. Droga nemá sice tělesné abstinenční příznaky, vyvolává však silnou psychickou závislost. Toxický syndrom je charakterizován hlubokými změnami v chování, vizuálními, sluchovými a hmatovými halucinacemi s pocity paniky, agrese, pocitu ohrožení.

Ke smrti dochází nejčastěji z důvodů postižení srdce, selhání krevního oběhu, otoku plic, jaterního poškození a selhání ledvin. Jedovatost drogy zvyšují příměsi látek, které se používají při výrobě a bývají přítomné i v konečném produktu (nejčastěji jód, aceton, fosfor a kyselina fosforečná)[9,11].

Experimentální část

C í l

Naším cílem bylo zjistit, zda závislost na pervitinu ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu v kostech. U deseti pacientů, po minimálně čtyřletém abusu pervitinu, jsme proto zjistili anamnézu, provedli jsme laboratorní vyšetření (se zaměřením na vyšetření vápníkového a fosfátového metabolismu) a denzitometrické vyšetření skeletu.

M e t o d i k a

Sledovanou skupinou bylo deset pacientů (3 ženy, 7 mužů) po dlouhodobém abusu pervitinu. Doba pravidelného abusu byla 4−13 let, průměrně 8,8 roku. Muži byli ve věku 21−32 let, ženy 19−27 let a měly pravidelný menstruační cyklus. Všichni sledovaní přestali užívat pervitin před 3−5 měsíci. Mezi vyšetřenými byl 1 kuřák (20−25 cigaret den^{-1}).

Zjistili jsme anamnézu, provedli jsme laboratorní

vyšetření se zaměřením na vyšetření metabolismu vápníku a fosforu a vyšetření kostní hustoty (osteodenzitometrické vyšetření).

V anamnéze jsme se zaměřili na sledování rizikových faktorů osteoporózy. Sledovali jsme především jinou příčinu poruchy metabolismu vápníku a fosforu v kostech, rizikové faktory osteoporózy, výskyt zlomenin, potíže při užívání pervitinu, infekční onemocnění.

Dále byla pacientům odebrána krev a vyšetřena ranní a střádaná moč za 24 hodin.

K vyloučení ostatních možných (sekundárních) příčin poruch metabolismu vápníku a fosforu v kostech byly vyšetřeny tyto parametry: krevní obraz, albumin, celková bílkovina, cholesterol, triacylglyceridy, koncentrace kreatininu v séru a v moči, sérová hladina alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy a gamaglutamyltransferasy, koncentrace celkové alkalické fosfatasy i jejího kostního isoenzymu, intaktní sérový parathormon, sérová koncentrace celkového vápníku, fosforu a hořčíku, 25-hydroxycholekalciferol, 1,25-dihydroxycholekalciferol v séru, koncentrace vápníku a fosforu v ranní a střádané moči za 24 hodin, osteokalcin (jako ukazatel celkového kostního metabolismu), *C*-terminální telopeptid kolagenu typu I (ukazatel kostní resorpce), *N*-terminální propeptid kolagenu typu I (ukazatel kostní formace). Kostní minerální hustota (bone mineral denzity, BMD) byla hodnocena přístrojem Hologic Delphi (metodou dual energy X-ray absorptiometry). Denzitometrie je radiologické neinvazivní vyšetření. RTG lampa emituje dva paprsky rentgenového záření. Intenzita úbytku tohoto záření je úměrná hustotě tkáně, kterou prochází, především kostí. Druhý paprsek slouží k eliminaci vlivu měkkých tkání. Přístroj hodnotí kostní minerálovou hustotu planimetricky (v g cm^{-2}).

Kostní denzita byla vyšetřena u každého pacienta ve třech oblastech – v bederní páteři a pravém i levém kyčli. K hodnocení kostní hustoty byla využita referenční rozmezí NHANNES III (epidemiologická studie osteoporózy a nízké kostní hmoty ve Spojených státech z r. 1997, cit.[12]) a hodnoty byly vztaženy k tzv. Z-skóre. (Z-skóre je počet směrodatných odchylek (SD – standard deviation) nad nebo pod střední hodnotu BMD pro jedince stejného věku a pohlaví, jako je vyšetřovaný jedinec).

Hodnocení:

Z-skóre vyšší než −1,0 SD je normální kostní hustota,

Z-skóre −1,0 až −2,5 SD – snížená kostní hustota,

Z-skóre menší než −2,5 SD – výrazně snížená kostní hustota.

Vzhledem k nízkému počtu pacientů nebylo provedeno statistické hodnocení jak deskriptivní statistiky, tak korelací mezi sledovanými parametry.

Výsledky a diskuse

Všichni pacienti měli negativní osobní anamnézu sekundárních poruch kostního metabolismu. Čtyři z vyšetřených prodělali v minulosti hepatitidu B a/nebo C. V anamnéze si 8 z 10 vyšetřených pacientů stěžovalo na bolesti dlouhých kostí a potíže se zuby, odlamující se sklovinu, měli výrazné atypické zubní abraze. Pět z vyšetřovaných udávalo kostní bolesti, které se objevily nejčastěji po dvouměsíčním abusu a přetrvávaly až 7 týdnů po užití pervitinu.

Uváděné potíže typu bolestí dlouhých kostí a bolesti zubů mohou být typické pro aktuální poruchu metabolismu vápníku a fosforu. V době vyšetření již tyto potíže neuváděl žádný z vyšetřených.

Řada pacientů uvedla potíže spojené s užíváním pervitinu jako intoxikace, toxická psychóza, halucinace, deprese, padání vlasů, bolesti zubů, bolesti hlavy, průjmy, zácpa, zástava dechu. Nikdo z vyšetřených neprodělal v minulosti zlomeninu.

Laboratorní nutriční parametry byly v pásmu referenčních rozmezí. Nízký BMI (body mass index, parametr pro posouzení stavu výživy) – muži 20,23 kg m^{-2}, ženy 18,42 kg m^{-2} (pět pacientů mělo BMI pod hranicí normy). Tento fakt je způsoben dlouhodobě sníženým energetickým příjmem v minulosti, naopak normální hodnoty nutričních parametrů v séru vypovídají o dostatečné výživě v posledních týdnech před odběrem krve.

U všech deseti pacientů byla hladina 25-hydroxycholekalciferolu i 1,25-dihydroxycholekalciferolu v séru v pásmu dolní čtvrtiny referenčního rozmezí, což vypovídá o mírném deficitu vitaminu D (tab. I).

Osm pacientů mělo vyšší hladinu kostního isoenzymu alkalické fosfatasy, která vypovídá o zvýšení aktivity kostní novotvorby (tab. II).

Ostatní laboratorní parametry byly v pásmu normy. Sekundární příčina poruchy metabolismu vápníku a fosforu nebyla u vyšetřených pacientů prokázána.

Vyšetření kostní hustoty ukázalo sníženou kostní minerálovou hustotu u devíti z deseti pacientů. Při denzitometrickém vyšetření měl pouze jeden pacient kostní husto-

Tabulka I
Sérové koncentrace 25-hydroxykalciferolu a 1,25-dihydroxycholekalciferolu

Pacient	25-hydroxykalciferol [mmol l^{-1}] [a]	1,25-dihydroxycholekalciferol [pg mol^{-1}] [b]
1	18,3	22,7
2	23,5	23,2
3	24,8	20,3
4	25,8	23,6
5	25,3	22,5
6	25,5	20,8
7	17,9	21,2
8	24,2	24,2
9	19,9	23,1
10	19,8	23,3

[a] Norma: 15,8–116 mmol l^{-1}, [b] norma: 20–46 pg mol^{-1}

Tabulka II
Koncentrace kostního isoenzymu alkalické fosfatasy (b-ALP)

Pacient	1	2	3	4	5 N	6	7	8 N	9	10
b-ALP	0,40	0,43	0,54	0,45	0,27	0,34	0,40	0,31	0,44	0,39

Pozn.: fyziologické rozmezí – do 0,33 μkat l^{-1}, N – pacienti s koncentrací b-ALP v normě

Tabulka III
Výsledky denzitometrického vyšetření, hodnoceno dle Z-skóre[a]

Pacient		Bederní páteř	Pravý kyčel	Levý kyčel
1	V	–2,5	–1,2	–1,1
2	s	–1,2	–1,0	–0,7
3	V	–3,0	–2,3	–2,0
4	V	–2,6	–1,0	–1,6
5	**N**	–0,8	+0,2	+0,5
6	s	–2,3	–1,7	–1,5
7	s	–1,6	–1,1	–1,1
8	s	–1,4	–1,0	–1,3
9	s	–1,7	–1,0	–1,4
10	V	–2,5	+0,9	+1,0

[a] Z-skóre je počet směrodatných odchylek nad nebo pod střední hodnotu BMD pro jedince stejného věku a pohlaví jako vyšetřovaný jedinec; N – normální kostní hustota, s – snížená kostní hustota, V – výrazně snížená kostní hustota

tu v pásmu normy, pět z deseti vyšetřených pacientů mělo kostní hustotu v pásmu snížené kostní hustoty, čtyři v pásmu velmi snížené kostní hustoty (tab. III).

U vyšetřených pacientů jsme prokázali, že devět z deseti mělo snížený obsah kostního minerálu neodpovídající věku. Čtyři jedinci měli sníženou kostní hustotu o více než 2,5 směrodatné odchylky oproti zdravé populaci odpovídajícího věku a pohlaví.

Doložili jsme, že pacienti s nadměrným užíváním pervitinu v minulosti mají sníženou kostní hustotu oproti zdravým jedincům. Dosáhli nízké vrcholové kostní hmoty (peak bone mass), což je nejvyšší hodnota kostní hmoty v životě, dosažená kolem 25. roku. Později se již nárůst kostní hmoty zastaví a až do menopauzy (či do 55.–60. roku života mužů) se kostní hmota udržuje na stabilní úrovni. Poté se kost začne resorbovat rychleji. V porovnání se zdravými jedinci je vrcholová kostní hmota u vyšetřených pacientů nižší, lze tedy předpokládat, že pásma snížené, příp. velmi snížené kostní hustoty dosáhnou dříve. Pokud by nedošlo ke zlepšení kostní minerálové hustoty, může nízká vrcholová kostní hmota v období menopauzy či andropauzy představovat závažný rizikový faktor vzniku osteoporózy a jejích komplikací, tj. zlomenin. Osm pacientů mělo vyšší úroveň kostní novotvorby. Všichni pacienti měli mírný deficit vitaminu D.

Závěr

Deset vyšetřených pacientů se závislostí na pervitinu v minulosti neslo rizikové faktory rozvoje osteoporózy. U žádného pacienta jsme neprokázali významnou poruchu metabolismu vápníku a fosforu. Pacienti neprodělali žádnou patologickou zlomeninu.

Sledování metabolismu vápníku a fosforu včetně vyšetření denzitometrie u všech abstinujících narkomanů pravděpodobně nemá opodstatnění. Lze totiž očekávat rychlou úpravu nutričních parametrů při abstinenci, bude-li doplněna strava o vápník a vitamin D.

Aby bylo možné předložit statisticky kvantifikovatelné výsledky, je potřeba ověření těchto dat na větším souboru pacientů, včetně dlouhodobého sledování změn parametrů. Vzhledem k ostatním rizikovým faktorům vzniku osteoporózy (vyjmenovaným výše), prokázaným u vyšetřovaných, nelze užívání pervitinu pokládat za výlučný důvod poklesu kostní minerálové hustoty.

Přesto je zřejmé, že kromě rizik, která jsou obecně známá, má pervitin i dosud nepopsané negativní účinky, které již tak vysokou nebezpečnost pervitinu zvyšují.

LITERATURA

1. Fišar Z.: Chem. Listy *100*, 233 (2006).
2. Kanis J., Johannson H., Johnell O.: Osteoporosis Int. *16*, 737 (2005).
3. Rizzoli R.: *Atlas of Postmenopausal Osteoporosis*. Current medicine group Ltd, London 2005.
4. Kanis J., Johnell O., Oden A.: Osteoporosis Int. *16*, 155 (2005).
5. Kocián J.: *Osteoporóza a osteomalacie.* Triton, Praha 1997.
6. Kocián J.: Lékařské listy *12*, 1 (1999).
7. Broulík P.: *Osteoporóza, osteomalacie, osteodystrofie.* Maxdorf Jesenius, Praha 1999.
8. cs.wikipedia.org/wiki/Metamfetamin, staženo 11.9.2007.
9. www.drogy-info.cz/index.php/info/ilegalni_drogy/stimulancia/pervitin_metamfetamin, staženo 10.11.2007.

10. www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=5978, staženo 11.11.2007.
11. web.quick.cz/daemon.cz/drogy.htm, staženo 10.11.2007.
12. Looker A., Orwoll E., Johnston C., Lindsay R., Wahner H., Dunn W, Calvo M, Harris T, Heyse S.: J. Bone Miner Res. *12*,1761 (1997).
13. Richy F., Ethgen O., Bruyere J.: Osteopororsis Int. *15*, 301 (2004).
14. Rizzoli R., Bonjour J., Ferrari S.: J. Mol. Endocrinol. *26*, 79 (2001).

S. Jirsáková, R. Pikner, V. Vyskočil *(Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic):*
The Effect of Long-Term Pervitine Abuse on Calcium and Phosphorus Metabolism

Ten patients previously taking pervitine (for 8.8 years on average) showed a decrease in the body mass index, 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol concentrations and an increase in bone alkaline phosphatase; the other examined parameters remained unchanged. The bone mineral density showed low and very low values in five and four patients, respectively, related to the Z-score according to NHANNES III tables in a U.S. reference study.

There are several reasons, other than the pervitine intake, why the patients could have low bone mineral density and calcium-phosphorus metabolism disorders: low calcium and vitamin D intake, lack of body exercise, nicotine and alcohol abuse.

TRIBOTECHNICKÁ DIAGNOSTIKA V PREVÁDZKE POUŽITÝCH OLEJOV I. METÓDY HODNOTENIA ČASTÍC OPOTREBOVANIA V OLEJOCH

JANKA MIHALČOVÁ and HEKMAT AL HAKIM

Fakulta výrobných technológií Technickej Univerzity v Košiciach so sídlom v Prešove,
Štúrova 31, 080 01 Prešov
mihalcova.janka@fvt.sk, alhakim.hekmat@fvt.sk

Došlo 20.7.07, prijaté 27.11.07.

Kľúčová slová: tribotechnická diagnostika, použitý olej, RD OES, distribúcia častíc, ferografia

Úvod

S narastajúcimi finančnými potrebami na údržbu strojov, strojných zariadení, na nákup mazív a v hlavnej miere na zabezpečenie spoľahlivosti a zvýšenia bezpečnosti prevádzky, rastie potreba zabezpečenia systému preventívnej údržby[1]. Tribotechnická diagnostika ako súčasť preventívnej údržby, je použiteľná pre akýkoľvek uzavretý mazací systém, ktorý sa nachádza napr. v plynových turbínach, dieselových i benzínových motoroch, prevodovkách, kompresoroch a hydraulických systémoch[2].

Činnosťou trecích dvojíc mazacieho systému sa opotrebovaním uvoľňujú častice kovov a ich zliatin. Oterové častice sa z trecích miest vyplavujú s mazacím olejom a spolu s ním cirkulujú v mazacom systéme. S rastúcim opotrebovaním sa zvyšuje množstvo týchto častíc nielen čo do počtu, ale aj veľkosti a tvaru. Mazacie oleje sa využívajú na ochranu proti opotrebovaniu kovových povrchov mechanických systémov[3]. Pravidelným sledovaním vlastností týchto olejov sa v tribotechnickom laboratóriu zisťuje skutočný stav motora a tým sa predchádza jeho poruchám. Pre zabezpečenie údržby motora sa sleduje koncentrácia prvkov nachádzajúcich sa v použitých olejoch. Využíva sa na to metóda optickej emisnej spektrometrie s využitím rotujúcej diskovej elektródy (RD OES). Obsah mechanických nečistôt sa zisťuje pomocou optickej metódy na distribúciu a zatriedenie častíc podľa veľkosti a počtu. Morfológia a veľkosť častíc vznikajúcich opotrebovaním trecích povrchov sa analyzuje mikroskopicky ferografickou analýzou.

Experimentálna časť

Metóda RD OES

Príprava vzorky

Vzorka sa pred analýzou homogenizuje pretrepávaním. Pomocou Pasteurovej pipety sa odpipetuje do vzorkovacej nádobky o presnom objeme a vloží sa do meracej komôrky.

Postup analýzy

Metódou RD OES sa na prístroji SPECTROIL M simultánne stanovuje koncentrácia chemických prvkov podľa normy ASTM D 6595-00 (Americká spoločnosť pre skúšobníctvo a materiály). Na meranie sa používajú grafitové elektródy, tyčová a disková. Elektródy sa spolu so vzorkou nachádzajú v meracej komôrke. Rotačná disková elektróda rotujúca konštantnou rýchlosťou vynáša na svojom povrchu olej zo vzorkovacej nádobky do medzielektródového priestoru, v ktorom sa kovové častice oleja vyparia, atomizujú a vzbudia v dôsledku pôsobenia iskrového výboja. Optický signál prislúchajúci jednotlivým prvkom je spektrometrom spracovaný a vyhodnocovaný[4].

Na kalibráciu metódy RD OES sa používajú organokovové viacprvkové štandardy CONOSTAN S-21 s koncentráciou 10 ppm, 30 ppm a 50 ppm. Na overenie správnosti metódy a zabezpečenie nadväznosti merania sa používa certifikovaný referenčný materiál NIST SRM 1084a (Národný inštitút noriem a technológií USA).

Metóda distribúcie častíc

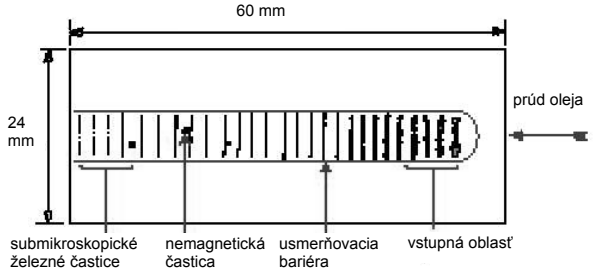
Príprava vzorky

Na analýzu tmavých a viskóznych olejov sa na riedenie vzoriek zvyčajne používa technický benzín. Vzorka sa pred analýzou homogenizuje pretrepávaním. Oleje s vyššou viskozitou sa zahrievajú na teplotu cca 50 °C.

Postup analýzy

Na optickom počítači častíc MET ONE sa metódou distribúcie častíc podľa veľkosti a počtu zisťuje čistota oleja. Je to modifikovaná štandardná metóda, ktorá je odvodená od STN 656081 „Mikroskopické stanovenie veľkosti a počtu častíc nečistôt“ a technickej dokumentácie výrobcu zariadenia.

Optický počítač častíc MET ONE pracuje na princípe zatienenia mechanických častíc laserovým lúčom. Skladá sa z dávkovača vzorky, laserovej sondy a počítača častíc. Dávkovač odmeria presné množstvo vzorky, a tlakom vzduchu ju pretlačí cez meraciu komôrku. Laserový lúč dopadajúci na fotocitlivú podložku je zatienený prechádzajúcimi časticami, čím sa zmenou intenzity osvetlenia získa informácia o veľkosti a počte častíc. Počítač častice spočíta a zatriedi ich do veľkostných tried podľa normy ISO 4406. Výsledkom merania čistoty oleja je stanovenie počtu častíc v špecifikovaných veľkostných triedach v 1 ml vzorky. Podľa ISO 4406 sú to tri kódy čistoty, pre veľkosť častíc >2 μm, >5 μm a >15 μm (cit.[5]).



Obr. 1. **Ukážka ferografickej stopy (ferogramu)**

Nadväznosť metódy sa zabezpečuje pomocou certifikovaného referenčného materiálu, ktorým je suspenzia prachu v hydraulickom oleji s označením NIST SRM MTD 2806. Pre zabezpečenie správnosti merania veľkosti častíc sa kalibruje snímač prístroja pomocou overeného osciloskopu meraním latexových guličiek o presnej veľkosti.

F e r o g r a f i c k á a n a l ý z a

Príprava vzorky

Na prípravu ferogramov z olejových vzoriek sa používa technický benzín BT 80/110 (destilačná frakcia). Vzorka sa zahreje na teplotu cca 50 °C a riedi sa s technickým benzínom v pomere 4 : 1.

Postup analýzy

Ferografická analýza produktov opotrebovania začína magnetickou separáciou častíc z olejovej vzorky na ferografe REO 1. Vzorka oleja steká po podložke z priehľadnej plastickej hmoty umiestnenej v magnetickom poli s veľkým gradientom intenzity magnetického poľa. Premenlivá intenzita magnetického poľa spôsobuje usadzovanie častíc nachádzajúcich sa v analyzovanej kvapaline v miestach daných ich veľkosťou a magnetickými vlastnosťami. Výsledkom je ferogram (obr. 1), na ktorom sa bichromatickým mikroskopom ZEISS Axiolab pozoruje morfológia a veľkosť zachytených magnetický a nemagnetických častíc.

Výsledky a diskusia

Metódou RD OES sa stanovuje koncentrácia chemických prvkov, ktoré vznikajú z opotrebovania stroja (Fe, Cr, Al, Cu, Pb, Sn, Ni, Mn, Ti, Ag a Mo), prenikajú z vonkajšieho prostredia (Si, Na, B a V), alebo sa nachádzajú v aditívach (Zn, P, Ca, Ba, Mg, Na a B). Koncentrácia a kvalita prvkov nachádzajúcich sa v mazive počas jeho pôsobenia v mazacom systéme je dôležitou informáciou pre hodnotenie mieri opotrebovania stroja. Slúži aj k identifikácii úbytku aditív a prieniku kontaminantov.

Metódou RD OES sa v tribotechnickom laboratóriu stanovuje koncentrácia Fe, Al, Cr, Cu, Mg, Ni, Si, Ti, Pb, Sn, Ag a Mo v rozsahu od 1 do 5 μg g^{-1} s rozšírenou neistotou U = 52 %, v rozsahu od 5 do 10 μg g^{-1} s U = 32 % a v rozsahu od 10 do 100 μg g^{-1} s U = 22 %, pre koeficient rozšírenia k = 2.

Na overenie správnosti merania bola stanovená koncentrácia prvkov v certifikovanom referenčnom materiále NIST SRM 1084a. Aby bola overená správnosť aj pri nižších koncentráciách, bol nariedením NIST SRM 1084a so štandardom Conostan Base Oil pripravený štandard s koncentráciou prvkov cca 10 μg g^{-1}. V tab. I je

Tabuľka I
Výťažnosť stanovenia [%] koncentrácie prvkov v NIST SRM 1084a s koncentráciou prvkov cca 100 μg g^{-1} a v štandarde pripravenom nariedením z NIST SRM 1084a a základového oleja Conostan Base oil (n = 3)

Prvok	Certifikovaná hodnota	Nameraná hodnota	Výťažnosť [%]
Fe	[a]98,9 ± 1,4	100,1	101
	[b]9,9	10,4	105
Al	[a,c]104	102,5	99
	[b,c]10,4	9,5	91
Cr	[a]98,3 ± 0,8	99,2	101
	[b]9,8	9,6	98
Cu	[a]100 ± 1,9	99,2	99
	[b]10,0	10,5	105
Mg	[a]99,5 ± 1,7	97,9	98
	[b]9,9	10,0	101
Ni	[a]99,7 ± 1,6	100	100
	[b]10,0	9,9	99
Si	[a,c]103	102	99
	[b,c]10,3	10,2	99
Ti	[a]100,4 ± 3,8	102,3	102
	[b]10,0	9,6	96
Pb	[a]101,1 ± 1,3	100,6	100
	[b]10,1	10,5	104
Sn	[a]97,2 ± 2,6	100,3	103
	[b]9,7	9,6	98
Ag	[a]101,4 ± 1,5	101,3	100
	[b]10,1	10,4	103
Mo	[a]100,3 ± 1,4	101,3	101
	[b]10,0	10,7	107

[a] NIST SRM 1084a; [b] NIST SRM 1084a – pripravený riedením; [c] – informatívny údaj

Tabuľka II
Výťažnosť stanovenia [%] počtu častíc v 1 ml vzorky pre uvedené veľkosti častíc [μm] v certifikovanom referenčnom materiáli NIST SRM MTD 2806

Veľkosť častíc [μm]	Certifikovaný počet častíc	Nameraný počet častíc	Výťažnosť [%]
>2	4680,20	4386,40	94
>5	2066,20	2103,33	102
>15	188,80	197,73	105

z nameraných výsledkov koncentrácie prvkov a ich certifikovaných hodnôt vypočítaná výťažnosť stanovenia každého prvku. Výťažnosť percentuálne vyjadruje podiel nameranej a certifikovanej hodnoty.

Počítanie mechanických častíc opotrebovania v pracovných kvapalinách a ich triedenie do veľkostných tried je taktiež efektívnou diagnostickou metódou. Pomocou zistenia množstva nečistôt nachádzajúcich sa v obehových mazacích systémoch a aplikovaním potrebných opatrení možno zabezpečiť spoľahlivosť a dlhú životnosť trecích komponentov.

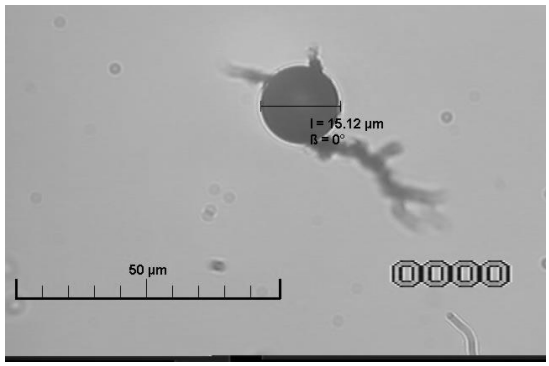
Pre metódu na zistenie čistoty oleja sa vypočítala rozšírená neistota U pre $k = 2$ v závislosti od počtu častíc v 1 ml. Pre počet častíc v rozsahu od 100 do 1000 ks ml^{-1} je $U = 27$ % a v rozsahu od 1000 do 20 000 ks ml^{-1} je $U = 21$ %. Správnosť merania počtu častíc bola overená meraním certifikovaného materiálu NIST SRM MTD 2806. V tab. II je uvedená výťažnosť stanovenia počtu častíc v jednotlivých veľkostných triedach.

Ferografia je technika aplikovaná na analyzovanie častíc opotrebovania v mazacom oleji. Separuje častice nachádzajúce sa v mazive pôsobením silného magnetického poľa s gradientom a popisuje zachytené častice opotrebovania. Pre definovanie režimu opotrebovania sa posudzujú nasledovné charakteristiky izolovaných produktov:

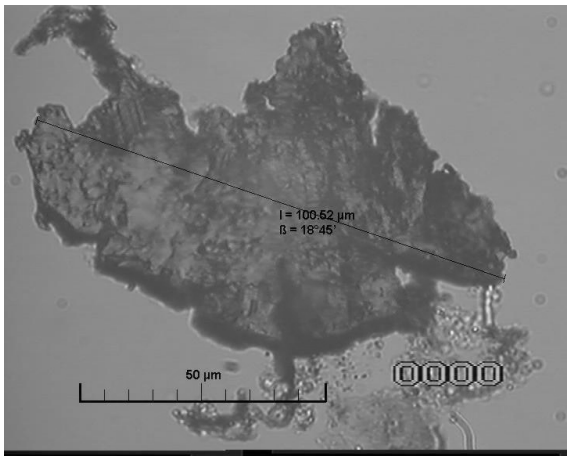
a) pozícia častice na vytvorenom ferograme,
b) orientácia hlavného rozmeru častice,
c) tvar častice,
d) charakteristika povrchu častice – farba, ryhovanie, jamkovatosť (pitting) a pod.

Výsledkom ferografickej analýzy je určenie druhu a intenzity opotrebovania podľa identifikovaných charakteristík izolovaných častíc. Ferografické hodnotenie stavu maziva je v tribotechnickom laboratóriu charakterizované troma stupňami opotrebovania:

– Normálny stav ─ začínajú sa vytvárať častice malých rozmerov a v malom množstve s veľkosťou 5 až 10 μm a vytvárajú retiazky drobných častíc.
– Medzný stav ─ častice väčších rozmerov vo väčšom množstve a rôznej morfológie, veľkosti do 30 μm a malého množstvo sférických častíc veľkosti 5 až 15 μm (obr. 2).



Obr. 2. **Ukážka sférickej častice, ktorá signalizuje poruchu ložiska**



Obr. 3. **Ukážka nemagnetickej šmykovej častice, ktorá vznikla pri nadmernom zaťažení**

– Kritický stav – vysoká koncentrácia častíc abnormálneho opotrebovania veľkosti (30–150 μm), napr. šmykové častice s výrazným ryhovaním na povrchu (obr. 3), abrazívne častice vo forme tenkých drôtikov a špirál veľkosti nad 100 μm.

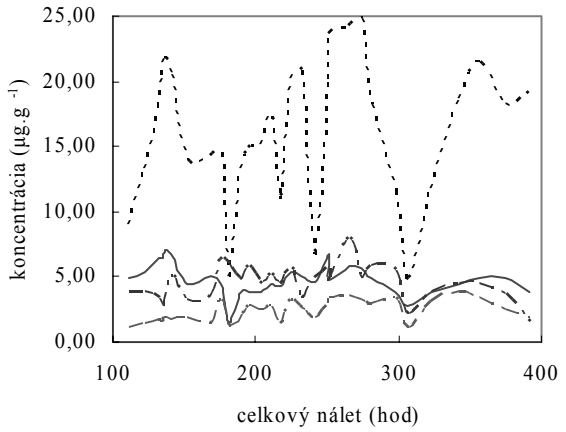
Ferografia je veľmi vhodná metóda na skoré odhalenie vznikajúcej poruchy stroja, prípadne na jej popretie. Je možné ňou identifikovať a popísať častice, ktoré nie je možné stanoviť spektrometricky. Využíva sa na identifikáciu a popis častíc veľkosti väčšinou od 5 do 150 μm.

Príklad tribotechnickej diagnostiky v praxi

Popísané metódy tribotechnickej diagnostiky sa využívajú na diagnostiku leteckej techniky. Na nasledovnom príklade je možné vysvetliť využitie uvedených metód v praxi. Od začiatku prevádzky leteckého motora bola zaznamenaná zvýšená koncentrácia Fe a Ti. Koncentrácie ostatných diagnosticky významných prvkov nepresahovali

Tabuľka III
Referenčné hodnoty [μg g^{-1}] koncentrácií diagnosticky významných prvkov pre sledovaný typ leteckého motora

Prvok	Referenčná hodnota koncentrácie
Fe	12
Cu	9
Sn	10
Al	4
Ti	4

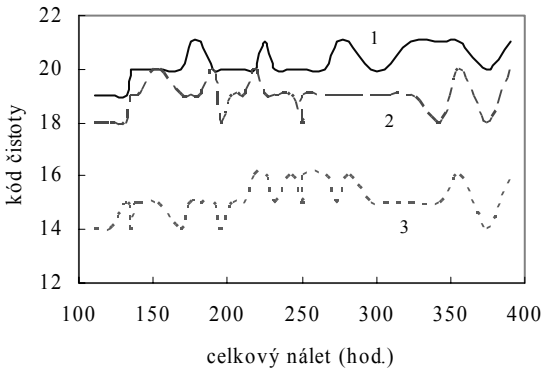


Obr. 4. **Koncentrácia diagnosticky významných prvkov (- - - Fe, ── Cu, – - – Sn, —– —– Al) nameraná vo vzorkách odobratých z olejového systému leteckého motora v závislosti od celkového náletu**

referenčné hodnoty, ktoré sú uvedené v tab. III. Na obr. 4 je znázornená časová závislosť koncentrácie prvkov na odpracovaných hodinách (celkový nálet).

Počas prevádzky motora výsledky analýzy na optickom počítači signalizovali mierne znečistenie kvapaliny mechanickými nečistotami. Namerané koncentrácie mechanických nečistôt sú typické pre daný typ motora. Z hľadiska pravdepodobnosti výskytu nadmerného abrazívneho opotrebovania a teda i pravdepodobnosti poruchy, sa ako bezpečné triedy čistoty uvádzajú (dvojčíselný kód pre častice veľkosti 5 a 15 μm – staré kódovanie) kódy 15/12, pre triedy čistoty väčšie ako 19/14 je definovaná nebezpečná zóna. Na obr. 5 je znázornená časová závislosť hodnôt kódov čistoty definujúcich tri veľkostné triedy prvkov na odpracovaných hodinách počas prevádzky motora.

Výsledky ferografických analýz vzoriek počas prevádzky motora nesignalizovali ani v jednom prípade nepriaznivý režim opotrebovania kinematických dvojíc obmývaných mazacou kvapalinou. Analýzou boli identifikované retiazky drobných magnetických adhezívnych častíc (veľkosť častíc v retiazkach od 5 do 10 μm), nemagnetické



Obr. 5. **Koncentrácia mechanických nečistôt (definovaná kódmi čistoty pre veľkosť častíc:(1) 2 μm, (2) 5 μm, (3) 15 μm), nameraná vo vzorkách odobratých z olejového systému motora**

častice veľkosti do 30 μm, sférické častice veľkosti priemeru do 5 μm a polyméry so zachytenými drobnými časticami. Na celej ferografickej stope bol zaznamenaný zvýšený výskyt častíc veľkosti 5 až 10 μm. Po okrajoch stopy boli zachytené vlákna a nečistoty. Častice identifikované na ferogramoch charakterizujú normálne opotrebovanie trecích dvojíc a sú obvyklé pre motory daného typu.

Prevádzku sledovaného motora možno z tribotechnického hľadiska hodnotiť ako bezproblémovú. Kinematické dvojice obmývané mazacou kvapalinou nevykazovali počas sledovaného obdobia známky zvýšeného alebo nenormálneho opotrebovania.

Záver

Metódy tribotechnickej diagnostiky pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie častíc nachádzajúcich sa v mazive počas prevádzky stroja, poskytujú veľa dôležitých informácií o stave trecích častí stroja, čím umožňujú identifikovať vznikajúcu poruchu, prípadne ju aj lokalizovať. Metóda RD OES sa využíva na stanovenie koncentrácie chemických prvkov nachádzajúcich sa v oleji. Optickou metódou počítania častíc sa zisťuje čistota kvapalín. Ferografická analýza dáva informáciu o morfológii a tvare magnetických a nemagnetických častíc zachytených na ferografickej stope. Každá z metód poskytuje len čiastočnú informáciu o časticiach vznikajúcich opotrebovaním stroja, alebo prienikom z vonkajšieho prostredia. Využitím všetkých troch metód súčasne sa získa dostatočné množstvo informácií potrebných pre tribotechnickú diagnostiku motora.

Príspevok vznikol za podpory grantovej agentúry VEGA MŠ SR č. 1/4155/07.

LITERATÚRA

1. Doleček V.: *VIII International Conference*: *Tribotechnics in theory and practice*, *21. – 24. April 1997, Skalský Dvůr.* Part II, str. 72, Sekurkon, Praha 1997.
2. Davies A.: *Handbook of Condition Monitoring*. Chapman & Hall, London 1998.
3. Stopka J.: Ropa, uhlie, plyn a petrochémia *42*, 3 (2000).
4. *ASTM D 6595-00: Determination of Wear Metals and Contaminants in Used Lubricating Oils or Used Hydraulic Fluids by Rotating Disc Electrode Atomic Emission Spectrometry*, November 2000.
5. *ISO 4406: Hydraulic fluid power -- Fluids -- Method for coding the level of contamination by solid particles*, 1999.

J. Mihalčová and H. Al Hakim *(Department of Operation of Technological Systems, Technical University, Prešov):* **Tribotechnical Diagnostics in Waste Oil Operation I. Methods of Evaluation of Wear Particles in Oils**

Tribotechnical diagnostics of the waste aircraft engine oil was performed by analysis and evaluation of particles by emission spectrometry with rotating disc electrode, particle counting and by a ferrographic technique based on the effect of powerful magnetic field gradient. The methods made it possible to evaluate the concentration and properties of particles: The methods afforded the concentrations of Fe, Al, Cr, Cu, Mg, Ni, Si, Ti, Pb, Sn, Ag, and Mo, the number of particles and particle size distribution as well as provided information on the wear state and a possible risk of failure.

ZPRÁVY

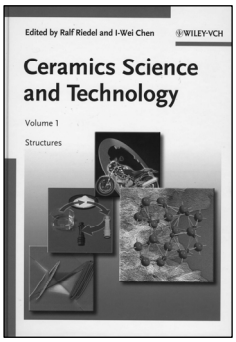
Pražské analytické centrum inovací
http://www.gacr.cz/PACI

Základy fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie a mikroskopie patří k jedné z nejrychleji se rozvíjejících metod, která nachází široké využití v medicínském a biologickém výzkumu. Její obrovská výhoda spočívá ve vysoké citlivosti, selektivitě a šetrnosti ke zkoumaným objektům. Díky těmto přednostem umožňují fluorescenční techniky sledovat jednotlivé fluoreskující molekuly přímo v živých buňkách a tkáních a přispívají tak k objasnění biochemických a biologických mechanismů. V poslední době fluorescenční spektroskopie a mikroskopie prodělala značný vývoj jak v přístrojovém vybavení tak v možnostech značit vzorky fluorescenčními sondami. Z tohoto důvodu byl radou Pražského analytického centra inovací uspořádán čtyřdenní seminář zaměřený na základy fluorescenční spektroskopie. Tento kurs proběhl ve dnech 11.-14.6.2007 v moderním areálu Studijního a informačního centra České zemědělské univerzity v Praze-Suchdole. Jako přednášející byli vybráni významní odborníci ze zahraničí i z domova, kteří se aktivně podílejí na vývoji fluorescenční mikroskopie. V úvodní přednášce doc. Hof (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR) objasnil základní pojmy a jevy související s fluorescencí. Poté byla věnována pozornost využití anisotropie (Mgr. Jana Humpolíčková, PhD., Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR), přenosu energie (Dr. Yegor Domanov, University Helsinki), zhášení fluorescence (Mgr. Jan Sýkora, PhD., Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR) a relaxace rozpouštědla (doc. Hof, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR) pro studium mechanismů a vlastností biologicky-aktivních molekul. Další přednášky byly zaměřeny na přehled značek vhodných pro fluorescenční metody a způsobů značení těmito barvivy (Dr. Yegor Domanov, University Helsinki, Finsko) a na základy fluorescenční mikroskopie (Dr. Ingo Gregor, Forschungszentrum Juelich, Německo). Kurs pokračoval příspěvky, které se věnovaly nejnovějším mikroskopickým metodám, jakými jsou fluorescenční korelační spektroskopie (Mgr. Jana Humpolíčková, PhD., Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR) a různé techniky zobrazování fluorescenčně značených mikroobjektů (Dr. Ingo Gregor, Forschungszentrum Juelich, Německo). Závěrečný den byl věnován praktickým ukázkám přístrojového vybavení a pokusům v laboratořích Doc. Matina Hofa na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR. K tomuto kursu byla vydána skripta a powerpointové prezentace jednotlivých přednášek byly nasdíleny na síti. Další informace o činnosti Pražského analytického centra inovací lze nalézt na adrese http://www.gacr.cz/PACI.

Martin Hof
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i.,
Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
tel: 266 053 264, E-mail: Hof@jh-inst.cas.cz

RECENZE



Ralf Riedel,
I-Wei Chen (ed.):

Ceramics Science and Technology
Volume 1: Structures

Vydal Wiley-VCH Verlag 2008,
590 stran.
ISBN 978-3-527-31155-2

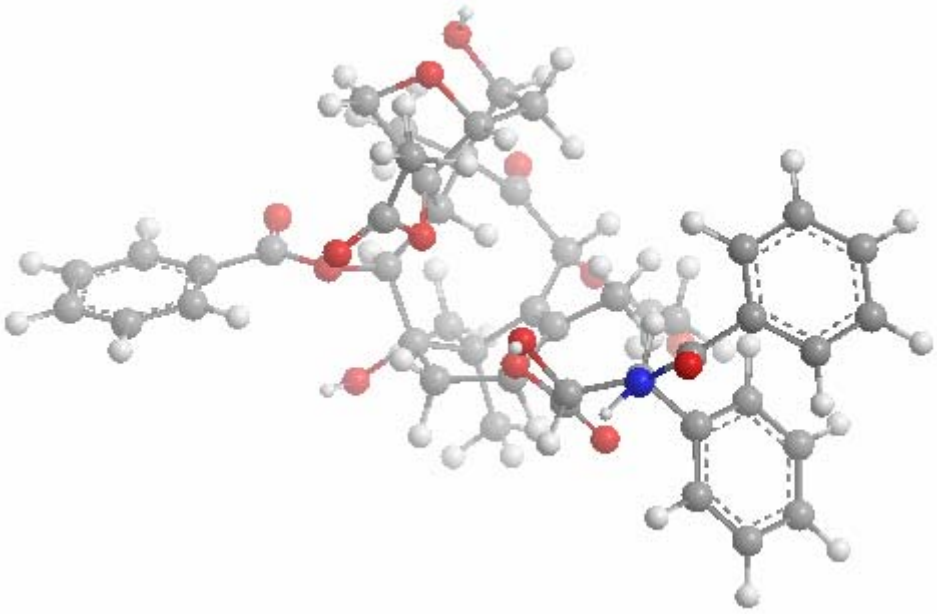
Pokud v posledních letech narazím na knihu s názvem odpovídajícím celému vědnímu oboru, vždy se nejdříve podívám na počet autorů. Pokud jsou uvedeni na obalu ne autoři, ale editoři, zpozorním. Velmi často je totiž takováto kniha jen formálně upraveným sborníkem konference v daném oboru. Recenzovaná kniha je čestnou a zdařilou výjimkou. Ačkoliv je počet autorů vysoký a jejich složení různorodé, jde o skutečnou knihu, velmi pečlivě editovanou a poskytující skutečný přehled základních i nejnovějších poznatků v oboru chemie a technologie anorganických materiálů.

Jak vyplývá z předmluvy, vycházející kniha je prvním svazkem čtyřdílné série. Svazek současný je věnován strukturnímu pohledu na keramické materiály. Druhý svazek má popsat jednotlivé skupiny keramických materiálů (především na bázi oxidů, nitridů a karbidů) a jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Svazek třetí se zaměří na moderní způsoby jejich přípravy a zpracovaní a díl čtvrtý na jejich aplikaci. Z naznačeného obsahu připravovaných dílů se tedy zdá, že obsah série by spíše mohl být vyjádřen názvem Advanced Ceramics Science and Technology. V oblasti pokročilé či inženýrské keramiky ovšem slibuje být série skutečně cenným zdrojem informací. To dokazuje i první díl. Jeho první část, Moderní trendy v pokročilé keramice, se na první pohled zdá přesahovat podtitulem knihy (Structury) vymezený obsah, neboť se zabývá především novějšími směry v přípravě keramických materiálů, metodami jejich charakterizace a naznačením možných aplikací. Uvědomíme-li si ovšem, že jde vlastně o úvod k celé čtyřdílné sérii, je zcela na místě a může sloužit k základní orientaci vysokoškolských studentů oboru na pregraduální úrovni. Další dvě části prvního dílu jsou již zaměřeny na strukturní pohled, tradičně rozdělený na strukturu na úrovni atomární a na mikrostrukturu. Jak vyplývá z názvů dílčích kapitol (Modelování amorfních keramických struktur; Strukturní chemie keramiky; Difúze v keramice, Struktura keramických materiálů: termodynamika a složení; Mikrostrukturní design keramiky: teorie a experiment; Mesoskopické keramické jedno-, dvou- a trojrozměrné struktury; Objemové keramické nanostruktury; Sklokeramika na bázi SiO_2 a Al_2O_3; Porézní odlehčené struktury; Keramické tenké filmy a Vícefázové vláknité kompozity), není kniha věnována pouze popisu struktur, ale je v souladu se současným směřováním materiálového výzkumu zaměřena spíše na souvislosti mezi přípravou materiálů, jejich strukturou a výslednými vlastnostmi. Tyto dvě hlavní části lze spíše doporučit čtenářům na vyšší úrovni, tedy výzkumným pracovníkům a doktorandům. Jedinou drobnou chybou knihy, způsobenou nejspíše širokým autorským kolektivem z obou břehů Atlantiku, je nejednoznačnost výkladu slova „ceramics“. Zatímco v USA zahrnuje celou oblast anorganických nekovových materiálů, v Evropě je chápána úžeji, pouze jako vlastní keramické materiály. Většina kapitol odpovídá spíše evropskému pojetí. Přesto, vzhledem k tomu, že skelná fáze je významnou složkou mikrostruktury celé řady keramických materiálů, nejsou ani kapitoly věnované skelnému stavu nadbytečné.

První díl byl autory dedikován významné osobnosti keramické vědy, jíž je prof. Sir Richard Brook, k jeho sedmdesátým narozeninám, a je možné konstatovat, že jde o dar zdařilý. Knihu a celou připravovanou sérii lze doporučit všem studentům, badatelům a inženýrům v oboru anorganických keramických materiálů.

Aleš Helebrant

SIGMA-ALDRICH



VIII. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

pořádané firmou Sigma-Aldrich

10.6. – 13.6. 2008

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Bylo, nebylo, za devaterými horami žili kdysi mladí chemici. Bývala trochu jiná doba, „šéfové“ byli přísní, a zatímco dovolovali mladým pracovat i v sobotu a v neděli a dovolená se poznala podle toho, že se šlo do práce až v devět hodin, nedovolovali jim jezdit na žádné konference, aby se nerozptylovali od práce. Šéfové na konference, zejména do ciziny, jezdili raději sami. Měli také jistotu, že žádný mladý moula nevyzradí vědeckým kontrarevolucionářům tajemno, na kterém zrovna pracoval, neboť takové vyzrazení by pak zřejmě otřáslo i Varšavskou smlouvou a RVHP.

Ti mladí chemici se jednou takhle odpoledne u čaje usnesli, že udělají naopak mezinárodní konferenci, na kterou nevezmou, jak se tehdá říkalo, „mechem obrostlé stařík y“. A stalo se. Když po letech moudří otcové v Bruselu, přijímajíce nás „Čechoslováky“ milostivě mezi „lidi“, pronesli, „*... well, můžete taky udělat konferenci pro mladé vědce, máme to tady takovou novinku ...*“, bylo velmi příjemné odpovědět: „*... inu, taková tradice je u nás již od 80. let minulého století a velmi se osvědčuje ...*“.

Když pak přišel Martin Fusek s nápadem ještě na takové konferenci, kterou by pro podporu věci zorganizovala firma Sigma-Aldrich CZ, odměnit grantem dva nejlepší příspěvky, vznikla věc, která mnoho obdoby na světě nemá. Ocenění tohoto typu je dnes již tradičně „prestižním“, což je vidět i z toho, že ocenění jsou v poslední době zváni na přednášky do okolních zemí tamními odbornými společnostmi. A kromě toho, co se probojuje na tuto konferenci, můžeme s určitou nadsázkou říci, že už mnoho, co by stálo za dobré slovo, v našich krajích nezbývá (anebo nemělo by zbývat).

Je tedy nad slunce jasné, že pár šťastných odvážlivců, kteří neseděli za pecí a nebáli se nést svou kůži na trh, má jeden malý kamínek do svého odborného životopisu. A navíc k tomu má desítky nových známých a přátel ze všech koutů odborného života, z řady biologů, biochemiků, chemiků a odborníků věd příbuzných. To jsou dvě nepopiratelné devizy akce, která se letos koná v této podobě již po osmé. Devizou třetí je letos i to, že se akce rozprostřela ze zemí česky mluvících i na Slovensko, protože zde není jazyková bariéra a protože na obou stranách Slovensko-Moravské hranice se dělá jak pěkné vínko, tak poctivá práce, která si zaslouží, aby byla vidět.

Společnosti Sigma-Aldrich za to budiž vyřčena veřejně pochvala!

Pavel Drašar

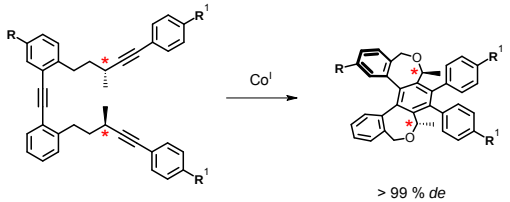
PŘÍPRAVA HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LÁTEK PRO VYUŽITÍ V ASYMETRICKÉ KATALÝZE

ANGELINA ANDRONOVA, NATHAN CLEMENCE, IRENA G. STARÁ* a IVO STARÝ*

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
andronova@uochb.cas.cz

Neracemické heliceny jako inherentně chirální 3D struktury jsou slibnými kandidáty na ligandy, které lze použít v různých enantioselektivních reakcích katalyzovaných tranzitními kovy. V naší laboratoři byla vyvinuta diastereoselektivní syntéza helicenů založená na [2+2+2] cyklotrimerizaci, která umožňuje připravit tyto látky v preparativním měřítku a ve vysoké optické čistotě[1,2].

Z důvodu pozdějšího snadného zavedení vhodných ligačních skupin byla pozornost soustředěna na přípravu methoxy- a bromderivátu ***2***. Byl vypracován jednoduchý a modulární syntetický přístup, umožňující připravit celé spektrum pentacyklických látek. Klíčová cyklotrimerizace ***1*** → **2** poskytovala žádaný produkt ve vysokém výtěžku a s vynikající stereoselektivitou (> 99 % *de*).



*(S,S)-(-)-**1***

*(P,S,S)-(-)-**2***

R = OCH_3, Br

R^1= CH_3, OCH_3, CN, Cl, NO_2, CF_3

V příspěvku bude podrobně diskutována optimalizace přípravy těchto látek a možnosti jejich převedení na chirální ligandy použitelné v enantioselektivní katalýze.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg.č. 203/07/1664), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC05A57).

LITERATURA

1. Starý I., Stará I. G., Alexandrová Z., Sehnal P., Teplý F., Šaman D., Rulíšek L.: Pure Appl. Chem. *78*, 495 (2006).
2. Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulíšek L., Šaman D., Císařová I.: J. Org. Chem. *73*, v tisku (2008).

ZMENY V METABOLIZME AMYLOIDNÉHO PREKURZOROVÉHO PROTEÍNU PO EXPERIMENTÁLNE INDUKOVANEJ ISCHÉMII

EVA BABUŠÍKOVÁ[a], NATALIA NALIVAEVA[b], DUŠAN DOBROTA[a], JOZEF HATOK[a], RENÁTA KIRSCHNEROVÁ[a] a ANTHONY TURNER[b]

[a]Univerzita Komenského v Bratislave, Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko, [b]Inštitút molekulárnej a bunkovej biológie, Fakulta biologických vied, Univerzita Leeds, Leeds, LS2 9JT, Veľká Británia
babusikova@jfmed.uniba.sk

Mozgová ischémia má často nepriaznivú prognózu a dlhšie trvajúca ischémia spôsobuje ireverzibilné zmeny a poškodenie buniek nervového systému. Existuje predpoklad, že jedným z následkov ischémie môže byť v neskoršom veku rozvoj a vznik Alzheimerovej choroby. Presné mechanizmy, ktoré sú za takéto prepojenie zodpovedné, dodnes nie sú jasné. Amyloidný prekurzorový proteín (APP) môže byť upravovaný ne-amyloidnou (alfa-sekretáza) alebo amyloidnou dráhou (beta- a gama- sekretáza) za vzniku toxického amyloidného beta peptidu (Abeta), ktorý zohráva dôležitú úlohu v rozvoji Alzheimerovej choroby. V našej štúdii sme sledovali účinok globálnej ischémie, indukovanej u potkanov, na úpravu APP. Zistili sme, že počas ischémie dochádza v mozgových hemisférach k nárastu APP, pričom počas reperfúzie sa hladina APP vrátila na úroveň kontrolnej skupiny zvierat. Hladina beta-sekretázy tiež štatisticky významne narastala počas ischémie. Medzi významné Abeta degradujúce enzýmy patria neprilysín, endotelín-konvertujúci enzým. Hladiny týchto enzýmov sa po ischémii štatisticky významne znížili. Počas ischémie sme pozorovali aj nárast oxidačného poškodenia. Naše výsledky naznačujú, že ischémia vedie ku amyloidnej úprave APP a zvýšený oxidačný stres by mohol prispievať k smrti neurónov.

Tento grant bol podporený MVTS grantom Angl/Slov/JLF/07.

PLATINUM(IV) COMPLEX LA-12 PERTURBES CELL CYCLE AND CAUSES APOPTOSIS IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELL LINES

OLGA BLANÁŘOVÁ[a,b], A. VACULOVÁ[a], K. SOUČEK[a], J. HOFMANOVÁ[a], P. SOVA[c], and A. KOZUBÍK[a,b]

[a]Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Brno; [b]Masaryk University, Brno; [c]R&D, Pliva-Lachema a.s., Brno

Platinum chemotherapeutics are widely used in treatment of various solid tumors. Recently, platinum(IV) complexes have been introduced as an important approach to the treatment of cancer. Novel promising anticancer adamantylamine Pt(IV) complex LA-12 was found to be

highly effective in cell lines derived from tumors of different origin. We studied the cytotoxic action of LA-12 in colorectal cancer cell line HCT116 in comparison to Pt(II) derivate oxaliplatin, established as a standard therapy of colorectal cancer. After incubation with LA-12, we observed accumulation of the cells in S and G2/M phases of the cell cycle and strong cell-cycle-phase specific induction of apoptosis. On the contrary, oxaliplatin was less potent in altering proliferation and causing cell death. Furthermore, HCT116 p53-/- and HCT116 p21-/- cells were more resistant to oxaliplatin cytotoxic effects, whereas they retained sensitivity to LA-12.

This work was supported by the IGA grant No. 1QS500040507 of the Academy of Sciences of the Czech Republic and the Czech Science Foundation, grant No. 301/07/1557.

USE OF CHIRAL SEPARATIONS FOR THE DETERMINATION OF ENZYME ENANTIOSELECTIVITY

JIRI BRICHAC[a,b,c], JIŘÍ ZIMA[c], MICHAEL KOTIK[b], ALES HONZATKO[a], and MATTHEW J. PICKLO[a]

[a]Dep Pharmacology, Physiology, and Therapeutics, University of North Dakota, Grand Forks, ND 58203-9024, USA; [b]Laboratory of Enzyme Technology, Institute of Microbiology, AS CR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4; [c]Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2
brichac@email.cz

Enantioselectivity is the ability of chiral environment to distinguish between two enantiomers. Enantioselective enzyme prefers one enantiomer as a substrate or preferentially forms one enantiomer over the other in an enzymatic reaction.

Enantioselective enzymes are very useful biocatalyzators allowing cheap preparation of optically pure chemicals. In this work, we determined enantioselectivity of novel microbial epoxide hydrolases. Enantiopure epoxides prepared by an enzyme kinetic resolution of racemates can serve as valuable building blocks in an organic synthesis. In order to measure the enantioselectivity, we developed methods for analyses of various chiral epoxides using a chiral GC on cyclodextrine-based stationary phases. We showed, that epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* M200 reacts with *tert*-butyl glycidyl ether in enantioselective manner[1].

In the second part of this study, we elucidated the basis of enantioselective oxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) by brain mitochondria[2]. HNE is a cytotoxic product of lipid peroxidation involved in numerous diseases, including Alzheimer's disease. Here, we described enzyme kinetics of HNE enantiomers detoxification to *trans*-4-hydroxy-2-nonenoic acid (HNEA) by aldehyde dehydrogenases (ALDHs)[3]. Furthermore, we developed direct and indirect HPLC methods for HNEA enantioseparation[4]. Our results showed, that rat ALDH5A enantioselectively oxidized *(R)*-HNE with retention of stereoconfiguration, whereas rat ALDH2 was not enantioselective.

The authors gratefully acknowledge NIH grants P20 RR17699-05 COBRE (M.J.P.) and AA15145-01 (M.J.P.) and AS CR grant Z5020903-I027 (M.K.) and grant SM0021620857 (J.Z.).

REFERENCES

1. Kotik M., Brichac J., Kyslik P.: J. Biotechnol. *120*, 364 (2005).
2. Honzatko A., Brichac J., Murphy T. C., Reberg A., Kubatova A., Smoliakova I. P., Picklo M. J., Sr.: Free Radical Biol. Med. *39*, 913 (2005).
3. Brichac J., Ho K. K., Honzatko A., Wang R., Lu X., Weiner H., Picklo M. J., Sr.: Chem. Res. Toxicol. *20*, 887 (2007).
4. Brichac J., Honzatko A., Picklo M. J.: J. Chromatogr., A. *1149*, 305 (2007).

SYNTÉZA THIAMAKROCYKLŮ PRO KOMPLEXACI FULLERENŮ

MICHAL BUCHTA[a] , PETR HOLÝ[b], JIŘÍ RYBÁČEK[b], ŠÁRKA LIPNICKÁ[b] a MARTIN BĚLOHRADSKÝ[b]

[a]Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; [b]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
michal.buchta@vscht.cz; petrholy@uochb.cas.cz

V programu syntézy makrocyklických ligandů pro komplexaci fullerenů se zabýváme přípravou thiamakrocyklů z elektronově bohatých aromatických platforem a 4,5-bis(2-kyanoethylthio)-1,3-dithiol-2-thionu ***I*** jako rovněž elektronově bohatého spojkového prvku. Ze struktury ***I*** lze ve dvou krocích odstranit kyanoethylové skupiny a generované thiolátové skupiny postupně alkylovat[1]. Při alkylaci bis(halomethyl)aromátem lze oba tyto stavební bloky postupně řetězit a z acyklického prekurzoru uzavřít makrocyklus. Na tomto principu se podařilo realizovat postupnou výstavbu makrocyklu ***III*** ze 4 molekul 1,4-bis(brommethyl)benzenu ***II*** a 4 spojkových jednotek ***I*** (Schéma 1).

Makrocyklus ***III*** má již dutinu odpovídající velikosti fullerenu C_{60}, jak ukazuje molekulové modelování metodou AM1. Na syntézu makrocyklu ***III*** navazuje studium tvorby naznačeného inkluzního komplexu a aplikace vypracované syntetické strategie na další vhodně volené bis(halomethyl)aromáty pro optimalizaci velikosti dutin a elektronických vlastností vznikajících makrocyklů a zlepšení jejich rozpustnosti.

Práce je prováděna za finanční podpory GA AV ČR (grant č. IAA400550704).

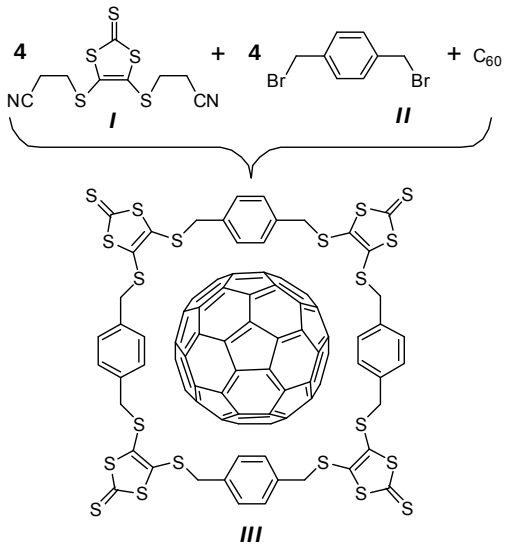


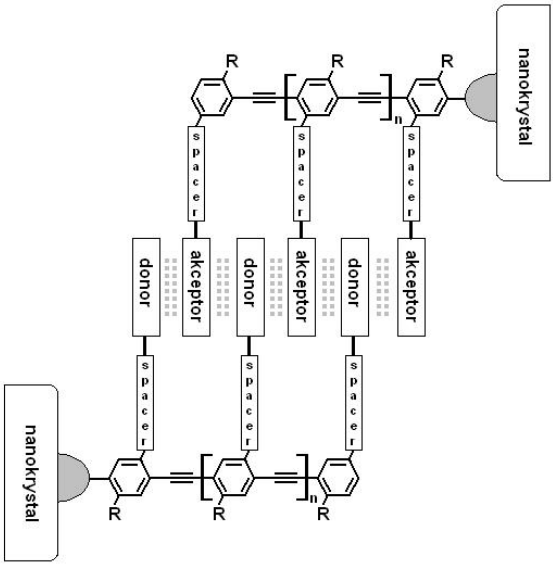
Schéma 1

LITERATURA
1. Simonsen K. B., Svenstrup N., Lau J., Simonsen O., Mørk P., Kristenen G. J., Becher J.: Synthesis *3*, 407 (1996).

DONOR-AKCEPTOROVÉ SYSTÉMY JAKO MATERIÁLY PRO MOLEKULÁRNÍ ELEKTRONIKU

VÁCLAV DEKOJ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ, ŠÁRKA LIPNICKÁ a IVO STARÝ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dekoj@uochb.cas.cz



Interakce mezi elektronově bohatými a elektronově chudými organickými sloučeninami je známa dlouhou dobu a je využívána v řadě syntéz a aplikací. Materiály využívající této interakce jsou perspektivní i z hlediska využití v molekulární elektronice. Na schématu je vyobrazena struktura připravovaných materiálů, jejichž hlavním atributem je možnost dvoudimenzionální vodivosti. Oligofenylenacetyleny jsou známé molekulární vodiče a ve zkoumaných systémech tvoří páteřní segmenty donorních či akceptorních oligomerů. Vodivost v kolmém směru je zajišťována interakcí mezi donory a akceptory. Pro zajištění optimální donor-akceptorní interakce je každý monomer vybaven spacerem zajišťujícím určitou flexibilitu interagujících částí monomerů. V budoucnu bude studována možnost napojení studovaných oligomerů na monokrystaly a budou provedeny testy vodivosti takovéhoto systému.

HETEROGENNÍ KATALYZÁTORY PRO HECKOVU REAKCI

JAN DEMEL[a,b], SANG-EON PARK[c], JIŘÍ ČEJKA[b] a PETR ŠTĚPNIČKA[a]

[a]Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2; [b]Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 18223 Prague 8; [c]Katedra chemie, Inha University, Incheon 402-751, Korejská republika
demelj@jh-inst.cas.cz, stepnic@natur.cuni.cz

Palladiem katalyzované spojovací reakce jsou v posledních desetiletích intenzivně studované pro jejich širokou použitelnost v organické syntéze. Z těchto reakcí je pravděpodobně nejčastěji používaná Heckova reakce, tedy reakce alkenu s arylhalogenidem, při které vzniká substituovaný alken. Použitý katalyzátor může být palladnatá sůl, fosfínové komplexy palladia, palladacykly, nebo také palladiové nanočástice. Jedny z prvních heterogenních katalyzátorů byly nanočástice nanesené na pevném nosiči například aktivním uhlí, organickém polymeru, zeolitu nebo silikagelu.

Později se ukázalo, že různé modifikující skupiny zakotvené na nosiči výrazně zlepšují vlastnosti vzniklých katalyzátorů[1]. Také již není nutné palladium redukovat, protože tyto modifikující skupiny jsou schopné vázat i palladnaté soli.

V naší práci jsme připravili sérii mesoporézních molekulových sít se zakotvenými aminoskupinami na povrchu. Tyto materiály jsme modifikovali octanem palladnatým a testovali v modelové Heckově reakci butyl-akrylátu s brom-benzenem za vzniku butylesteru kyseliny skořicové. Studovali jsme průběh reakce při použití mikrovlnného ohřevu oproti použití klasického hydrotermálního zahřívání. Dosažené konverze dosáhly až 90 % po 30 minutách reakce v mikrovlnné peci.

Tato práce je součástí projektů MŠMT ČR (LC06070 a MSM0021620857).

LITERATURA
1. Phan N. T. S., Van Der Sluys M., Jones C. W.: Adv. Synth. Catal. *348*, 609 (2006).

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

IVANA DOLEŽÍLKOVÁ[a,b], MARTINA MACKOVÁ[a], TOMÁŠ MACEK[b] a ZUZANA CHRASTILOVÁ[a]

[a]Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; [b]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dolezili@vscht.cz

Rezistence k antimikrobiálním látkám se vyvinula u širokého spektra nozokomiálních a sekundárních infekcí, přičemž není výjimkou odolnost mikroorganismů i vůči širokospektrým preparátům. Vzhledem k masívnímu užívání antibiotik v minulých desetiletích se rezistence dostala do popředí zájmu, i přes v současnosti velké spektrum dostupné množství antibiotik. Bakterie vyvinuly několik mechanismů rezistence typu zabránění vstupu antibiotika do buňky či jeho navázání na specifické místo, produkce inaktivujícího enzymu, či změna vazebného místa a jsou schopné eliminovat účinek řady látek. Proto je tedy důležité vyvinout antimikrobiální látky s novým mechanismem účinku, které mohou obejít vývoj rezistence.

U kationických antimikrobiálních peptidů jako nové skupiny antibiotik nacházíme mnoho žádoucích vlastností. Mají široké spektrum účinku, zabíjejí bakterie rychle, jejich účinek není ovlivněn známými mutacemi způsobující rezistenci na antibiotika, s běžnými antibiotiky působí většinou synergisticky a neutralizují endotoxin. V současnosti bylo popsáno více než 700 peptidů. Tyto peptidy nezabíjejí pouze pathogenní mikroorganismy, zahrnující grampozitivní a gramnegativní bakterie, viry, protozoa a mikroskopické vláknité houby, ale rovněž podporují a doplňují vrozený imunitní systém. Pro tyto peptidy je charakteristický pozitivní náboj, méně než 50 aminokyselin a mají hydrofobní charakter, který jim umožňuje zaujmout amfipatickou konformaci a interagovat s membranou pathogenů. Vývoj peptidů pro farmaceutické účely je spojen s objasněním, jak struktura peptidů ovlivňuje mechanismus účinku.

V této práci jsme se zaměřili na izolaci a charakterizaci látek peptidové povahy s antimikrobiálním a antifungálním účinkem z rostlinného materiálu. Rozličné typy antimikrobiálních látek byly získány z různých částí rostlin nebo mezibuněčných tekutin. Antimikrobiální peptidy byly izolovány v několika krocích srážením bílkovinných frakcí, purifikovány pomocí afinitní a ionexové FPLC a charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami: UV-VIS spektroskopií, SDS-PAGE a tricinovou elektroforézou. Byla testována antibakteriální a antifungální aktivita s cílem prokázat účinnost a vhodnou koncentraci. Jako testovací modely byly použity pathogenní a potenciálně pathogenní bakterie: G^- – *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Agrobacterium rhizogenes*; G^+ – *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus megatherium, Bacillus cereus, Bacillus pumillus, Arthrobacter ureafaciens*. V případě testování antifungální aktivity byly použity plísně: *Fusarium culmorum, Cladosporium herbarum, Aspergillus terreus* a *Alternaria* sp. Metodicky byly použity rychlá screeningová difuzní metoda na agaru a metoda využívající přístroj Bioscreen, kde je monitorován růst bakterií v závislosti na době inkubace a účinnosti příslušného peptidu. Z rostlinného materiálu se podařilo izolovat frakce z listů *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea, Armoracia rusticana,* semen *Pulsatilla* sp. a tkáňových kultur *Armoracia rusticana*, které působily inhibičně na houby *Cladosporium herbarum*, *Alternaria* sp. a bakterie *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus megatherium* a *Citrobacter* sp.

Autoři děkují grantové podpoře MSM 6046137305 a FRVS 1069/2008.

TAUTOMERY DERIVÁTŮ PYRIMIDINU S sp^3 HYBRIDIZOVANÝM UHLÍKEM ČÍSLO 5

MARTIN DRAČÍNSKÝ a MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ

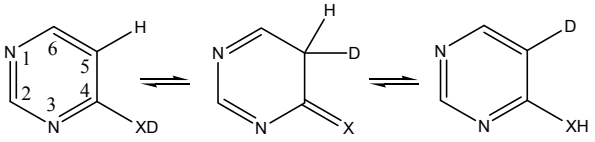
Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dracinsky@uochb.cas.cz

Deriváty pyrimidinu jsou součástí mnoha přírodních látek včetně nukleových kyselin a také celé řady léčiv[1]. Při NMR studiu derivátů pyrimidinu v D_2O jsme zjistili, že intenzita signálu vodíku v poloze 5 pyrimidinového kruhu časem klesá v důsledku výměny vodíku za deuterium. Vybrali jsme sérii 17 derivátů pyrimidinu, u které byla studována rychlost této izotopické výměny při různých pH.

V kyselém prostředí, kde jsou deriváty pyrimidinu protonovány, je meziproduktem izotopické výměny C(5)-protonovaný derivát. Experimentálně zjištěné hodnoty $\Delta G^{\#}$ dobře korelují s *ab initio* vypočtenými rozdíly volné energie mezi N- a C(5)-protonovanými formami.

V bazickém prostředí dochází také k izotopové výměně vodíku v poloze 5. V tomto případě lze uvažovat o dvou možných mechanismech izotopové výměny. Jednak i v bazickém prostředí je malá frakce pyrimidinových molekul protonována (v závislosti na rozdílu pKa a pH) a k výměně tedy může docházet přes C(5) protonovanou formu podobně jako v kyselém prostředí. U derivátů, kde dochází k výměně tímto mechanismem, lze pozorovat lineární závislost dekadického logaritmu rychlostní konstanty na pH (při zvýšení pH o 1 se desetkrát sníží koncentrace protonované formy a tím pádem se i desetkrát sníží rychlost izotopické výměny).

U derivátů pyrimidinu, které obsahují hydroxyl nebo aminoskupinu, je izotopová výměna v bazickém prostředí rychlejší než by odpovídalo zastoupení protonovaných forem a navíc tato rychlost téměř není závislá na pH. V tomto případě lze izotopovou výměnu vysvětlit mechanismem, ve kterém se objevuje tautomer pyrimidinu s sp^3 hybridizovaným uhlíkem v poloze 5. Tento tautomer nebyl dosud pozorován ani uvažován jako jedna z možných forem tautomerní rovnováhy[2].



X = O nebo NH tautomer s sp^3 hybridizovaným C(5)

LITERATURA
1. Holý A: *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, Univerzita Palackého, Olomouc 2004.
2. Jalbout A. F., Trzaskowski B., Xia Y., Li Y., Hu X., Li H., El-Nahas A., Adamowicz L.: Chemical Physics *332*, 152 (2007).

KVASINKY – CENNÝ NÁSTROJ PRE ŠTÚDIUM REGULÁCIE PROGRAMOVANEJ BUNKOVEJ SMRTI

B. DROBCOVÁ, M. MENTEL, I. KIŠŠOVÁ, J. KOLAROV a P. POLČIC

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovensko

Apoptóza je prísne regulovaná forma programovanej bunkovej smrti s významnou úlohou vo vývoji a homeostáze vyšších eukaryotov. Tento mechanizmus zabezpečuje rýchle odstránenie nepotrebných a potenciálne nebezpečných buniek v mnohobunkovom organizme bez negatívnych vplyvov na okolité tkanivo. Porucha regulácie tohto fyziologického procesu býva preto obvyklou príčinou mnohých závažných ľudských ochorení ako sú nádorové, neurodegeneratívne, autoimunitné a ďalšie ochorenia. Objasňovanie molekulárnych mechanizmov kontrolujúcich apoptózu poskytuje nové možnosti liečby týchto ochorení, a preto sú stále predmetom intenzívneho výskumu.

Hoci sa na kontrole apoptózy podieľa mnoho proteínov, kľúčovými regulátormi sú proteíny evolučne konzervovanej Bcl-2 rodiny, ktoré kontrolujú permeabilitu vonkajšej mitochondriálnej membrány a tým uvoľnenie cytochrómu *c* a ďalších apoptogénnych faktorov z mitochondriálneho medzimembránového priestoru do cytoplazmy – udalosť, ktorá zahajuje apoptotický program.

Bcl-2 proteínová rodina obsahuje pro- aj proti-apoptotických členov. Proteíny s pro-apoptotickou funkciou, ako Bax a Bak, podporujú uvoľnenie cytochrómu c a v zdravých bunkách sú inhibované proti-apoptotickými členmi rodiny Bcl-2, ako sú Bcl-2 a Bcl-x_L. V rámci skupiny pro-apoptotických členov ešte existuje podskupina tzv. „BH3-only“ proteínov, ktoré sú rozmiestnené v rôznych bunkových kompartmentoch a ich úlohou je po zaznamenaní apoptotického signálu aktivovať pro-apoptotické proteíny Bax a Bak. Mechanizmus, akým „BH3-only” proteíny kontrolujú následnú aktiváciu a oligomerizáciu týchto molekúl vo vonkajšej mitochondriálnej membráne však stále nie je objasnený.

Cieľom nášho výskumu je s využitím alternatívneho kvasinkového systému objasniť mechanizmus aktivácie multidoménových pro-apoptotických proteínov „BH3-only“ proteínmi. Naše štúdium interakcií „BH3-only“ proteínu Bim s multidoménovými Bcl-2 proteínmi ukázalo, že pro-apoptotický účinok tohto proteínu spočíva v inhibícii záchrannej aktivity účinku proti-apoptotických proteínov (Bcl-x_L a Bcl-2) v mitochondriách. Je veľmi pravdepodobné, že rovnaký molekulárny mechanizmus pro-apoptotického účinku proteínu Bim sa uplatňuje aj v cicavčích bunkách.

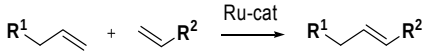
Táto práca bola podporená v rámci grantov APVT-20-012404, NATO RIG 981468 a UK/241/2007.

CROSS-METATHEZE 3-(PERFLUORALKYL)PROPENŮ S TERMINÁLNÍMI ALKENY

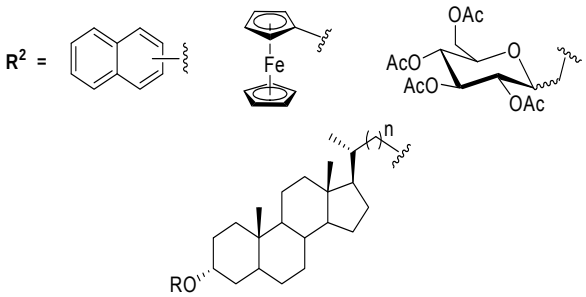
BARBARA EIGNEROVÁ[a,b] a MARTIN KOTORA[a,b]

[a]Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; [b]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
kotora@natur.cuni.cz

Zavedení jedné či více molekul fluoru do sloučenin mění její biologické vlastnosti (např. zvýšení metabolické stability), čehož se široce využívá ve farmaceutickém průmyslu[1]. Náš výzkum se zabývá hledáním nových metodik zavedení perfluoralkylového řetězce do různých strukturních typů molekul za mírných reakčních podmínek. Jednou z dostupných možností je rutheniem katalyzovaná cross-metatheze alkenů[2].



$R^1 = C_6F_{13}, C_3F_7, i\text{-}C_3F_7$



Tato metoda je založena na metathezi snadno připravitelných 3-(perfluoralkyl)propenů s terminálními alkeny katalyzované Hoveyda-Grubbsovým katalyzátorem. V rámci tohoto projektu se podařilo syntetizovat celou řadu sloučenin nesoucích různé perfluoralkylové řetězce, např. steroidy, metalloceny, areny a sacharidy, ve vysokých výtěžcích.

Tato práce vznikla za podpory Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (projekt č. 1M0508) a grantové agentury AVČR (projekt č. IAA 400 550 609).

LITERATURA
1. Isanbor C., O' Hagan D.: J. Fluorine Chem. *127*, 303 (2006).
2. Imhof S., Randl S., Blechert S.: Chem. Commun. *2001*, 1692.

PRÍPRAVA SEMISYNTETICKÝCH GLYKOKONJUGÁTOV O-ANTIGÉNU *Vibrio cholerae*

PAVOL FARKAŠ a SLAVOMÍR BYSTRICKÝ

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 *Bratislava*
chempalo@savba.sk

Príprava nových glykokonjugátov je v súčasnosti výzvou pre chemikov a biochemikov. Jedným z dôvodov štúdia týchto konštruktov je všeobecná T-bunková nezávislosť polysacharidov. Našim cieľom bolo pripraviť nový typ multivalentného glykokonjugátu. Antigén (O-špecifický polysacharid, O-SP, získaný z lipopolysacharidu *Vibrio cholerae*) sme sa rozhodli primárne viazať na glukánový polysacharidový nosič. Príprava a derivatizácia glukánov použitých ako makromolekulový nosič je publikovaná[1]. Prvým krokom syntézy je príprava konjugátu glukánu a O-SP reduktívnou amináciou, pripravili sa dva konjugáty. Sacharid - sacharidový konjugát sa z reakčnej zmesi izoloval gélovou chromatografiou a charakterizoval ^{1}H-NMR spektroskopiou. Na základe intenzity píkov sme odhadli zloženie konjugátov. O-SP sa naviazal na 18 a 43 % ramienok na glukánovom nosiči. Dosiahlo sa "vetvenie" 2 a 6 % O-SP na monomérnu jednotku glukánového nosiča. Druhým krokom bolo viazanie proteínu (BSA). Vo výsledných konjugátoch sa po prečistení stanovil obsah proteínov na 12 a 22 %. Podarilo sa pripraviť konjugáty s veľkým počtom sacharidových epitopov na primárnom polysacharidovom nosiči. Ďalej sa úspešne viazal proteín, čím získal konštrukt navyše T-bunkové epitopy. Získané semisyntetické glykokonjugáty boli testované na myšiach. Získané poznatky budú aplikované v ďalšom výskume.

Táto práca vznikla s finančnou podporou Slovenských grantových agentúr (APVV 0032-06 a VEGA 2/7029/27).

LITERATURA
1. Farkaš P., Bystrický S.: Carb. Pol. *68*, 187 (2007).

ŠTÚDIUM ŠTRUKTÚRY RETROVIROVÝCH ČASTÍC VYUŽITÍM AFM

FÜZIK TIBOR, PAVEL ULBRICH, YURII KUZNETSOV, ALEXANDER MCPHERSON a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Mikroskopia atomárnych síl (Atomic Force Microscopy – AFM) bola po prvýkrát popísaná v roku 1986 a zo začiatku bola využívaná hlavne v materiálovo-technologických výskumoch na ultrajemnú charakterizáciu povrchu. Keďže prvé AFM mikroskopy merali v kontaktnom režime, zobrazovanie mäkkých biologických materiálov bolo takmer nemožné. Až ďalší rozvoj metód a zavedenie takzvaného poklepového režimu (často pomenovaného aj „semi-contact mode"), umožnilo rýchlejší rozvoj využitia AFM i v biologickej oblasti. Toto usporiadanie umožňuje zobrazovanie povrchov biologických objektov za fyziologických podmienok s minimálnymi požiadavkami na úpravu a prípravu vzorky. AFM mikroskopia sa v súčasnosti úspešne používa na zobrazovanie biologických makromolekúl ako sú DNA, proteíny, ich vzájomných interakcií ako aj na zobrazovanie biologických membrán a bunkový stien baktérií. Keďže AFM mikroskopiou sa dá dosiahnuť až nanometrové rozlíšenie, ukázala sa ako vhodný nástroj na štúdium vírusových častíc, ktoré bolo možné doposiaľ zobraziť iba elektrónovou mikroskopiou. Na rozdiel od elektrónovej mikroskopie, kde je vzorka nutne vysušená, zmrazená alebo pokrytá jemnou vrstvou kovu, AFM umožňuje zobrazovať vírusové častice v ich fyziologickom prostredí, čo umožňuje zachovanie ich skutočnej štruktúry a rozmerov, resp. štúdium vplyvu zmeny prostredia na tvar a štruktúru častice prevedenom *in situ.*

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium štruktúry retrovirových častíc Mason-Pfizerovho opičieho vírusu (M-PMV) metódou už spomenutej AFM mikroskopie. Častice boli poskladané *in vitro* z delečného mutantu štruktúrneho polyproteinového prekurzora Gag M-PMV, ktorý reprezentuje nezrelú časticu tohto vírusu. Častice vykazovali pravidelnú štruktúru trigonálnej symetrie zloženú z domén usporiadaných do hexagonálnych kruhov, čo napovedá možnej ikozaedrickej organizácii tohto vírusu.

Táto práca bola podporená grantom KAN208240651, KJB501270701, 1M6837805002NR8797 a MSM6046137305.

VYUŽITÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE V BUNĚČNÉ BIOLOGII

GABRIELA GALIOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Laserová skenovací konfokální mikroskopie se často využívá v buněčné biologii, kde dříve dominovala elektronová mikroskopie. Její výjimečnost spočívá v možnosti nahlédnout hluboko do nitra živých i fixovaných buněk a tkání, získat ostře definované optické řezy a z nich vytvořit trojrozměrnou rekonstrukci různých buněčných struktur. Vývoj této techniky byl značně urychlen novými poznatky v počítačové technice, laserových systémech, detektorech a fluoroforech a všechny tyto oblasti se stále zdokonalují. Konfokální mikroskopie má široké uplatnění při vizualizaci a sledování změn na úrovni chromozomálních teritorií, genů, ale i v oblasti proteomiky. Tato technika

umožňuje studium mechanismů životně důležitým procesů v buňkách, jako je například replikace, transkripce, sestřih nebo DNA reparace. K velmi důležitým aplikacím konfokální mikroskopie patří sledování změn ve struktuře genomu nádorových buněk, což přispívá k objasnění podstaty vzniku nádorové transformace. Konfokální mikroskopie v kombinaci s různými fluorescenčními metodami, jako je například fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), se dnes hojně využívá v klinické diagnostice. Odhalení různých chromosomálních aberací jak v biologii nádorů, tak v prenatální diagnostice, má velký terapeutický význam. Konfokální mikroskopie v kombinaci s imuno-fluorescencí a „fotobleachingem" (FRAP technika) je často důležitým nástrojem základního výzkumu.

V naší laboratoři (LMCC, BFÚ AV ČR Brno) se zabýváme studiem struktury buněčného jádra a epigenetickými mechanismy regulace genové exprese u buněk nádorových i u lidských embryonálních kmenových buněk podléhajících diferenciaci. Velká část experimentů řeší problematiku detekce exprese diagnosticky významných genů a dále se zabýváme přípravou DNA sond pro FISH techniky, které mohou být potencionálně využity klinickými pracovišti.

LITERATURA

1. Kozubek M., Kozubek S., Lukášová E., Marečková A., Bártová E., Skalníková M., Jergová A.: Cytometry *36*, 279 (1999).
2. Dudová S., Bártová E., Pour L., Krejčí J., Hájek R.: Klinická onkologie, Supplement 2, *19*, 397 (2006).

NOVÉ INHIBITORY CYTOKININ OXIDASY/DEHYDROGENASY – PŘÍPRAVA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA

MARKÉTA GEMROTOVÁ, MAREK ZATLOUKAL, KAREL DOLEŽAL, LUKÁŠ SPÍCHAL a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, CZ-78371 Olomouc
market.gem@centrum.cz

Cytokininy jsou fytohormony hrající významnou roli v regulaci buněčného cyklu, diferenciace, růstu, senescence a mnoho dalších důležitých procesů. Přirozené cytokininy jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem na N^6, který může být aromatický nebo isoprenoidní. Modulace hladiny aktivních cytokininů v rostlině vede k zajímavým fyziologickým účinkům.

Cílem naší studie bylo připravit deriváty 2-X-6-anilinopurinů (X = H, halogen, amino, methylthio, nitro) s různě substituovanými fenyly a porovnat vliv jednotlivých substitucí na biologickou aktivitu těchto látek. Jelikož jsou všechny tyto látky podobné cytokininům, byly testovány jak v klasických cytokininových biotestech (kalusový test, amaranthový, senescenční test s listy pšenice), tak i v receptorovém testu a CKX (cytokininoxidasa/dehydrogenasa) inhibičním testu. V receptorovém testu byla studována schopnost různě substituovaných anilinopurinů aktivovat cytokininovou signální dráhu skrze receptory (AHK3 a AHK4/CRE1), které byly jednotlivě exprimovány v transgenních bakteriích *Escherichia coli*[1]. V inhibičním testu byla stanovena schopnost připravených látek inhibovat aktivitu CKX, enzymu degradace cytokininů, který byl připraven expresí v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*[2]. Většina nově syntetizovaných anilinopurinů účinně inhibovala aktivitu CKX enzymu *in vitro*, přičemž některé látky vykazovaly slabou ligandovou afinitu k cytokininovým receptorům. Inhibiční schopnost látky 2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurinu byla potvrzena *in vivo* na rostlinách tabáku nadprodukujících tento enzym, u kterých došlo po aplikaci ke komplementaci přirozeného fenotypu.

Tato práce byla podpořena grantem MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T.: Plant Cell Physiol. *2004*, 1299.
2. Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmülling T., Peč P.: Anal Biochem. *2002*, 1.

REZISTENCIA HT-29 BUNIEK PO FRAKCIONOVANEJ FOTODYNAMICKEJ TERAPII A PROTEÍNY TEPELNÉHO ŠOKU

LUCIA GRADA KULIKOVÁ[a,b], GIUSEPPE PALUMBO[b] a PETER FEDOROČKO[a]

[a]Ústav biologických a ekologických vied, PrF, Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovensko; [b]Dipartmento di biologia e patologia cellulare e molecolare L. Califano, Instituto di endocrinologia ed oncologia sperimentale/CNR, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Neapol, Taliansko
lucia.grada.kulikova@upjs.sk

Fotodynamická terapia (PDT) je alternatívna metóda liečby nádorového tkaniva založená na princípe fotodeštrukcie rakovinových buniek produkciou reaktívnych skupín kyslíka (ROS) po aktivácii fotosenzitívnej látky svetlom o určitej vlnovej dĺžke. Terapeutický účinok PDT sa môže zlepšiť modifikáciou štandardného protokolu liečby napr. rozdelením celkovej svetelnej dávky na niekoľko iluminácií s pauzami tmy medzi frakciami svetla. V reoxygenovanom tkanive sa tak zvýši tvorba ROS.

V našich experimentoch sme pozorovali signifikantne zvýšenú proliferáciu a rezistenciu buniek HT-29 po frakcionácii svetla (1+11 J/cm^2) s dlhšou pauzou tmy medzi dvoma svetelnými dávkami. Nízka svetelná dávka (1 J/cm^2) nevyvoláva ireverzibilné zmeny v bunkách. Následovná dlhšia tmavá pauza (6 h) na rozdiel od 1h pauzy má za následok rezistenciu buniek na cytotoxický efekt druhej svetelnej dávky (11 J/cm^2). Prvá subletálna fotoaktivácia nestačí na zvýšenie produkcie proteínov tepelného šoku dosiaľ považovaných za kľúčové molekuly vo fotorezistencii, ale postačuje na spustenie dráhy prežívania

sprostredkovanej nukleárnym transkripčným faktorom-κB a anti-apoptickým členom Bcl-2 rodiny proteínov Mcl-1.

Táto štúdia bola uskutočnená za finančnej podpory agentúry APVV (projekt APVT-20-003704) a grantovej agentúry VEGA (projekt VEGA-1/0240/08).

INTRACELULÁRNÍ TRANSPORT POLYPROTEINU GAG MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

P. GRZNÁROVÁ, J. LIPOV a T. RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6

Cílem práce je vysvětlit regulaci intracelulárního transportu prekursoru strukturních proteinů polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV). Samotný polyprotein Gag postačuje k vytvoření virům podobných částic v cytoplasmě transfekovaných buněk i *in vitro*. Byla sledována lokalizace jednak Gag divokého typu M-PMV, jednak fenotypově zajímavého mutantu R55FGag, který na rozdíl od nemutovaného typu tvořícího částice v pericentrionálním prostoru skládá částice až u cytoplasmy hostitelské buňky. Pro detekci proteinu a zjištění jeho lokalizace v buňkách byla použita vysoce senzitivní metoda s použitím nefluoreskujícího derivátu fluoresceinu FIAsH-EDT_2, který specificky a s vysokou afinitou váže krátkou sekvenci tzv. tetracysteinový tag (TC) CCPGCC. Tak vzniká komplex, který po excitaci příslušnou vlnovou délkou emituje silný zelený fluorescenční signál. Pro tento účel byly navrženy a připraveny konstrukty pro wtGag-TC a R55FGag-TC v expresním vektoru na bázi pDsRed1-N1. Pro ověření úspěšnosti transfekce byl dále navržen a připraven konstrukt pro DsRed-TC v expresním vektoru pDsRed1-N1, DsRed po excitaci emituje rudý fluorescenční signál. Všemi konstrukty byly transfekovány buňky COS-1. Lokalizace výsledných proteinů Gag-TC byla sledována inverzním mikroskopem Olympus v buňkách fixovaných formaldehydem v závislosti na čase.

Tento projekt je financován z grantů KJB 501270701 a MSM 6046137305.

DVE FORMY TAZ1: AKO VZNIKAJÚ A POTENCIÁLNE FUNKCIE

S. GUNIŠOVÁ[a], J. KRAMARA[b] a Ľ. TOMÁŠKA[a]

[a]Katedra genetiky a [b]Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovensko
stanislavagunisova@yahoo.com

Proteín Taz1 je esenciálnou súčasťou ochranného komplexu koncov chromozómov kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Počas expresie v *E. coli* aj v *in vitro* translačnom systéme podmieňuje Taz1p tvorbu dvoch foriem: plnej dĺžky (Taz1p) a skrátenú verziu (Taz1pΔC), ktorej chýba skoro celá Myb doména[1]. Na rozdiel od oligoméru Taz1p šiškovitého tvaru, Taz1pΔC vytvára filamenty neschopné väzby telomerickej DNA. Analýza lyzátov potvrdila výskyt dvoch foriem aj u *Sch. pombe*. *In silico* analýza *TAZ1* RNA odhalila v mieste štiepenia vlásenkovú štruktúru, ktorá by mohla byť zodpovedná za tvorbu dvoch foriem Taz1p, buď na transkripčnej alebo translačnej úrovni. S cieľom zistiť potenciálne odlišné úlohy foriem Taz1p sme na transkripčnej i translačnej úrovni študovali reguláciu expresie *TAZ1*. Pre objasnenie mechanizmu ich vzniku sme pomocou cielenej mutagenézy začali vyšetrovať okolie *TAZ1* RNA ohraničujúce kodón pre poslednú aminokyselinu skrátenej formy.

LITERATÚRA

1. Tomáška Ľ., Willcox S., Slezáková J., Nosek J., Griffith J. D.: J. Biol. Chem. *279*, 50764 (2004).

DIABETES A HYPERCHOLESTEROLÉMIA OVPLYVŇUJÚ EXPRESIU PROTEÍNOV ZAPOJENÝCH V PROCESE ISCHEMICKO-REPERFÚZNEHO POŠKODENIA MYOKARDU

ANNA HARČÁROVÁ, ADRIANA ADAMEOVÁ, PETER KŘENEK a MAGDALÉNA KUŽELOVÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SR

Diabetes a hypercholesterolémia sú známe ako rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení. Experimentálne práce zaoberajúce sa vplyvom diabetu na ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu však priniesli nejednoznačné výsledky, podobne ako štúdium expresie eNOS v podmienkach experimentálneho diabetu. Hypercholesterolémia prostredníctvom ovplyvnenia regulačného proteínu eNOS kaveolínu-1 zasahuje funkcie tohto enzýmu. Preto našim cieľom bolo zistiť, ako sa mení expresia proteínov eNOS a kaveolínu-1 a závažnosť ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu v podmienkach experimentálneho diabetu a hypercholesterolémie u potkanov. Expresia proteínov eNOS a kaveolín-1 v ľavej komore myokardu a aorte bola stanovená metódou SDS-PAGE a Western Blot. Na sledovanie závažnosti ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu sme použili *in vivo* protokol zameraný na výskyt reperfúznych dysrytmií a určenie dysrytmického skóre. Zvýšenú expresiu eNOS a kaveolínu-1 sme zaznamenali v aorte diabeticko-hypercholesterolemických zvierat (P<0,05), ale nie u diabetických zvierat. V ľavej komore myokardu nedošlo k signifikantným zmenám expresie sledovaných proteínov ani v jednej skupine experimentálnych zvierat. U diabeticko-hypercholesterolemických, ale nie u diabetických potkanov, sme zistili zvýšený výskyt závažných ventrikulárnych dysrytmií a zhoršenie dysrytmického skóre.

Táto práca vznikla za podpory grantov UK/46/2007 a VEGA 1/4296/07.

SLEDOVANIE mRNA ABC-TRANSPORTÉROV A APOPTOTICKÝCH BIELKOVÍN PRI ROZVOJI LIEKOVEJ REZISTENCIE U PACIENTOV S AKÚTNOU LEUKÉMIOU

JOZEF HATOK, EVA BABUŠÍKOVÁ, MONIKA SIVOŇOVÁ, TATIANA MATÁKOVÁ, JANA JUREČEKOVÁ a PETER RAČAY

Ústav lekárskej biochémie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko
hatok@jfmed.uniba.sk

Na rozvoji rezistencie leukemických buniek voči chemoterapii sa podieľa viacero mechanizmov. Medzi najviac študované bielkoviny spojené s chemorezistenciou radíme ABC „ATP-binding cassete“ transportéry a apoptotické bielkoviny. V tejto práci sme pomocou RT-PCR určili expresiu niektorých ABC transportérov (P-gp, MRP a BCRP) a apoptotických bielkovín (p53, bax, bcl-2 and bcl-X) u leukemických buniek od pacientov s akútnou leukémiou (AL). Navyše sme v našej štúdii porovnávali úroveň mRNA apoptotických proteínov medzi leukemickými bunkami a normálnymi leukocytmi od zdravých jedincov. Zistili sme, že v leukemických bunkách od pacientov s AL boli signifikantne zvýšené hladiny mRNA p53 a bax bielkovín. Signifikatne zvýšenou hladinou mRNA bcl-X_L pri akútnej lymfoblastickej leukémii (ALL) poukazujeme na vzťah ALL buniek k rezistencii cestou p53-závislej apoptózy. Medzi jednotlivými AL pacientmi sme na transkripčnej úrovni pozorovali vysokú heterogénnosť P-gp hladín, ktorá však bola signifikantne vyššia u pacientov v relapse oproti pacientom s iniciačným ochorením. Expresia MRP bola v leukemických vzorkách konzistentnejšia, avšak rozdiely medzi stavom ochorenia sme nepozorovali. Hladiny expresie BRCP boli veľmi nízke, no signifikantne vyššie u pacientov v stave relapsu.

Objasnenie mechanizmu vzniku chemorezistencie môže do budúcna viesť k výberu stratégií účinnej chemoterapie.

Podporené grantom Ministerstva školstva Slovenskej republiky: aAV/1106/2004.

VLIV EXPRESE GENU *FLO11* NA MORFOLOGII KOLONIÍ *Saccharomyces cerevisiae*

MARKÉTA HILSKÁ, VRATISLAV ŠŤOVÍČEK, JANDEROVÁ BLANKA a PALKOVÁ ZDENA

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Viničná 5, 128 44 Praha 2
mark.hill@post.cz

Kolonie kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae* jsou obvykle nestrukturované, téměř hladké. Kmen ∑1278 ale vytváří kolonie silně zvrásněné se vzhledem propletených provazců (střev) s volnými prostory mezi nimi. Roli ve vytváření této morfologie by mohl hrát protein buněčné stěny Flo11p, který se, jak bylo dříve popsáno podílí na buněčné adhesi a tvorbě pseudohyf[1].

Práce je zaměřena na studium vlivu exprese genu *FLO11* na morfologii monokolonií haploidního kmene *S. cerevisiae* $\sum S^h$ (cit.[2]), odvozeného od kmene ∑1278, v závislosti na zdroji uhlíku a ploidii. Při kultivaci *S. cerevisiae* $\sum S^h$ na nefermentovatelných zdrojích uhlíku byla morfologie kolonií silně zvrásněná a docházelo k tvorbě pseudohyf. Na fermentovatelných zdrojích uhlíku, s výjimkou rafinosy a maltosy, byly kolonie hladké. Korelace s expresí genu *FLO11* byla sledována měřením fluorescence fúzního proteinu *FLO11*-GFP.

Dále byla hodnocena morfologie kolonií spor hybrida $\sum S^h$ a kmene BY4742, tvořícího hladké kolonie. Intenzivně zvrásněné kolonie byly nalezeny pouze v případě haploidů párovacího typu MATa. Northern-blotting analýza prokázala korelaci mezi stupněm strukturovanosti kolonie a hladinou *FLO11* m-RNA.

Rovněž byla hodnocena morfologie kolonií spor hybridů s delecí genů *FLO8, MSS11, MSN1 a TEC1*, které ovlivňují transkripci genu *FLO11*. Výsledky ukazují, že zvrásněné kolonie tvoří kmeny pouze v případě, jsou-li nepoškozeny geny *FLO8* a *MSS11*.

Práce byla podporována granty IAA500200506 a LC531.

LITERATURA

1. Lo W. S., Dranginis A. M.: J. Bacteriol. *178*, 7144 (1996).
2. Vopálenská I., Hůlková M., Janderová B., Palková Z.: Res. Microbiol. *156*, 921 (2005).

IDENTIFICATION OF THE GENES FOR ML-DOMAIN CONTAINING PROTEIN, DER-P2-LIKE ALLERGEN AND TICK RECEPTOR FOR OSPA IN HARD TICK *Ixodes ricinus*: THEIR ROLE IN VECTOR-PATHOGEN INTERACTION

JANA HORÁČKOVÁ, NATALIIA RUDENKO, MARYNA GOLOVCHENKO, and LIBOR GRUBHOFFER

Faculty of Science, University of South Bohemia, and Biology Centre AS CR, Institute of Parasitology, České Budějovice, Czech Republic
janahora@seznam.cz

Castor bean tick (*Ixodes ricinus*) is the main vector of many pathogens in Europe, the best known are spirochetes *Borrelia burgdorferi* and tick borne encephalitis virus, causative agents of serious diseases in humans. Differential expression of many tick genes is regulated by blood feeding or pathogen invasion. We found few genes encoding for proteins involved in the molecular mechanism of vector–pathogen interaction.

Genes of Der-p2-like allergen and ML-domain containing protein, are members of group II of ML (MD-2-related lipid recognition) protein family. Members of this protein family are found in different organisms; all contain

ML domain with N-terminal signal peptide and six conserved cysteine residues. Exact function of these proteins is unknown but probably they play role in innate imunity reactions, or in lipid metabolism. Expression of the two tick ML proteins is induced by blood feeding.

A gene encoding tick receptor for OspA of *Borrelia burgdorferi* (TROSPA) was identified in the hard tick *Ixodes ricinus*. The gene and its protein product is known in black-legged tick, *I. scapularis*. TROSPA plays an important role in *B. burgdorferi* binding to tick´s gut and its colonization. The exon/intron organization of the *I. ricinus* TROSPA was revealed. The gene contains an intron in similar position like that from *I. scapularis*. TROSPA proteins from *I. ricinus* and *I. scapularis* show 92% of similarity.

NOVÝ PROTEIN RHODANASOVÉHO TYPU U *Acidithiobacillus ferrooxidans* – FUNKČNÍ STUDIE

JOSEF HOUSER[a,b], OLDŘICH JANICZEK[a] a MICHAELA WIMMEROVÁ[a,b]

[a]Ústav biochemie a [b]Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
houser@mail.muni.cz

Spotřeba barevných kovů ve světě neustále vzrůstá, stejně jako jejich cena. Tyto důvody vedou ke snaze získávat kovy stále efektivněji a s minimem nákladů. Jedním z nejvíce se rozšiřujících způsobů, jak toho dosáhnout, je využití bakterií v procesu takzvané biohydrometalurgie. Přestože za tímto účelem můžeme využít řadu bakterií, nejlépe prostudovaným a pravděpodobně také nejvíce zastoupeným druhem je extremofilní *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Díky své schopnosti uvolňovat kovy z jejich sulfidických rud je stále častěji používána pro těžbu mědi, zinku či niklu, tímto způsobem však lze získat i takové kovy jako je uran či zlato. Za účelem dalšího zefektivnění celého procesu je třeba lépe poznat životní pochody této bakterie, a to na úrovni jednotlivých enzymů. A právě enzymy účastnící se metabolismu síry dosud nejsou prozkoumány na dostatečné úrovni.

Mimo mnoha enzymů katalyzujících redoxní děje spojené se sírou, nacházíme v organismu *A. ferrooxidans* také kyanid:thiosulfát sulfurtransferasy (též rhodanasy). Rhodanasy se vyskytují u zástupců všech druhů organismů, kde vykonávají rozličné funkce počínaje detoxifikací kyanidu či sulfanu, přes podíl na syntéze/opravě Fe-S klastrů až po účast na signálních drahách. V genomu *A. ferrooxidans* bylo dosud nalezeno celkem 8 genů pro pravděpodobné rhodanasy. Cílem této naší práce je charakterizace zástupce této skupiny – proteinu RHC. V tomto případě se jedná o jediný enzym v genomu této bakterie, který vedle rhodanasové domény obsahuje také doménu ankyrinovou. Vzhledem k tomu, že tato doména slouží pro interakci mezi značně rozdílnými enzymy, je vysoce pravděpodobné, že protein RHC hraje významnou roli v metabolismu. V dostupných literárních zdrojích navíc dosud není charakterizován jediný enzym obsahující obě domény – rhodanasovou i ankyrinovou. Naše práce by tudíž mohla přinést mnohé nové poznatky nejen pro studium *A. ferrooxidans*.

Po počátečním bioinformatickém studiu genomu *A. ferrooxidans* (kmen ATCC 23270) byl gen pro RHC klonován a transformován do několika různých kmenů *E. coli*. Zde byla optimalizována exprese proteinu. Pro jeho získání byla zvolena izolace z inkluzních tělísek s následnou renaturací. Výsledkem je enzym vykazující rhodanasovou aktivitu. Následně byla provedena základní funkční analýza zahrnující mimo jiné stanovení pH a teplotního optima, katalytických konstant (k_{cat}) vůči oběma typickým substrátům a další vlastnosti. Spolu s plánovaným vyřešením struktury enzymu se nám nabízí možnost komplexního pochopení významu RHC pro životní cyklus průmyslově významné bakterie.

Projekt je podporován granty MŠMT (MSM0021622413) a GA ČR (525/08/0697).

IDENTIFIKACE HOMEOBOXOVÝCH GENŮ V GENOMU A TRANSKRIPTOMU SLADKOVODNÍ MEDÚZY *Craspedacusta sowerbyi*

MILUŠE HROUDOVÁ, ZDENĚK KREJČÍK, JAKUB RÍDL, HYNEK STRNAD, ČESTMÍR VLČEK, PETR VOJTA a VÁCLAV PAČES

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
hroudova@img.cas.cz

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (*Cnidaria,* třída *Hydrozoa*), který se v posledních letech stal předmětem intenzivního studia v oblasti molekulární genetiky a vývojové biologie. Komplexní genom žahavců kontrastující s jednoduchou stavbou jejich těl je v mnoha ohledech podobnější genomům obratlovců včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších modelových živočichů (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny. Kódují transkripční faktory a jejich struktura je silně konzervována napříč celou živočišnou říší. V raných stádiích vývoje organismu se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů a jsou také součástí významných signálních drah.

V rámci tohoto projektu byly v genomech žahavců *Hydra magnipapillata* (nezmar) a *Nematostella vectensis* (mořská sasanka) identifikovány a klasifikovány homeoboxové geny. Pro další studium u *Craspedacusta sowerbyi* byly vybrány některé méně časté a funkčně zajímavé rodiny homeoboxových genů. Metodou PCR s degenerovanými primery a následnou DNA sekvenací PCR produktů byly v genomu *Craspedacusta sowerbyi* identifikovány 3 geny patřící do rodiny POU a 6 genů rodiny SINE. Byla připravena a částečně sekvenována fosmidová genomová knihovna *Craspedacusta sowerbyi* za účelem

identifikace a analýzy homeoboxových a jiných genů zajímavých z hlediska fylogeneze a ontogeneze. V nedávné době jsme tento přístup rozšířili na BAC genomovou knihovnu a na identifikaci a sekvenování homeoboxových genů a jejich klastrů. Další část této práce spočívá ve studiu a porovnání transkriptomu *Craspedacusta sowerbyi*, *Tripedalia cystophora* (zástupce žahavců třídy *Cubozoa*) a některých dalších žahavců. Pro sekvenování genomové DNA a cDNA využíváme moderní sekvenační technologie, zejména pyrosekvenování na systémech GS20 a FLX.

Transkriptom dospělého jedince (medúzy) *Craspedacusta sowerbyi* obsahuje kolem šesti tisíc unikátních genů včetně 22 genů homeoboxových. Z porovnání počtu POU a SINE genů v genomu a transkriptomu vyplývá, že se jich do mRNA transkribuje dvě třetiny respektive polovina. Výsledkem sekvenování cDNA nižšího vývojového stádia (larvy) *Tripedalia cystophora* je více než šest tisíc unikátních genů včetně 16 genů homeoboxových. Byla provedena také částečná sekvenace cDNA z komplexního smyslového orgánu (rhopalia) *Tripedalia cystophora* a bylo nalezeno kolem devíti set genů. Projekt směřuje k identifikaci dalších homeoboxových genů, ke studiu exprese vybraných genů v tkáních žahavců metodou *in situ* hybridizace a komparativním analýzám žahavčích genomů a transkriptomů z hlediska kvality a kvantity homeoboxových genů a jiných transkripčních faktorů.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

ÚLOHA PROTEINU AGR2 PŘI ENDOKRINNÍ TERAPII KARCINOMU PRSU

ROMAN HRSTKA, TAMARA ŠMERDOVÁ, RUDOLF NENUTIL a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno hrstka@mou.cz

Karcinom prsu představuje nejčastější nádorové onemocnění diagnostikované u žen ve většině vyspělých zemí světa a podobně je tomu i v naší populaci. Přibližně u dvou třetin pacientek je prokázána přítomnost funkčních estrogenních receptorů (ER) a právě u těchto případů je vhodné indikovat antihormonální léčbu, která obecně představuje jednu z nejstarších forem molekulární terapie. V přímé souvislosti s expresí ER byl nedávno objeven i protein AGR2. Při následných analýzách bylo prokázáno, že se jedná o významný proliferační faktor se schopností indukovat tvorbu metastáz.

Při studiu exprese AGR2 na úrovni mRNA i proteinu jsme prokázali významnou korelaci nejen exprese AGR2 s přítomností funkčních steroidních receptorů ale i s expresí cyklinu D1. Protože cyklin D1 je znám jako jeden z faktorů spojených se vznikem rezistence při léčbě tamoxifenem, byla analyzována exprese AGR2 v rámci odpovědi na působení různými antihormonálními adjuvans. Při stanovení exprese AGR2 v nádorové buňce po působení tamoxifenu skutečně docházelo k nárůstu hladiny AGR2, naopak při podání aromatázových inhibitorů či fulvestrantu bylo možné pozorovat inhibici exprese tohoto proteinu.

Vzhledem k signifikantní korelaci mezi expresí AGR2 a rezistencí k tamoxifenu u karcinomů prsu lze předpokládat zapojení tohoto proteinu do procesů spojených s některými nežádoucími účinky při podávání tamoxifenu, kdy může docházet k tvorbě karcinomu endometria a v řadě případů i ke vzniku rezistence spojené s relapsem onemocnění. Na základě statutu exprese proteinu AGR2, který jednoznačně vykazuje prognosticky negativní vlastnosti, se tedy nabízí možnost volby vhodnější terapie, která by neindukovala zvýšenou expresi tohoto proteinu.

Tato práce byla podporována z prostředků MŠMT LC06035 a MZ0MOU2005.

VLIV INHIBITORŮ KINAS NA AKTIVACI PROTEINU p53 PŘI POŠKOZENÍ DNA

PAVLA HUBLAROVÁ, ROMAN HRSTKA, JITKA HOLČÁKOVÁ, TAMARA ŠMERDOVÁ, SOŇA BABČANOVÁ a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno hublarova@mou.cz

Protein p53 hraje významnou roli při odpovědi buňky na poškození DNA. Vyvolává zástavu buněčného cyklu indukcí exprese proteinu $p21^{Waf1}$ nebo spouští apoptózu aktivací p53 závislých genů *PUMA, NOXA* aj. Aktivní úlohu v těchto procesech mají kinasy ATM a ATR a jimi regulované kinasy Chk1 a Chk2, které fosforylují p53 především na serinech 15 nebo 20. Cílem našeho projektu bylo nalezení vhodných kombinací inhibitorů těchto kinas a DNA poškozujících látek, cisplatiny a doxorubicinu, které by u nádorových buněk přednostně vyvolávaly apoptózu a nesměřovaly buňky do zástavy buněčného cyklu, což je obecně považováno za možnou příčinu vzniku rezistence buněk k daným látkám.

Experiment byl prováděn na buněčných nádorových liniích exprimujících wild-type p53 protein: linii MCF-7 odvozené z karcinomu prsu a linii ARN8 odvozené z maligního melanomu. Buněčné linie byly ovlivňovány po dobu 16 hodin inhibitorem ATM/ATR (CGK733) v koncentraci 5 μM a inhibitorem Chk2 (2-(4-(4-chlorofenoxyfenyl)-1*H*)-benzimidazol-5-carboxamid) v koncentraci 10 μM. Inhibitory kinas byly aplikovány v kombinaci s 0,5 μM doxorubicinem a 10 μM cisplatinou. Hladiny vybraných proteinů byly analyzovány pomocí imunoblottingu a výsledky následně potvrzovány metodou real-time PCR na úrovní mRNA.

Při studiu šesti kombinací inhibitorů a cytostatik byly zaznamenány zásadní rozdíly při použití jednotlivých inhibitorů a linií. Inhibitory Chk2 i ATM/ATR v kombinaci s oběma cytostatiky způsobovaly snížení hladiny funkčního

p53 a současně i hladin jeho závislých proteinů ($p21^{Waf1}$, MDM2) v porovnání s účinky samotných cytostatik. Při analýze posttranslačních modifikací proteinu p53 vyvolaných námi použitými látkami bylo prokázáno, že fosforylace na serinech 15 a 392 proteinu p53 ve většině případů odrážejí expresi p53-regulovaných genů kódujících $p21^{Waf1}$ a MDM2. Vliv studovaných kinas na modulaci transkripční aktivity p53 byl ověřen analýzou hladin mRNA vybraných p53 regulovaných genů *$p21^{Waf1}$, MDM2, GADD45, PUMA, NOXA a BAX*. Byla potvrzena významná role funkčních kináz při regulaci transkripční aktivity p53 při poškození DNA.

Tato práce je podporována granty GA ČR 301/07/0490 a MŠMT LC06035.

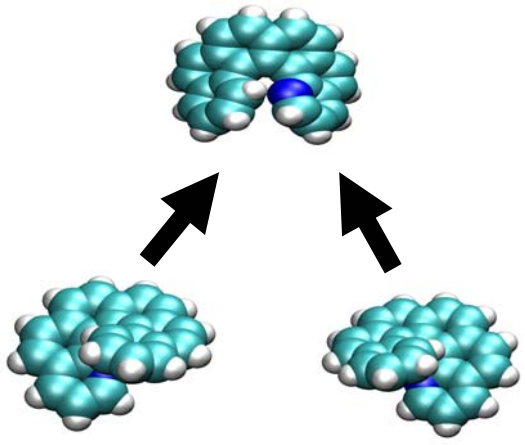
VLIV AZA-SUBSTITUCE NA STRUKTURU A ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI HELICENŮ

JANA CHOCHOLOUŠOVÁ, JAROSLAV VACEK, JIŘÍ MÍŠEK, IRENA G. STARÁ a IVO STARÝ

Ústav organické chemie a biochemie v.v.i., AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha

Heliceny přitahují pozornost díky svým zajímavým strukturním, spektrálním i fyzikálním vlastnostem. Tyto jejich vlastnosti byly již využity v enantioselektivní katalýze, samoskladbě a chirálním rozpoznávání.

V organické syntéze je velmi často důležité použití látek, které neracemizují při běžných reakčních podmínkách. Proto by bylo užitečné vědět, jaký vliv budou mít různé modifikace helicenového skeletu na racemizační bariéru dříve, než se pustíme do drahých a časově náročných experimentů.



Obr. 1. Přechod mezi (*M*) and (*P*) enantiomery 1-aza-[6]helicenu

Cílem této práce je poskytnout co nejpřesnější odhady racemizačních bariér pro skupinu aza-substituovaných helicenů[1] pomocí metod moderní počítačové chemie. Semiempirické a *ab initio* výpočty s malým počtem bázových funkcí, použité v dřívější studii[2] pro odhad racemizačních bariér helicenů a jejich metyl substituovaných analog poskytly cenné informace, ačkoliv souhlas s experimentálními daty byl spíše kvalitativní a ne kvantitativní. Vezmeme-li v úvahu rychlý vývoj v oblasti výpočetní techniky, domníváme se, že je možné dosáhnout přesnějších výsledků, provedeme-li výpočty na vyšší úrovni, které jsou v současné době dostupné i pro větší molekulární systémy.

Předvedeme výpočty racemizačních bariér a acidobazických vlastností helicenů a azahelicenů pomocí metody funkcionálu hustoty (DFT) s funkcionálem B3LYP a cc-pVTZ bází. Výsledky budou porovnány s dostupnými experimentálními daty

Grantová podpora: MŠMT (Centre for Biomolecules and Complex Molecular Systems, project LC512), Evropská komise (grant č. FP6-015847) a GA ČR (granty č. 203/06/1792 a 203/07/1664).

LITERATURA

1. Míšek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Císařová I., Vojtíšek P., Starý I.: Angew. Chem. Int. Ed., in press.
2. Janke R. H., Haufe G., Wurthwein E. U., Borkent J. H.: J. Am. Chem. Soc. *118*, 6031 (1996).

RŮZNÉ PŘÍSTUPY K PRODUKCI REKOMBINANTNÍHO LIDSKÉHO PEPTIDU S FARMAKOLOGICKÝM ÚČINKEM V BAKTERIÍCH *Escherichia coli*

ZUZANA CHRASTILOVÁ[a,b], MARTINA MACKOVÁ[a], VLADIMÍR KRÁL[a,b] a JOST LUDWIG[c,d]

[a] Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; [b] Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10; [c] Ústav fyzikální biologie, Jihočeská univerzita, Zámek 136, 373 33 Nové Hrady; [d] Universität Bonn, IZMB / MolekulareBioenergetik, Kirschallee 1, D-53115 Bonn
chrastiz@vscht.cz

Terapeuticky aktivní peptidy a proteiny (často nazývané jako biofarmaceutika či bioléčiva) reprezentují na trhu důležitou a rychle rostoucí skupinu léčiv. Biofarmaceutika zaujímají nezastupitelné místo pro léčbu řady onemocnění, v některých případech dokonce představují jedinou účinnou terapii. Významný podíl aplikací je v oblasti rakoviny, autoimunitních onemocnění, diabetes mellitus, anémie, nemocí spjatých s nahrazením chybného či chybějícího proteinu (např. lidského růstového hormonu) a dalších. Původně byly peptidy a proteiny s farmakologickým účinkem získávány z přírodních zdrojů, ale jejich produkce se postupně posunula k novým a efektivnějším biotechnologiím, jako jsou rekombinantní DNA technologie nebo hybridní technologie pro přípravu monoklonálních protilátek. Tyto nové techniky navíc umožňují úpravu

peptidů a proteinů „na míru“ tak, aby měly optimální farmakologické vlastnosti. Pro biotechnologickou produkci peptidů a proteinů s terapeutickým účinkem se nejčastěji využívají bakterie, kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky, rostlinné buňky a v poslední době se studuje i možnost využití transgenních rostlin a živočichů.

Cílem naší práce je připravit vhodný expresní systém pro produkci rekombinantního lidského peptidu, který může být použit pro farmaceutické účely. Obecně se produkce biologicky aktivních peptidů v bakteriích *Escherichia coli* bohužel setkává s nízkými výtěžky, a to především z důvodu intracelulární degradace peptidů a obtížné purifikace peptidů od kontaminujících proteinů. Ke zvýšení výtěžku ale může být využito několik metod. První metoda spočívá v použití fúzního proteinu, jako je např. glutathion-*S*-transferasa (GST), protein vázající maltosu (maltose binding protein, MBP) a další. Fúzní protein může být po úspěšné expresi oddělen od požadovaného peptidu proteolytickým štěpením díky specifické rozpoznávací sekvenci (často se používá např. enterokinasa nebo Faktor Xa). Další metoda reprezentuje tzv. genovou polymeraci, kdy je příslušný gen exprimován jako polymer a výsledný protein-polymer je následně štěpen na monomery. Poslední přístup zahrnuje expresi příslušného genu v bakteriálních kmenech, které vykazují nízkou proteolytickou aktivitu.

Připravili jsme několik expresních systémů využívající výše zmíněné přístupy s cílem zvýšit výtěžek produkce peptidů pomocí bakterií *Escherichia coli* – použití fúzního proteinu, metodu genové polymerace a využití speciálních bakteriálních kmenů vykazujících nízkou proteolytickou aktivitu. Po úspěšné expresi byl hodnocen výtěžek, aktivita, ale i schůdnost provedení jednotlivých postupů s cílem navrhnout optimální systém poskytující vysoké výtěžky.

Tato práce byla sponzorována grantem FRVŠ G4 1069/2008.

MIKROVLNNĚ PODPOROVANÉ ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ PROTEINŮ

FILIP KAFTAN[a], MILOSLAV ŠANDA[b] a JOSEF CVAČKA[b]

[a]*Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2;* [b]*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6*

Mikrovlnně podporované enzymatické štěpení (MAPED) je v současné době velice nadějným a rozšiřujícím se přístupem a alternativou ke klasickému enzymatickému štěpení proteinů. Využití mikrovlnného záření, jak ukazují výsledky publikovaných studií zabývajících se touto problematikou, skýtá celou řadu výhod v porovnaní s konvenčním přístupem, a to především významné zkrácení doby štěpení z klasických 8 hodin na 5-20 minut v závislosti na povaze experimentu, dále je to ve výsledku menší spotřeba enzymů a vzorků a na základě toho vyšší efektivita štěpení projevující se například (při analýze daného digestu prostřednictvím některého z uspořádání MS) lepším pokrytím sekvence štěpeného proteinu.

Mikrovlnné záření a jeho aplikace přitom není omezena pouze na samotnou proteolýzu, ale lze ho s úspěchem využít i v jednotlivých krocích elektroforetické separace a purifikace proteinů předcházející vlastní MAPED, a to například prostřednictvím gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Působením mikrovlnného záření se tedy konkrétně výrazně zkracují postupy redukce a alkylace vzorku proteinu, kdy je dokonce možné proces alkylace, vzhledem ke krátké době štěpení, zcela vynechat a tím i méně kontaminovat vzorek. Časově méně náročné jsou i kroky sorpce a desorpce barviva z gelu a stejně tak i finální extrakce vzniklých peptidů. Pro MAPED v gelu i roztoku je nejčastěji využívána karboxypeptidáza trypsin. Jednou z mnoha výhod trypsinu je fragmentace proteinu na peptidy o vhodné velikosti k následné MS analýze. Pouze výjimečně se pro MAPED používají proteasy jako Lys-C, Glu-C nebo α-chymotrypsin. Tato práce mapuje a optimalizuje podmínky MAPED pro Arg-C, Asp-N, Glu-C, Lys-C, chymotrypsin nebo pepsin. Optimalizace je prováděna na modelových proteinech jako je BSA, lysozym či ovalbumin a na reálných vzorcích proteinů.

MODULÁCIA METABOLIZMU FOSFOLIPIDOV POLYNENASÝTENÝMI MASTNÝMI KYSELINAMI V NÁDOROVEJ TERAPII

MARTIN KELLO, JAROMÍR MIKEŠ, RASTISLAV JENDŽELOVSKÝ, JÁN KOVAĽ a PETER FEDOROČKO

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach, Slovensko

Aj napriek tomu, že sa dosiahol značný pokrok v poznaní mechanizmov karcinogenézy a aj v samotnej liečbe, stále sa hľadajú nové prístupy v snahe zvýšiť terapeutický efekt a znížiť riziko liečebného zásahu. Preto sa súčasne s klasickými postupmi (chemo- a rádioterapia) hľadajú nové prístupy k liečbe a prevencii nádorového procesu. Fotodynamická a nutričná terapia nádorov sa ukazujú ako jedny z rozvíjateľných a perspektívnych prístupov do budúcnosti. Nedávny výskum ukázal, že zásah špecifickými mastnými kyselinami na nádorom postihnutý organizmus znižuje rast tohto nádoru, indukuje apoptózu v nádorových bunkách a zvyšuje odozvu nádoru na chemoterapeutiká, čo môže byť sľubným prínosom využiteľným v súčasnej onkológii.

Progresívnym protinádorovým prostriedkom poslednej doby je hypericín – fotodynamicky aktívna látka, vyskytujúca sa ako pigment v rastlinách rodu *Hypericum sp.*, ktorý stimuluje produkciu rôznych reaktívnych foriem kyslíka, a tie sú následne zodpovedné za poškodenie bunky. Takto indukované poškodenie končí, za určitých podmienok, apoptózou ako primárnou formou bunkovej smrti.

V našej štúdii sme sledovali vplyv exogénnych mastných kyselín na moduláciu fosfolipidového metabolizmu v kombinácii s fotodynamickou terapiou na rôznych bunkových líniách. Celkovo dochádza v sledovaných skupinách s kombinovanou terapiou k zvýšeniu citlivosti

nádorových buniek voči fotodynamickej terapii a nárastu počtu apoptických buniek.

Štúdia bola uskutočnená za podpory grantov APVV (20-003704) a VEGA (1/0240/08).

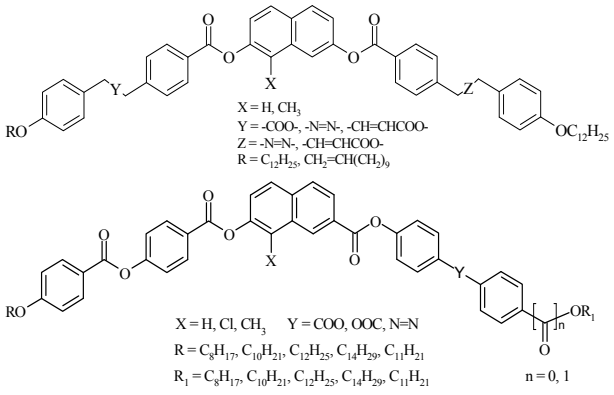
SYNTÉZA A STUDIUM VLIVU ORIENTACE A CHARAKTERU POLÁRNÍCH SPOJEK NA FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ

MICHAL KOHOUT[a], ADAM HENKE[a], JIŘÍ SVOBODA[a], VLADIMÍRA NOVOTNÁ[b] a MILADA GLOGAROVÁ[b]

[a]Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; [b]Fyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
michal.kohout@email.cz

Studium lomených kapalných krystalů stále patří mezi intenzivně se rozvíjející oblast materiálové chemie[1]. Cílem prezentované práce bylo připravit nové typy nesymetrických lomených kapalných krystalů (Obr. 1) a studovat jejich mesomorfní chování pomocí DSC, studiem textur a rentgenostrukturní analýzou a dále pak fotochemickou isomerizaci syntetizovaných derivátů.

Budou diskutovány rozdíly způsobené záměnou centrálního jádra, vliv substituce tohoto jádra, délky postranních řetězců a orientace esterových spojek na celkové změny v mesomorfním chování jednotlivých kapalných krystalů v připravených sériích nových látek. Bude diskutována možnost využití reverzibilního „přepínání“ mezi jednotlivými isomery v oblasti molekulárních přepínačů a vliv zastoupení jednotlivých isomerů na mesomorfní chování.



Obr. 1

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM 6046137301 a OC176) a vnitřním granetem VŠCHT Praha 0015110.

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weisslog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. *13*, 2104 (2003).

DETEKCE SNP ASOCIOVANÝCH S IBD – GENETICKÝ ZÁKLAD PREVALENCE ONEMOCNĚNÍ, BEZPEČNOSTI A EFEKTIVITY FARMAKOTERAPIE

MICHAL KOLORZ[a], LADISLAVA BARTOŠOVÁ[a]*, JAN HOŠEK[b] a MILAN BARTOŠ[b]

[a] Ústav humánní farmakologie a toxikologie, [b] Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity, Brno 612 42, Palackého 1-3
bartosoval@vfu.cz

Mezi nespecifické střevní záněty (IBD) patří Crohnova choroba (CD) a ulcerozní kolitida (UC). Onemocnění jsou chronická s dosud neznámou etiologií, a proto chybí i kauzální terapie. Cílem farmakoterapie je zastavit akutní průběh choroby a udržovat remisi příznaků. Vznik onemocnění je podmíněn souhrou genetických predispozic a faktorů prostředí. Mezi geny uváděné v souvislosti s CD a UC patří ICAM-1, NOD2, CCR5 (cit.[1,2]). Vedle toho, řada tzv. „terapeutických“ genů ovlivňuje efektivitu farmakoterapie IBD. Jeden z nich kóduje thiopurin-*S*-methyltransferasu (TMPT), která inaktivuje imunosupresivně působící azathioprin (AZA). Polymorfismy v genu pro TMPT mají odezvu ve struktuře enzymu, což ovlivňuje jeho aktivitu[3]. Zejména substituce G238C, G460A a A719G jsou spojeny s výskytem vážných nežádoucích účinků terapie AZA - leukopenie. Aktivita mutantního enzymu je několikanásobně menší v porovnání se standardním proteinem. U pacientů nesoucích mutantní formy enzymu se akumulují aktivní metabolity AZA, které působí toxicky[4]. Z tohoto důvodu je u těchto jedinců potřeba optimalizovat léčebnou dávku s přihlédnutím k aktivitě enzymu. Dalším polymorfismem, u kterého je popsán vztah k bezpečnosti terapie imunosupresivy [AZA a methotrexátem (MTX)], je gen pro enzym methylentetrahydrofolátreduktasu (MTHFR)[5]. Tento enzym se podílí na udržování buněčné zásoby folátů potřebných pro syntézu nukleotidů a také buněčných mechanismů reparace DNA. Nukleotidové substituce C677T a také A1298C vedou ke snížení aktivity enzymu, což se projeví relativní vyšší účinností imunosupresiv[6]. Detekce přítomnosti mutací v terapeutických genech jsou vodítkem pro optimalizaci farmakoterapie a důležitým determinantem účinnosti a bezpečnosti léčby.

V této práci byla sledována souvislost mezi genetickými polymorfismy metabolických enzymů TPMT a MTHFR a výskytem nežádoucích účinků po podání AZA a MTX. Pro stanovení přítomnosti mutantních alel byly použity metody PCR-REA a real-time PCR. Výsledky byly vyhodnoceny $\chi 2$–testem.

V souboru bylo celkem 25 pacientů, kterým byl podáván AZA. Z těchto pacientů 10 projevovalo intoleranci po podání tohoto léčiva (leukopenie). Dva pacienti s leukopenií byli heterozygotní, jeden pro mutantní alelu TPMT*3B, druhý pro alelu TPMT*3A. Mezi pacienty s normální reakcí (n=15) nebyla nalezena žádná z mutantních alel. Prokázali jsme statistickou závislost mezi přítomností mutantního genu TPMT a výskytem leukopenie po podání AZA (P=0,0437). Mutace genu pro MTHFR se vyskytovaly u 8 jedinců s intolerancí na AZA. Jejich výskyt nebyl statisticky významný v porovnání s výskytem u pacientů s normální reakcí na léčivo. V souboru bylo také 10 pacientů, kterým byl podáván MTX. U dvou z nich byla popsána rezistence na léčivo, žádný neprojevoval známky intolerance a to i přesto, že v souboru se vyskytovali jedinci hetero- i homozygotní pro mutantní alelu MTHFR C677T i A1298C. Prokázali jsme statisticky významnou závislost mezi výskytem nežádoucích účinků farmakoterapie AZA a mutantním genotypem v genu pro enzymy TPMT. Naše studie neprokázala souvislost mezi polymorfismy v genu pro MTHFR a bezpečností farmakoterapie AZA a MTX. V této studii ovšem nebyly zohledněny některé faktory jako například současné podávání salicylátů, příjem folátů z potravy apod.[3,6].

Vztah účinnosti a bezpečnosti farmakoterapie a výskytu polymorfismů v genech pro enzymy metabolizující léčiva je značně komplikovaný. I když řada studií prokázala vliv mutantního genu na hladinu aktivní látky, z klinických dat vyplývá, že kromě závislosti genotyp/fenotyp se zde uplatňuje řada dalších faktorů, které mohou vliv genetického defektu vyvážit.

LITERATURA

1. Yamamoto-Furusho J. K.: World J. Gastroenterol. *13*, 5594 (2007).
2. Hošek J., Bartošová L., Svobodová J., Vechetová E., Kolorz M., Loučka P., Bartoš M.: Chem Listy *101*, 438 (2007).
3. Shufeng Z.: Current Clinical Pharmacology *1*, 119 (2006).
4. Relling M. V., Hancock M. L., Rivera G. K., Sandlund J. T., Ribeiro R. C., Krynetski E. Y., Pui C.-H., Evans W. E.: J. Natl Cancer Inst. *1999,* 91.
5. Stocco G., Martelossi S., Sartor F., Toffoli G., Lionetti P., Barabino A., Fontana M., Decorti G., Bartoli F., Giraldi T., Ventura A.: Dig. Dis. Sci. *51*, 474 (2006).
6. Ueland P. M.: Trends Pharm. Sci. *22*, 195 (2001).

ANTIOXIDAČNÍ MECHANISMY *Brassica napus* PŘI OBRANNÝCH REAKCÍCH K *Leptosphaeria maculans*

BARBORA KORBELOVÁ[a,b], JÓZSEF FODOR[c], LENKA BURKETOVÁ[a] a OLGA VALENTOVÁ[b]

[a] Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6; [b] Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 160 00 Praha 6; [c] Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Science, Budapest 1022, Herman Ottó út 15, Maďarsko
korbelova@ueb.cas.cz

Cílem této práce je studium antioxidačních mechanismů *Brassica napus* při obranných reakcích k houbovému patogenu *Leptosphaeria maculans*. *L. maculans* způsobující fomovou hnilobu je nejzávažnější a nejrozšířenější patogen rostlin rodu Brassica, zejména *B. napus* a *B. rapa*. Vzhledem k možným vlastním antioxidačním mechanismům patogena je v této práci použit elicitor izolovaný z virulentního izolátu *L. maculans*. Jako elicitor byl vybrán nativní filtrát média dle Friese po kultivaci *L. maculans*. Elicitor je infiltrován do děložních listů pomocí injekční stříkačky. Po ošetření rostlin elicitorem dochází k nárůstu aktivity NADPHoxidasy, která produkuje superoxidový radikál. Následně dochází v buňce k nárůstu reaktivních forem kyslíku (ROS), které je nutno dále regulovat. Nejdůležitější regulační antioxidační mechanismy jsou enzymatická regulace ROS a neenzymatická regulace ROS. Mezi důležité antioxidační enzymy patří katalasa, guajakol dependentní peroxidasa, askorbátperoxidasa a glutathionreduktasa. Aktivita těchto enzymů je stanovena spektrofotometrickou metodou sledující nárůst produktu nebo pokles substrátu. Výsledky dokazují úlohu guajakol dependentní peroxidasy, askorbátperoxidasy a glutathionreduktasy v obraně *B. napus* a význam katalasy především v momentě prvního kontaktu rostliny s elicitorem. Další, neenzymatický antioxidační mechanismus, je poměr oxidované a redukované formy kyseliny askorbové a glutathionu. Hladina kyseliny askorbové je stanovena pomocí enzymu askorbátoxidasy a hladina glutathionu je stanovena pomocí glutathionreduktasy. V rostlinách ošetřených elicitorem dochází ke změně poměrů oxidované a redukované formy kyseliny askorbové a glutathionu. Elicitor odvozený z *L. maculans* indukuje akumulaci ROS a aktivaci antioxidačních mechanismů v děložních listech *B. napus*.

Tato práce je podporována granty MŠMT ME 928 a GA ČR 522/08/1581.

PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*

V. KOTRBOVÁ[a], M. MOSEROVÁ[a], E. FREI[b], and M. STIBOROVÁ[a]

[a]Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; [b]Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg, BRD
verakotrbova@centrum.cz

Ellipticine is an alkaloid exhibiting significant antineoplastic activities. It is used in therapy of breast cancer and leukemia. Ellipticine forms covalent DNA adducts mediated by cytochromes P450 (CYPs) and peroxidases. We evaluated the role of hepatic and extra-hepatic metabolism of ellipticine, using the HRN (***H***epatic Cytochrome P450 ***R***eductase ***N***ull) mouse model, in which NADPH:CYP

reductase is deleted in hepatocytes, resulting in the loss of essentially all hepatic CYP functions.

The DNA adduct pattern generated by ellipticine in mice *in vivo* consisted of at least two adducts formed from 13-OH- and 12-OH-ellipticine. The highest total DNA adduct levels were found in the liver. Ellipticine-DNA adduct levels in the liver of HRN mice were up to 65% lower relative to WT mice. The ratios of ellipticine-DNA adducts in extra-hepatic organs between HRN and WT mice of up to 4.7 suggest that these organs can activate ellipticine and that more ellipticine is available in the circulation. When hepatic microsomes of both mouse strains were incubated with ellipticine, ellipticine-DNA adduct levels with WT microsomes were of up to 2.9-fold higher than those from HRN mice. The levels of individual metabolites formed by hepatic microsomes from both mouse lines were different; 9-OH-ellipticine levels were only one sixth, while the amounts of 13-OH- and 12-OH-ellipticine, were about one half in incubations with HRN microsomes compared with the levels in incubations with WT microsomes. The results found *in vitro* and *in vivo* demonstrate that both CYP1A or 3A and peroxidases participate in activation of ellipticine to reactive species forming DNA adducts in the mouse model used in this study.

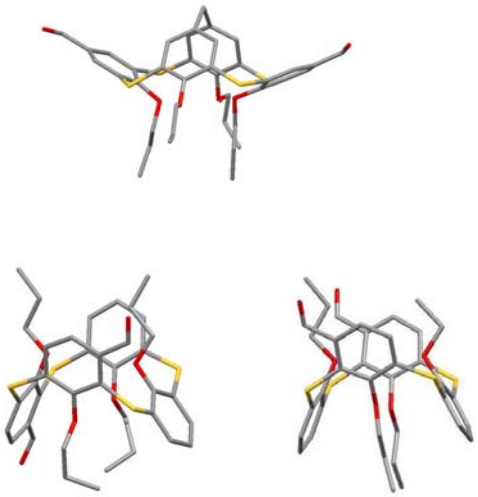
Supported by the GACR (grants 203/06/0329 and 303/06/0928 and the Czech Ministry of Education (grants MSM 0021620808 and 1M4635608802 – Center of targeted therapeutics).

FORMYLACE DERIVÁTŮ (THIA)CALIX[4]ARENŮ

ONDŘEJ KUNDRÁT[a], HANA DVOŘÁKOVÁ[b], VÁCLAV EIGNER[c], MICHAELA POJAROVÁ[c], IVANA CÍSAŘOVÁ[d], JAN BUDKA[a], IVAN STIBOR[a] a PAVEL LHOTÁK[a]

[a]Ústav organické chemie,[b] Laboratoř NMR spetroskopie, [c] Ústav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; [d] Katedra anorganické chemie, PřF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
kundrato@vscht.cz.

Thiacalix[4]areny substituované na horním okraji aldehydickými skupinami mohou sloužit jako cenné syntetické intermediáty při designu a syntéze složitějších supramolekulárních struktur. Tetraformyl-tetrapropoxythiacalixaren byl připraven reakcí odpovídajícího tetrabromderivátu s *terc*-BuLi v THF (-78 °C) a následné reakci s *N*-formylpiperidinem. Bohužel, tento postup nelze použít pro přípravu diformyl-dipropoxyderivátů. Protože přímá formylace skeletu thiacalixarenu nebyla dosud popsána, zaměřili jsme se na tento druh transformací. Byl proveden systematický výzkum přímé formylace thiacalix[4]arenu a jeho dipropoxy- a tetrapropoxyderivátů immobilizovaných ve třech konformacích, a to kónické, částečně kónické a 1,3-alternující. V závislosti na konformaci výchozího thiacalixarenu byla získána řada unikátních formylderivátů. Vůbec poprvé byly syntetizovány deriváty s aldehydickými skupinami v *meta*-polohách a také zcela výjimečný thiacalixaren, přemostěný methylenovou spojkou. Výsledky různých přímých formylačních metod jako Vilsmeier-Haackova ($PhN(CH_3)CHO$, $POCl_3$), Duffova (urotropin, TFA) nebo Grossova metoda (Cl_2CHOCH_3, $SnCl_4$ nebo $TiCl_4$) budou diskutovány. Výsledky těchto reakcí v calixarenové chemii poskytují výhradně jen *para*-substituované aldehydy.



Tento výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (grant 104/07/1242).

LITERATURA

1. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S.: Chem. Rev. *106*, 5291 (2006).
2. Lhotak P.: Eur. J. Org. Chem. *2004*, 1675.
3. Himl M., Pojarova M., Stibor I., Sykora J., Lhotak P.: Tetrahedron Lett. *46*, 461 (2005).

FERROCENOVÉ DIFOSFINY S PLANÁRNÍ CHIRALITOU – LIGANDY PRO ENANTIOSELEKTIVNÍ KATALÝZU

MARTIN LAMAČ, IVANA CÍSAŘOVÁ a PETR ŠTĚPNIČKA*

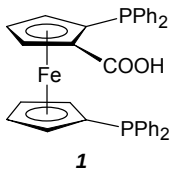
Univerzita Karlova v Praze, PřF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2;
lamac@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz

V minulosti jsme popsali přípravu některých nových ferrocenových fosfinkarboxylových kyselin a jejich amidů, které se vyznačovaly přítomností planární a centrální chirality v molekule. Potenciál těchto nových sloučenin jako ligandů pro asymetrickou homogenní katalýzu byl demonstrován v palladiem katalyzované enantioselektivní

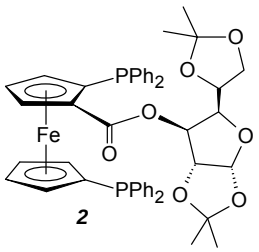
allylové alkylaci, při které bylo dosaženo enantiomerních přebytků až 90 % (cit.[1,2]).

Dalším krokem v objasňování role jednotlivých prvků chirality a jejich vzájemného spolupůsobení ve vztahu ke katalytickým procesům je nyní příprava fosfinkarboxylových kyselin odvozených od dobře známého[3] 1,1'-bis(difenylfosfino)-ferrocenu, dppf. První derivát tohoto typu, kyselina ***1***, byla připravena (ve formě racemické směsi) z 1,1'-dibromferrocenu a následně rozdělena na enantiomery převedením na příslušný ester ***2*** s chirálním cukerným derivátem (diaceton-D-glukosou) a následnou chromatografickou separací diastereomerů.

Naše současná práce je zaměřena na zkoumání koordinačních vlastností racemického i opticky čistého ligandu (se zaměřením na komplexy palladnaté) a především na katalytické testy chirálních látek v enantioselektivní allylové alkylaci.



1



2

Tato práce je součástí projektů MŠMT ČR (LC06070 a MSM0021620857).

LITERATURA

1. Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. *2007*, 2274.
2. Lamač M., Tauchman, J., Císařová I., Štěpnička P.: Organometallics *26*, 5042 (2007).
3. Přehled chemie ligandu dppf viz: Gan K.-S., Hor T.S.A., in: *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*, Chap. 1, p. 3 (Togni A., Hayashi T., Eds.) VCH, Weinheim 1995.

VLIV MURAMYLDIPEPTIDU A LIPOPOLYSACHARIDU NA APOPTÓZU A EXPRESI CD14 BOVINNÍCH NEUTROFILŮ MLÉČNÉ ŽLÁZY *IN VITRO*

TEREZA LANGROVÁ[a,b], PETR SLÁMA[a,b], MONIKA ZOUHAROVÁ[a], ZBYŠEK SLÁDEK[a,b] a DUŠAN RYŠÁNEK[a]

[a]Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00, Brno; [b]Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno
xlangrov@node.mendelu.cz

Lipopolysacharid (LPS), složka buněčné stěny G- bakterií a muramyldipeptid (MDP), nejmenší strukturální jednotka peptidoglykanu převážně G+ bakterií, mají schopnost vyvolat ve tkáni zánětlivou odpověď. Funkcí neutrofilních granulocytů (neutrofilů) je eliminace patogenních mikroorganismů během iniciální fáze akutního zánětu, kdy dochází k migraci těchto buněk z krve do postižené tkáně. Pro zachování homeostázy orgánu je nutná rezoluce, tedy ukončení zánětu. Proto podstupují neutrofily programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Apoptóza představuje fyziologický způsob zániku buňky, který je geneticky řízen, omezuje poškození zanícené tkáně a podporuje rezoluci zánětu. Rezoluce se realizuje fagocytózou apoptotických buněk makrofágy, tím se zabrání uvolňování histotoxického obsahu granulí mimo buňky. Prvním krokem eliminace apoptotických neutrofilů je jejich identifikace makrofágy. Pro rozpoznání apoptotických neutrofilů makrofágy jsou důležité biochemické změny probíhající na povrchu cytoplazmatické membrány buněk. Při studiu receptoru CD14 během zánětlivé odpovědi mléčné žlázy byl vysloven předpoklad o jeho aktivní účasti v rezoluci zánětu, zejména o úloze CD14 jako tzv. *eat me* signálu pro rozpoznání apoptotických neutrofilů makrofágy.

Cílem této studie bylo prokázat, do jaké míry se bakteriální činitelé vyvolávající zánětlivou odpověď podílejí na ovlivnění exprese CD14 na neutrofilech a na jejich životnosti.

Neutrofily byly získány laváží mléčné žlázy během zánětlivé odpovědi. Laváže mléčné žlázy byly po zpracování inkubovány s MDP a LPS. Podíly apoptotických neutrofilů a podíly CD14+ neutrofilů pak byly detegovány průtokovou cytometrií po 30, 60, 120 a 300 minutách inkubace.

Během inkubace suspenze buněk docházelo k nárůstu podílu apoptotických neutrofilů. Jejich kultivace s MDP a LPS byla charakterizována pozvolnějším zvyšováním podílu apoptotických neutrofilů oproti kontrole.

Podíl CD14+ neutrofilů u kontroly se udržoval po sledovanou dobu na přibližně stejné úrovni. Po 30 minutách inkubace buněk s MDP byl podíl CD14+ neutrofilů oproti kontrole statisticky významně vyšší ($P<0,01$), po 120 minutách inkubace buněk s MDP byl tento podíl opět statisticky významně vyšší ($P<0,05$). Po inkubaci s LPS nebyly podíly CD14+ neutrofilů oproti kontrole statisticky významně odlišné. LPS je v předešlých studiích popsán jako činitel s vyšším potenciálem moderovat významné biologické vlastnosti neutrofilů. Toto zjištění je proto překvapující a nemáme dosud uspokojivé vysvětlení pro vyšší podíly CD14+ neutrofilů po inkubaci s MDP. Proto by měla být i nadále vlivu MDP a LPS na expresi CD14 věnována pozornost.

Porovnání podílů CD14+ neutrofilů během inkubace s MDP a LPS ukázalo, že exprese CD14 neutrofilů mléčné žlázy skotu je během inkubace s MDP časnější. Úloha receptoru CD14 během zánětlivé odpovědi je nezanedbatelná a bude nutné v jeho studiu pokračovat.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

MULTIPLE DEFECTS IN NEGATIVE REGULATION OF PKB/AKT PATHWAY SENSITIZE CANCER CELLS TO ANTI PROLIFERATIVE EFFECT OF NON STEROIDAL ANTI INFLAMMATORY DRUGS

E. LINCOVÁ[a,b], K. SOUČEK[a], A. STARŠÍCHOVÁ[a,b], Z. PERNICOVÁ[a,b], A. HAMPL[b], and A. KOZUBÍK[a,b]

[a]Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics AS CR, Brno; [b]Masaryk University, Brno

Antitumorigenic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in prostate and colon cancer are well established. However, mechanisms driving these processes are not known in all details. It has been shown that some effects of NSAIDs are independent of inhibition of cyclooxygenase activity. Finding new biomolecular mechanisms associated with effects of NSAIDs will potentially lead to novel chemoprevention and treatment strategies.

The PKB/Akt pathway, promoting cellular transformation and survival, is frequently hyperactivated in human cancer. Studies investigating anti-cancer effects of NSAIDs have shown modulation of the PKB/Akt pathway. The inositoltrisphosphate phosphatases PTEN and SHIP2 are critical enzymes in the negative control of PKB/Akt.

In our study, we observed significant differences in sensitivity of prostate and colon cancer cell lines to antiproliferative effects of NSAIDs. PTEN and SHIP2 negative LNCaP cells were the most sensitive to these effects, as assessed by analysing the cell cycle profile and expression of regulating proteins. Knockdown of SHIP2 in PTEN negative cell lines resulted in higher sensitivity to antiproliferative effects of NSAIDs. Our data suggest that multiple defects in negative regulation of PKB/Akt pathway may contribute to increased sensitivity to antiproliferative effects of widely used drugs.

This work was supported by grant No. 204/07/0834 of Czech Science Foundation and by the Research Plan AVOZ50040507 of AS CR.

STRUKTURNĚ-AKTIVNÍ STUDIE FRAGMENTŮ PEPTIDU „COCAINE – AND AMPHETAMINE REGULATED TRANSCRIPT“

JANA MAIXNEROVÁ[a,b], DARJA BLOKEŠOVÁ[a], BLANKA ŽELEZNÁ[a] a LENKA MALETÍNSKÁ[a]

[a]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; [b]1. Lékařská fakulta Univerzita Karlova, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2 maixnerova@uochb.cas.cz

Peptid CART (cocaine-and-amphetamine-regulated transcript) je peptidový neurotransmiter ovlivňující příjem potravy, sytost, stres, endokrinní regulace a jiné fyziologické procesy. Byl objeven před více než 10 lety, ale dosud se nepodařilo identifikovat a izolovat receptor. V současné době jsme publikovali specifickou vazbu ^{125}I-CART(61-102) k feochromocytomálním buňkám PC12, nediferencovaným, diferencovaným na neurony pomocí nervového růstového faktoru a k buněčným membránám PC12 (cit.[1]). V naší studii jsme prováděli kompetitivní vazebné experimenty s peptidy CART(61-102), CART(55-102) a di-jodovaným CART(61-102). Všechny tyto peptidy se vázaly k diferencovaným buňkám PC12 s vyšší afinitou než k nediferencovaným buňkám PC12 a to v nízkém nM rozmezí[1].

Dále byly syntetizovány fragmenty peptidu CART tak, aby odpovídaly strukturálním smyčkám mezi cysteiny CART(61-102). Bylo testováno 14 fragmentů peptidu CART, jejich vazebné afinity k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 byly[2] v rozmezí 10^{-5} – 10^{-4} M.

Po intracerebrovetrikulárním podání hladovým myším tyto fragmenty neinhibovaly příjem potravy ani při dávce 4 nmol/myš. Naše výsledky ukazují, že kompaktní struktura tří disulfidických můstků je nezbytná pro zachování biologické aktivity peptidu CART.

Tato práce je podporována grantem 303/05/0614 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

1. Maletínská L., Maixnerová J., Matysková R., Haugvicová R., Sloncová E., Elbert T., Slaninová J., Zelezná B.: Eur. J. Pharmacol *559*, 109 (2007).
2. Maixnerová J., Hlaváček J., Blokesová D., Kowalczyk W., Elbert T., Sanda M., Blechová M., Železná B., Slaninová J., Maletínská L.: Peptides *28*, 1945 (2007).

ROLE OF Srs2 And Mus81/MMS4 IN PROCESSING RECOMBINATION/REPLICATION INTERMEDIATES

PETRA MATULOVÁ, VERONIKA ALTMANNOVÁ, VICTORIA MARINI, and LUMÍR KREJČÍ

Laboratory of recombination and DNA repair, NCBR, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno matulova@chemi.muni.cz

Homologous recombination (HR) is a process widespread in nature and essential to maintain the integrity of the genome via repair of DNA double-strand breaks (DSBs).
Several models were proposed to understand the mechanism of double-strand break repair by HR, identify separate steps and role of the individual proteins involved.

The Mus81/MMS4 complex is a DNA structure-specific endonuclease involved in replication fork stability and DNA repair. It seems from genetic experiments that Mus81/MMS4 could interact with Srs2, a helicase which on one hand prevents untimely recombination and on the other hand is necessary for certain pathways of homologous recombination.

In our study, we confirmed the interaction between Mus81/MMS4 and Srs2. We then analyzed the stimulation of Mus81/MMS4 nuclease activity by Srs2 and we found out that this stimulation depends on the DNA subtrate involved

in the reaction. Our experiments also indicate that the interaction between Mus81/MMS4 and Srs2 is specific.

REFERENCE
1. Fabre F., Chan A., Heyer W. D., Gangloff S.: Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. *99*, 16887 (2002).

PŘÍPRAVA TRANSGENNÍHO LNU PRO FYTOREMEDIACI TĚŽKÝCH KOVŮ

JITKA NAJMANOVÁ[a,b], PAVEL KOTRBA[a], MARTINA MACKOVÁ[a,b] a TOMÁŠ MACEK[b,a]

[a]Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6; [b]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
najmanoj@vscht.cz

Znečištění půd a vod těžkými kovy, způsobeno převážne těžbou a spalováním fosilních paliv, je významný ekologický problém. Rostliny mohou být využity pro odstranění těžkých kovů jejich akumulací, stabilizací či chemickou přeměnou v procesu zvaném fytoremediace. Rostliny disponují několika obrannými mechanismy, které jim umožňují vypořádat se se stresem způsobeným těžkými kovy. Jeden z těchto mechanismů zahrnuje produkci neproteinových thiolů s vysokým obsahem cysteinu (NPTs), které jsou schopné navázat vysoké množství kovů a polokovů. Při obraně rostlin proti ohrožení z okolního prostředí hraje důležitou roli glutathion (GSH). Glutathion, nejen že tvoří substrát pro glutathion-*S*-transferasu, zajišťující neutralizaci potenciálné toxických xenobiotik[1], ale je také reduktantem pro dehydroaskorbát[2]. Kromě toho je glutathion prekursorem fytochelatinů (PCs), peptidů, které vazbou s těžkými kovy pomáhají rostlině tolerovat a ukládat pro ni vysoce toxické, těžké kovy. Glutathion je syntetizován z jednotlivých aminokyselin ve dvou, po sobě jdoucích, ATP-dependentních reakcích. γ-glutamylcysteinsynthetasa (γ-ECS) katalyzuje tvorbu γ-glutamylcysteinu z cysteinu a glutamátu a glutationsynthetasa (GS) připojení glycinu na výsledný produkt glutathion. Aktivita γ-ECS je regulována zpětnou vazbou glutathionu a je závislá na dostupnosti cysteinu, proto je reakce, katalyzovaná tímto enzymem, považována za limitující krok při absenci těžkých kovů. V přítomnosti těžkých kovů však regulace syntézy GSH zaznamenává výrazné změny. Kadmium podporuje transkripci genu pro γ-ECS a zároveň deaktivuje GS. Z toho plyne, že v přítomnosti Cd se může stát limitujícím krokem syntézy glutathionu a PCs reakce katalyzována GS.

Z výsledků předchozích studií se zdá být pravděpodobné, že se za podmínek stresu na regulaci podílí jak γ-ECS tak GS[3]. Cíl naší studie je exprimovat geny *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 pro γ-ECS a GSH2 pro GS ve lnu (*Linum usitatissimum*), který je jednoletou technickou rostlinou široce pěstovanou v mírném klimatickém pásmu, abychom získali rostlinu schopnou akumulovat kadmium a zároveň odolávat vyšším koncentracím Cd.

Kódující sekvence γ-ECS (GSH1) a GS (GSH2) byly klonovány z chromosomální DNA kvasinky *S. cerevisiae* W303 pomocí PCR, vloženy do plasmidu Impact Vector 1.1, a nukleotidová sekvence vložených fragmentů byla ověřena sekvenací DNA. Vložené geny jsou ve výsledných plasmidech pIV1 and pIV2 ohraničeny Rubisco-promotorem (RbcS) z *Asteraceous chrysanthemum* a na 3′-konci RbcS-terminátorem transkripce. Obě transkripční jednotky budou dále klonovány do T-DNA agrobakteriálního plasmidu pro přenos do *L. usitatissimum*.

Autoři děkují grantové podpoře MŠMT 1M06030 a FRVŠ G4 1157/2008.

LITERATURA
1 Marrs K.: Plant Mol. Biol. *47*, 127 (1996).
2. Foyer C. H., Haliwell B.: Planta *133*, 21 (1976).
3. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A., Weber S. U., Jouanin L., Terry N.: Plant Physiol. *121*, 1169 (1999).

VÝVOJ A BIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE CYTOKININOVÝCH ANTAGONISTŮ PŮSOBÍCÍCH NA RECEPTOROVÉ ÚROVNI

JAROSLAV NISLER, LUKÁŠ SPÍCHAL a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a ÚEB AVČR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc
jaroslav.nisler@worldonline.cz

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které mají zásadní význam pro vývoj a růst rostlin. V naší laboratoři byly připraveny nové cytokininové analogy, které kompetují s přirozenými cytokininy ve vazebném místě jejich receptorů a inhibují *in vivo* efekt cytokininů. Tyto látky neaktivují cytokininovou signální dráhu a nevykazují vlastní cytokininovou aktivitu v klasických cytokininových biotestech. Nové anticytokininy testujeme pomocí rovnovážné dialýzy ve vazebném testu s transgenním kmenem *E. coli,* který exprimuje cytokininové receptory AHK3 a AHK4 (cit.[1]), dvou ze tří známých cytokininových receptorů *Arabidospsis thaliana*[2]. Inhibice vnímání cytokininů je ověřována v *in vivo* testech s transgenními semenáčky *Arabidopsis,* které obsahují reportérový gen P_{ARR5}*::GUS* (cit.[3]). Anticytokininový efekt připravených látek byl testován také v klasických cytokininových biotestech (kalusový test, amarantový test a senescenční test s listy pšenice). Pozorovali jsme i zajímavé účinky na vývoj rostlin *Arabidopsis*, jako je např. stimulace růstu postranních kořenů nebo zkracování doby klíčení. Výsledky naznačují, že tyto látky by mohly najít využití jako modulátory endogenní hladiny cytokininů při studiu jejich fyziologických funkcí nebo také jako růstové regulátory se zajímavými zemědělskými aplikacemi. Naše laboratoř se dále zabývá vývojem nových cytokininových antagonistů s cílem dosáhnout vylepšených *in vivo* účinků.

Podpořeno granty MSM 6198959216, GA ČR 522/07/P197.

LITERATURA
1. Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T.: Plant Cell Physiol. *2004,* 1299.

2. Kakimoto T.: Annu. Rev. Plant. Biol. *2001*, 605.
3. Romanov G. A., Kieber J. J., Schmülling T.: FEBS Lett. *2002*, 39.

STUDIUM KOMPLEXACÍ A SAMOSKLADBY AMIDŮ A AMINŮ ODVOZENÝCH OD ŽLUČOVÝCH A STEROIDNÍCH KYSELIN

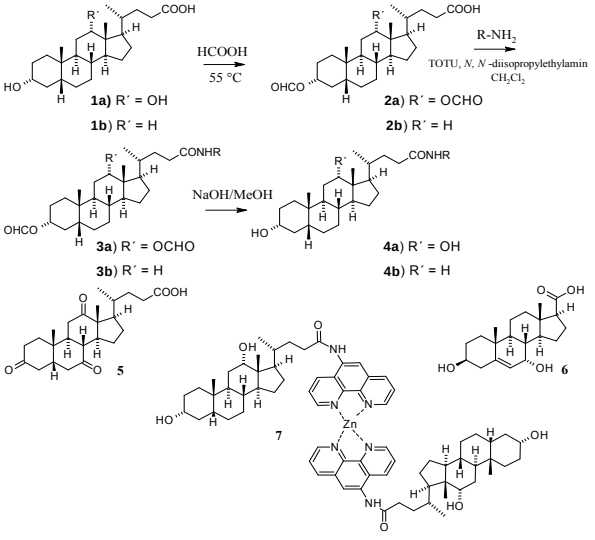
ZDENA NOVÁKOVÁ, BEATA JONSZTOVÁ a PAVEL DRAŠAR

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
zdena.novakova@vscht.cz

Je známa schopnost žlučových kyselin, zejména substituovaných aromatickými donory, vytvářet gely z organických rozpouštědel a supramolekulární asociáty[1,2].

Cílem práce je syntéza amidů žlučových kyselin a jejich následné testování na potenciální gelační a agregační schopnosti. Popsaná příprava[1] byla optimalizována využitím kondenzačního činidla TOTU[3]. Reakce vycházejí z kyselin lithocholové **1b** a deoxycholové **1a**. Reakcí chráněných kyselin **2a, 2b** s aminy byly získány amidy **3a, 3b**, které byly odchráněny za vzniku hydroxylovaných amidů **4a, 4b**. Analogické reakce byly prováděny i s kyselinou dehydrocholovou **5** a etienovou **6.**

Získané konjugáty jsou postupně testovány na potenciální samoskladné, gelotvorné vlastnosti a komplexaci s kovy (zinek, měď aj., cf. **7**) m.j. pomocí UV/VIS, RLS, CD, IČ spektroskopie[4]. Dále je zkoumána možnost redukce amidové vazby[5] pomocí různých činidel ($[(CH_3OCH_2CH_2O)_2AlH_2]Na$, $LiAlH_4$, BH_3) a vlastnosti získaných aminů.



Práce byla podporována projekty MŠMT MSM6046137305, 1P04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt a GA ČR 203/06/0006 a grantem NATO CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Dukh M., Šaman D., Kroulík J., Černý I., Pouzar V., Král V., Drašar P.: Tetrahedron *59*, 4069 (2003).
2. Virtanen E., Kolehmainen E.: Eur. J. Org. Chem. *16*, 3385 (2004).
3. Ghoussoub A., Lehn J. M.: Chem. Commun. *2005*, 5763.
4. Štěpánek P., Dukh M., Šaman D., Moravcová J., Kniežo L., Monti D., Venanzi M., Mancini G., Drašar P.: Org. Biomol. Chem. *5*, 960 (2007).
5. Pistia G.: Carb. Res. *328*, 467 (2000).

CÍLENÉ ZABÍJENÍ RAKOVINNÝCH BUNĚK S PORUCHAMI V OPRAVĚ POŠKOZENÉ DNA POMOCÍ INHIBICE PARP-1

L. OPLUŠTILOVÁ[a], M. MISTRÍK[a] a J. BÁRTEK[a,b]

[a]Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a Institut exprerimentální botaniky, Šechtitelů 11, 783 71 Olomouc; [b]Dánská společnost boje proti rakovině, Institut biologie rakoviny, Strandboulevarden 49, 2100 Kodaň, Dánsko

Defekty v procesech opravy poškozené DNA jsou častým znakem různých typů rakovin. Zasažení zbývajících, stále funkčních drah, na nichž je oprava DNA závislá, představuje strategii pro selektivní zabíjení takových buněk. Inhibice poly(ADP-ribosa)polymerasy-1 (PARP-1), klíčového enzymu opravy jednořetězcových zlomů DNA, zabraňuje úspěšné opravě takových lézí. V průběhu buněčného cyklu jsou jednořetězcové zlomy převedeny na dvouřetězcové zlomy DNA. Buňky, které nejsou schopny vypořádat se s akumulovaným genotoxickým stresem, jsou odsouzeny k zastavení buněčného cyklu a apoptóze.

Cílem naší práce bylo otestovat genotypově různé rakovinné linie tlustého střeva a konečníku, ovarií, prsu, prostaty a pankreatu na stav BRCA1 a Mre11, Rad50, Nbs1 (MRN komlex) proteinů, nezbytných pro funkční opravu dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace (HR). Následně jsme zjišťovali, zda deficience těchto proteinů souvisí s citlivostí na PARP-1 inhibitor.
Naše výsledky ukazují výraznou citlivost na PARP-1 inhibitor u všech testovaných BRCA1 deficitních rakovinných linií. Kombinované defekty v BRCA1 a MRN komplexu ještě zvýšily buněčnou citlivost na PARP-1 inhibitor. Avšak buňky s pouhou deficiencí v MRN komplexu nerespondovaly na PARP-1 inhibitor jednotně s vysokou citlivostí. Nicméně kombinované použití PARP-1 inhibitoru a látky poškozující DNA, camptothecinu, bylo pro tyto buňky destruktivní.

Zjištěná data naznačují, že rakovinné buňky s defektem v signalizaci poškození DNA a/nebo v HR mohou být úspěšně cíleny PARP-1 inhibitorem, ale s různým přístupem v závislosti na konkrétní poruše v HR nebo signalizaci poškození DNA. PARP-1 inhibitor jako samostatná droga představuje využitelnou terapeutickou strategii pro řadu rakovinných buněk nesoucích BRCA1 mutaci. Optimální zasažení buněk s defektem v MRN komplexu může na

druhou stranu vyžadovat kombinaci PARP-1 inhibitoru s dalším, DNA poškození indukujícím, chemoterapeutikem.

Projekt byl podpořen v rámci studentských zahraničních mobilit z Rozvojového projektu MŠMT a MSM 6198959216.

SELEKTIVNÍ TOXICITA OPTICKÝCH ISOMERŮ ALFA-HEXACHLORCYKLOHEXANU: (ANTI-)ANDROGENNÍ ÚČINEK

NELA PAVLÍKOVÁ[a], PETR KLÁN[b] a LUDĚK BLÁHA[a]

[a]RECETOX, Masarykova univerzita, Kamenice 3, 625 00 Brno; [b]Ústav chemie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno
pavlikova@recetox.muni.cz

Hexachlorcyklohexan (HCH) je organochlorový pesticid, v minulosti široce používaný. Hlavní složky technické směsi HCH: α-HCH a β-HCH byly jako pesticid neúčinné, jsou však ze všech HCH isomerů nejvíce perzistentní, a proto se dodnes výrazně podílejí na kontaminaci životního prostředí. α-HCH jsou přisuzovány účinky neurotoxické a kancerogenní, nedávno byl popsán také jeho endokrinní disruptivní efekt (týkající se aktivity androgenního receptoru; AR). Přestože α-HCH má dvě enantiomerické formy, všechny toxikologické studie se u α-HCH vztahují pouze k racemátu 1:1. Tato studie jako první předkládá srovnání účinku racemátu α-HCH s jeho jednotlivými enantiomery. Separace enantiomerů byla provedena pomocí semi-preparativní HPLC a jejich (anti)androgenní efekt byl testován za použití buněk karcinomu prsu (linie MDA-kB2) stabilně transfekovaných genem pro luciferázu pod transkripční kontrolou androgeních receptorů. Dosavadní výsledky ukázaly významnou anti-androgenní aktivitu racemátu α-HCH (maximální efekty v nízkých mikromolárních koncentracích). Jednotlivé enantiomery se nám podařilo úspěšně separovat a jejich účinky na AR jsou aktuálně studovány.

Výzkum je podporován grantem INCHEMBIOL MSM 0021622412.

PROTEINOVÉ INŽENÝRSTVÍ ENZYMŮ: OPTIMALIZACE PŘÍSTUPOVÝCH CEST VEDOUCÍCH DO AKTIVNÍHO MÍSTA

M. PAVLOVÁ[a], M. KLVAŇA[a], P. DVOŘÁK[a], R. CHALOUPKOVÁ[a], R. C. WADE[c], Y. NAGATA[b] a J. DAMBORSKÝ[a]

[a]Loschmidtovy laboratoře, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno; [b]Department of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japonsko; [c]Molecular and Cellular Modeling Group, EML Research, Heidelberg, SRN
jiri@chemi.muni.cz; http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/

Vysoká perzistence některých syntetických látek může být způsobena jejich obtížnou biologickou rozložitelností, tedy chybějícím nebo nedostatečně výkonným enzymem nezbytným pro katalýzu kritického kroku biochemické dráhy. Toto platí zejména pro nízkomolekulární halogenované uhlovodíky, které po uvolnění do životního prostředí představují vážné riziko pro ekosystém a lidské zdraví. Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5) jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují klíčovou detoxifikační reakci halogenovaných uhlovodíků, jakou je hydrolytické štěpení vazby uhlík halogen na odpovídající alkoholy a halogenidové anionty. Díky této vlastnosti představují halogenalkandehalogenasy skupinu enzymů s velkým potenciálem pro využití v biodegradacích, bioremediacích a biosensingu. Přes širokou substrátovou specifitu halogenalkandehalogenas narážíme na problémy spojené s jejich nízkou aktivitou a stabilitou. Halogenalkandehalogenasy se tak stávají vhodným kandidátem pro proteinové inženýrství umožňující modifikovat katalytické vlastnosti enzymů cílenými změnami v jejich struktuře.

Cílem této práce bylo zvýšení katalytické účinnosti halogenalkandehalogenasy DhaA z půdní bakterie *Rhodoccocus* sp. s vysoce perzistentními a toxickými sloučeninami 1,2,3-trichlorpropanem a 1,2-dichlorethanem. K návrhu mutací jsme použili semi-racionální přístup, který kombinuje racionální design s řízenou evolucí. Pomocí racionálního designu jsme identifikovali osm klíčových aminokyselin I135, A145, A172, C176, W141, V245, L246 a Y273, které tvoří stěny tunelů spojující povrch enzymu s jeho vnořeným aktivním místem. Tyto klíčové aminokyseliny byly mutovány místně cílenou mutagenezí a saturační mutagenezí. Mutantní knihovny čítající 5300 klonů byly biochemicky testovány na mikrotitračních destičkách a 51 pozitivních kandidátů bylo sekvenováno. Výsledky sekvenace potvrdily 26 mutantních variant, které byly dále detailně charakterizovány. Varianty DhaA obsahovaly ve většině případů substituce za velká aromatická rezidua. Specifické kombinace mutací ovlivňující přístupové cesty spojující aktivní místo DhaA s povrchem vedly k 26-ti násobnému zlepšení aktivity s 1,2,3-trichlorpropanem a 9-ti násobnému zlepšení aktivity s 1,2-dichlorethanem. Zvýšená aktivita je pravděpodobně způsobena prostorovým omezením přístupu molekul vody do aktivního místa DhaA vedoucí ke zvýšené tvorbě aktivovaného komplexu. U mutantních variant nesoucí změny v pozicích C176 a A172 došlo současně k výraznému zvýšení termostability, v některých kombinacích až o 19 °C. Pozorován byl rovněž významný posun v substrátových specifitách jednotlivých mutantních proteinů.

Výsledky naší studie ukazují na důležitou roli přístupových cest vedoucích do aktivního místa enzymu. Předpokládáme, že optimalizace přístupových cest může být jedním z obecných mechanismů adaptace enzymů na nové chemické sloučeniny uvolněné člověkem do životního prostředí, na zlepšení katalytické aktivity enzymů, jejich substrátové specifity a stability.

STUDIUM INTERAKCÍ PROTEINU 14-3-3 POMOCÍ MS3D TECHNIKY

KATEŘINA PEŠLOVÁ[a,b], PETR NOVÁK[b], TOMÁŠ OBŠIL[c], PETR HODEK[a] a MIROSLAV ŠULC[a,b]

[a]Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; [b]Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i. a [c]Fyziologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 peslova@biomed.cas.cz

Proteiny 14-3-3 patří mezi regulační proteiny účastnící se širokého okruhu biologických procesů interakcí s více než dvěma sty popsaných vazebných partnerů. Vazba do komplexu je ve většině případů podmíněna nejprve seskupením proteinů 14-3-3 do dimerů a následně rozpoznáváním vazebných motivů klientních molekul, které jsou fosforylovány[1]. V každém roce se zvyšuje množství publikovaných strukturních modelů proteinových komplexů 14-3-3 s různými partnery, které jsou většinou získané technikami rentgenostrukturní analýzy nebo nukleární magnetické rezonance s vysokým rozlišením[2,3]. Nedostatkem těchto technik je skutečnost, že získaná data mohou vzhledem k prostředí proteinu v krystalu či rozpouštědlech kompatibilních s NMR popisovat částečně arteficielní strukturu proteinu, která nemusí odpovídat přirozené konformaci *in vivo*. K ověření takových strukturních modelů a zejména pro studium flexibilních oblastí proteinů, které nejsou v modelech přesně definovány, bylo použito poměrně nové techniky MS3D, která kombinuje hmotnostně spektrometrickou analýzu (MS) proteinových komplexů po předchozím kovalentním zesítění interagujících partnerů v roztoku. Protože síťovací reakce probíhá ve vodných roztocích, výsledky získané hmotností spektrometrií mapují vždy strukturu proteinů za fyziologických podmínek. Pomocí tohoto přístupu jsme již upřesnili polohu aminokyselin účastnících se interakcí mezi podjednotkami dimeru 14-3-3 a prokázali jsme odlišnou konformaci N-terminální části v homodimeru 14-3-3zeta oproti publikovanému modelu (PDB: 1ib1).

Technikou MS3D byly nyní studovány interakce dimeru proteinu 14-3-3zeta s regulační doménou tyrosinhydroxylasy (TH1R) a nebo s doménou RGS (regulátor G-signálních proteinů). 1D-SDS PAGE produktů síťovací reakce s činidlem EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid) prokázala tvorbu kovalentních dimerických komplexů mezi 14-3-3zeta a TH1R a mezi 14-3-3zeta a RGS. Fosforylované analogy obou substrátů vykazují v souladu s literaturou vyšší afinitu k proteinu 14-3-3. Proteinové komplexy byly následně identifikovány MALDI-TOF MS analýzou, která jednoznačně potvrdila proteinové složení kovalentních komplexů. Pro přesnou identifikaci aminokyselin, které se účastní interakcí mezi oběma partnery v proteinových komplexech, byla použita technika LC-FTICR (Liquid Chromatography - Ion Cyclotron Resonance with Fourrier Transformation).

Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR (303/06/0928), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumnými centry MŠMT LC545 a LC7017.

LITERATURA

1. Shen Y. H., Godlewski J., Bronisz A., Zhu J., Comb M. J., Avruch J., Tzivion G.: Mol. Biol. Cell. *14*, 4721 (2003).
2. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R.: Nature *376*, 191 (1995).
3. Obšil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dyda F.: Cell *105*, 257 (2001).

3D STOCHASTICKÝ MODEL VÁPNIKOVEJ SIGNALIZÁCIE V SRDCOVOM MYOCYTE

PAVOL PETROVIČ, ALEXANDRA ZAHRADNÍKOVÁ, IVAN ZAHRADNÍK[b] a IVAN VALENT[a]

[a]Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava; [b]Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Vlárska 5, 833 34 Bratislava, Slovensko

Transdukcia informácie z bunkovej membrány (sarkolema) k myofibrilám, počas kontrakcie srdcového svalu, je sprostredkovaná prostredníctvom Ca^{2+} iónov. Akčný potenciál, vzniknutý v sínusovom uzle pravej predsiene, depolarizuje bunkovú membránu v srdcovom myocyte, čo spôsobí prítok Ca^{2+} iónov z extracelulárnych zdrojov cez napäťovo závislé DHPR kanály do dyadického priestoru. Zvýšenie koncentrácie Ca^{2+} tu indukuje otvorenie vápnikovo závislých ryanodínových receptorov (RyR) na membráne sarkoplazmatického retikula. Tento nelineárny proces sa nazýva vápnikom indukované uvoľnenie vápnika (CICR). Otvorenie RyR-ov spôsobí masívne uvoľnenie Ca^{2+} zo SR do cytoplazmy, čo vedie ku kontrakcii bunky. V prezentovanom modeli numericky simulujeme stochastickú dynamiku vrátkovania DHPR a RYR kanálov po depolarizácii sarkolemy v 3D priestore dyadickej štbiny, pričom sme použili Monte Carlo algoritmus[1]. RyR-y sú spriahnuté v klastri o veľkosti 1-49 RyR-ov, vo vzájomnej vzdialenosti 28 nm medzi susednými RyR-mi. DHPR kanály sú náhodne distribuované na rovine vzdialenej 12 nm od membrány SR. Každý kanál je bodovým zdrojom Ca^{2+} iónov a interakcia medzi kanálmi je sprostredkovaná prostredníctvom difúzie Ca^{2+} iónov, ktorá je opísaná súborom časovo závislých parciálnych diferenciálnych rovníc (PDEs). Pri ich riešení sme použili numerický solver VLUGR3 (Vectorizable Local Uniform Grid Refinement[2]), čo nám umožnilo študovať priestorovú a časovú evolúciu koncentrácie Ca^{2+}, Mg^{2+} a ATP^{2-} v 3D priestore[3].

Model ukázal postupné zosilnenie vápnikového prúdu zo SR (I_{SR}), ako odpoveď na spúšťací prúd s extracelulárneho prostredia. Po depolarizačnom pulze s výškou amplitúdy 0 mV nastalo v každej bunke zosilnenie z 76 pA na 3,9 nA (I_{SR}), kde doménu tvoril klaster 49 RyR-ov a 7 DHPR kanálov. I_{SR} dosiahol po depolarizácii membrány maximálnu

hodnotu za 4,5 ms a následne bol za 10 ms signifikantne redukovaný na 0,6 nA, ako dôsledok Ca^{2+} inaktivácie RyR-ov. Tento jednoduchý model 3D model dobre reprezentuje experimentálne výsledky a komplexne zahrňuje podstatnú časť fyzikálnych, fyzikálnochemických, fyziologických a biochemických procesov vedúcich ku kontrakcii bunky myokardu.

Táto práca bola podporená grantom Univerzity Komenského v Bratislave UK/139/2007, grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja 51-031104 a ESF FUNCDYB programom.

LITERATÚRA

1. Fall Ch. P., Marland E. S., Wagner J. M., Tyson J. J.: *Computational Cell Biology*, Springer 2002.
2. Blom J. G., Verwer J. G.: *A vectorizable adaptive grid solver for PDEs in 3D*. Rep. NM-R9319, CWI, Amsterdam 1993a.
3. Valent I., Zahradníková A., Pavelková J., Zahradník I: Biochim. Biophys. Acta *1768*, 155 (2007).

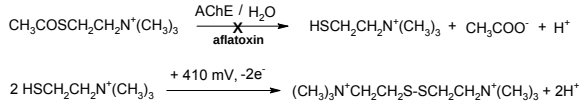
ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY PRO DETEKCI AFLATOXINŮ

MIROSLAV POHANKA[a,b], DANIEL JUN[c,d], KAMIL KUČA[c,d] a PETR SKLÁDAL[b]

[a]Centrum biologické ochrany, 561 66 Těchonín; [b]Katedra biochemie, PřF Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno; [c]Centrum pokročilých studií a [d]Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
rau@atlas.cz

Elektrochemické biosenzory mohou být použity ke stanovení aflatoxinů v několika směrech. Pravděpodobně nejtradičnější způsob je založen na použití značených protilátek specifických proti aflatoxinu a konjugátu obsahujícímu aflatoxin kovalentně vázaný na vhodnou makromolekulu (nejčastěji albumin). Samotný formát měření je pak kompetitivní. V námi prezentované studii je zvolen odlišný přístup založený na schopnosti aflatoxinů inhibovat enzym acetylcholinesterasu (AChE). Mechanismus inhibice není sice ještě detailně popsán, ale předběžné studie poukazují na afinitu aflatoxinů k AChE na vyšší úrovni, než je uváděno u umělých inhibitorů: nervově paralytických látek a organofosfátových pesticidů.

V této studii popsaný biosenzor využívá AChE jako rekogniční složku a vlastní přítomnost aflatoxinů je detegována díky poklesu aktivity AChE. Schematické znázornění inhibice a elektrochemické sledování aktivity AChE je vyjádřeno pomocí dvou následujících reakčních rovnic:



První rovnice popisuje enzymově katalyzovanou hydrolýzu acetylthiocholinu, druhá pak oxidaci thiocholinu na povrchu pracovní elektrody. Proud získaný při oxidaci thiocholinu je výstupní veličinou.

Touto metodou byl stanoven aflatoxin B1 ve standardech jakož i v reálných vzorcích. Po optimalizaci bylo možno touto metodou stanovit aflatoxin B1 s limited detekce 4,8 ppb, když započítáme absolutní spotřebu vzorku 10 µl, je možno absolutně detegovat 4,8 pg aflatoxinu B1. K testované metodě byla vyvinuta i fotometrická varianta, kde elektrochemický proces je nahrazen reakcí s Ellmanovým činidlem. Při použití 96 jamkových titračních destiček byly zachovány dosažené analytické parametry. K praktickému ověření metody byly zvoleny potraviny kontaminované plísní *Aspergillus flavus* získané od Národní referenční laboratoře pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách a porovnány s HPLC analýzou.

Tato studie byla realizována v rámci grantového projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR: 2A-1TP1/009.

TESTOVÁNÍ VYBRANÝCH KOMPLEXŮ PŘECHODNÝCH KOVŮ JAKO CHEMICKÝCH NUKLEAS NA MODELU DSDNA

VERONIKA PRAŽÁKOVÁ[a], JÁN VANČO[b] a MILAN BARTOŠ[a]

[a]Ústav přírodních léčiv, [b]Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
bartos@geneproof.cz

Komplexy přechodných kovů jsou používány jak k analýze struktury DNA, tak k vývoji látek štěpících DNA, které jsou využitelné jako potenciální chemoterapeutika. Charakteristickým rysem, společným pro tyto komplexy je jejich vysoká afinita k dsDNA a přítomnost redoxně aktivního kovového iontu[1]. Do těchto komplexů lze zařadit ligand nebo vhodný kov tak, aby výsledná struktura vyhovovala individuálnímu použití[2,3].

Předkládaná práce měla za cíl zhodnotit aktivitu vybraných komplexů kovů na základě chemicky indukovaného nukleasového účinku na struktury plasmidové dsDNA a porovnat aktivitu těchto látek bez a za přítomnosti askorbátu jako redukčního prostředí.

Byla testována nukleasová aktivita komplexů: Cu(sal-β-ala)(phen).H_2O (komplex **1**), $[Co(sal\text{-}gly)_2]Co(H_2O)_6$ 2 H_2O (komplex **2**) a [Cu(pyr-β-ala)(H_2O)] 2 H_2O (komplex **3**), kde sal-β-ala a sal-gly jsou ligandy Schiffovych bazí vzniklých kondenzací salicylaldehydu s β-alaninem, resp. glycinem, phen je doplňkový chelátový *N*-ligand 1,10-fenantrolin a pyr-β-ala dianion *N*-pyruviden-β-alaninu. Dále byly testovány železité komplexy odvozené od *N,N'*-bis(salicyliden)ethylendiaminu (salen) a *N,N'*-bis(salicyliden)-*o*-fenylendiaminu (saloph) s doplňkovými *N*-donorovými ligandy imidazolem (salen i) (komplex **4**), benzimidazolem (salen bi) (komplex **5**), benztriazolem (salen

bt) (komplex **6**) a triazolem (salen t, saloph t) (komplexy **7** a **8**) obecného složení [Fe(salen)L)], resp. [Fe(saloph)(L)].

Nukleasová aktivita těchto sloučenin byla hodnocena na strukturách plasmidové DNA. Působením chemických nukleas docházelo ke štěpení řetězců původní nadšroubovicové dsDNA (CCC forma) na otevřenou cirkulární formu DNA (OC forma) nebo na formu lineární (L forma). Jednotlivé formy plasmidové DNA byly identifikovány elektroforézou v agarózovém gelu. V první sérii pokusů byla plasmidová DNA inkubována v prostředí peroxidu vodíku pouze s testovanými sloučeninami o koncentraci 24 μM a 120 μM. V dalších pokusech byl k této reakční směsi přidán i askorbát podporující reakci Fentonova typu.

Silná nukleasová aktivita byla zjištěna u komplexu **1** a to od 10 μM koncentrace; za přítomnosti askorbátu dokonce už od 3 μM koncentrace. Schopnost podobných komplexů s planárními doplňkovými ligandy oxidačně štěpit DNA prokázal i Reddy[4]. Jako chemická nukleasa působí i komplex **2** a komplexy **5** a **7** v koncentraci 24 μM a **8** ve 120 μM koncentraci. K rozštěpení řetězců DNA vedla také její inkubace se 120 μM roztoky komplexů **6**, **7** nebo **8** s askorbátem, který v tomto případě působil podle očekávání jako prooxidační činidlo, jak prokázali i jiní autoři[5-7].

Zejména vysoká nukleasová aktivita, zjištěná u komplexu **1**, je jistým příslibem pro využití této látky jako potenciálního protinádorového léčiva, jehož účinek je založen na oxidačním štěpení DNA nádorových buněk[8].

LITERATURA

1. Liu J., Lu T. B., Li H., Zhang Q. L., Ji L. N., Zhang T. X., Qu L.H., Zhou H.: Trans. Met. Chem. *27*, 686 (2002).
2. Ma D.-L., Che C. M.: Chem.-Eur. J. *9*, 6133 (2003).
3. Wang B-d., Yang Z-Y., Wang Q., Cai T-k., Crewdson P.: Bioorg. Med. Chem. *14*, 1880 (2006).
4. Reddy P. A. N., Nethaji M., Chakravarty A. R.: Eur. J. Inorg. Chem. *2004*, 1440.
5. Lee K.W., Lee H. J., Surh Y. J., Lee C. Y.: Am. J. Clin. Nutr. *78*, 1074 (2003).
6. Crott J. W., Fenech M.: Carcinogenesis *20*, 1035 (1999).
7. Silvestri A., Giampaolo B., Giuseppe R., Maria Teresa Lo G., Salvatore T.: J. Inorg. Biochem. *98*, 589 (2004).
8. Theophanides T., Anastassopoulou J.: Crit. Rev. Oncol. Hematol. *42*, 57 (2002).

STUDIUM NEUROPATOGENEZE KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

DANIEL RŮŽEK[a,b], MARIE VANCOVÁ[a,b], HANA ŠŤASTNÁ[a], JAN KOPECKÝ[a,b] a LIBOR GRUBHOFFER[a,b]

[a] Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 37005 České Budějovice; [b]Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, Branišovská 31, 37005 České Budějovice ruzekd@paru.cas.cz

Klíšťová encefalitida (KE) představuje významnou virovou neuroinfekci vyskytující se napříč prakticky celou Evropou a Asií. Původce tohoto onemocnění, virus klíšťové encefalitidy, je taxonomicky řazen společně s řadou dalších nebezpečných encefalických virů do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Mnoho zcela klíčových otázek spojených s biologií viru KE a patogenezí jim způsobovaného onemocnění zůstává stále nevyřešeno. V současné době existuje jen velmi málo experimentálních dat, jež by objasňovala složitou interakci viru KE s buňkami centrální nervové soustavy (CNS) hostitele, jeho průniku do mozku a šíření v rámci CNS.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium interakce viru KE s endotelovými buňkami hematoencefalické bariéry a buňkami neurálního původu. Experimenty byly provedeny na modelu dospělé laboratorní myši i v podmínkách *in vitro.* Kromě toho jsme sledovali roli hostitelského imunitního systému v patogenezi KE. Pozorovali jsme, že virus v okamžiku vrcholící virémie způsobuje desintegraci hematoencefalické bariéry, jejíž integrita se po odeznění virémie navrací k normálu. Charakterizovali jsme řadu strukturních a ultrastrukturních změn neurálních buněk indukovaných virovou infekcí, včetně indukce apoptózy. Pomocí microarray technologie jsme studovali změny globální genové exprese v infikovaných buňkách. Na základě pokusů s myšmi nesoucími těžkou kombinovanou imunosupresi a díky technologii adoptivních přenosů imunity jsme zjistili, že k celkově fatálnímu výsledku infekce značnou měrou přispívají hostitelské $CD8^+$ T-lymfocyty migrující do CNS, přičemž díky tomu KE vykazuje znaky imunopatologického onemocnění.

POLYMORFISMUS V PROMÓTOROVEJ OBLASTI PSA GÉNU U PACIENTOV S KARCINÓMOM PROSTATY A BENÍGNOU HYPERPLÁZIOU PROSTATY

MONIKA SIVOŇOVÁ[a], TATIANA MATÁKOVÁ[a], JOZEF HATOK[a], DUŠAN DOBROTA[a], JÁN KLIMENT ml.[b] a JÁN KLIMENT[b]

[a] Ústav lekárskej biochémie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, [b] Urologická klinika MFN, Kollárova 2, 036 59 Martin

Prostatický špecifický antigén (PSA) je najvýznamnejším nádorovým markerom pre detekciu a sledovanie karcinómu prostaty. Gén kódujúci PSA je lokalizovaný na 19. chromozóme, obsahuje 6-kb promótor v 5´oblasti, a obsahuje ARE oblasti (Androgen-Responsive Elements), na ktoré sa viaže androgénový receptor, výsledkom čoho je regulácia expresie PSA génu. V promótorovej ARE-I oblasti v pozícii - 158 od štartovacieho miesta transkripcie bol popísaný jednonukleotidový polymorfizmus (A/G). Cieľom našej štúdie bolo sledovanie potenciálneho funkčného významu daného polymorfizmu vo vzťahu ku karcinómu prostaty u 171 pacientov s karcinóm prostaty, 165 pacientov s benígnou hyperpláziou prostaty (BHP) a 75 zdravých

jedincov. Pacienti s BHP s G/G genotypom PSA génu majú 1.43 – vyššie riziko vzniku ochorenia v porovnaní s jedincami s genotypom A/A a A/G. V prípade pacientov s karcinómom prostaty sa nezistil žiaden vzťah medzi PSA polymorfizmom v pozícii -158, rizikom vzniku karcinómu prostaty a hladinami PSA v sére.

Podporené grantmi Ministerstva školstva Slovenskej republiky MVTS Bil/ČR/SR/UK/06 a AV 4/0013/05.

PRODUKCE IL-10 LEUKOCYTY MLÉČNÉ ŽLÁZY SKOTU PO STIMULACI LIPOPOLYSACHARIDEM A MURAMYLDIPEPTIDEM

PETR SLÁMA[a,b], MONIKA ZOUHAROVÁ[b], VLADIMÍR BABÁK[c], ZBYŠEK SLÁDEK[a,b], TEREZA LANGROVÁ[a,b] a DUŠAN RYŠÁNEK[b]

[a]Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, [b]Oddělení imunologie a [c]Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno xslama@node.mendelu.cz

Cytokiny jsou látky bílkovinné povahy, které kontrolují přežívání, růst, diferenciaci a funkce buněk. Jejich nejdůležitější funkcí je regulace imunitních procesů a zajištění homeostázy. Některé jsou zařazovány do skupiny prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α), jiné do skupiny cytokinů protizánětlivých (IL-1ra, TGF-β, IL-10). IL-10 (interleukin-10) je pleiotropní cytokin, který plní významné regulační funkce zprostředkované jeho působením na lymfoidní a myeloidní buňky. IL-10 má kromě protizánětlivého účinku rovněž další možnosti klinického využití. Např. při léčbě melanomů, při transplantacích, imunodeficiencích a parazitických infekcích.

Cílem práce bylo zjistit, zda lipopolysacharid (LPS) a muramyldipeptid (MDP), jako komponenty buněčné stěny G- a G+ bakterií, vyvolávají produkci bovinního IL-10.

Leukocyty získané po výplachu mléčné žlázy fyziologickým roztokem byly inkubovány jednu hodinu s LPS nebo MDP v *in vitro* podmínkách (RPMI medium, 37 °C a 5 % CO_2). Poté byla semikvantitativně zjišťována přítomnost IL-10 v získaném supernatantu sendvičovou metodou ELISA.

Při experimentech byl zjištěn nárůst produkce IL-10 při použití obou zmíněných imunogenních činitelů (LPS a MDP) oproti kontrolním vzorkům (leukocyty v RPMI mediu), přičemž vyšší produkce IL-10 byla zaznamenána při použití MDP.

Jak je z výsledků patrné, LPS a MDP vyvolávají produkci IL-10 u leukocytů mléčné žlázy skotu. Při dalším studiu tohoto cytokinu by měla být věnována pozornost tomu, jaké typy bovinních leukocytů se nejvíce podílejí na jeho produkci. Znalost prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů je důležitá z hlediska řízení průběhu zánětu. Při zánětu mléčné žlázy skotu může mít vhodná modulace tohoto procesu také nezanedbatelný ekonomický dopad.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

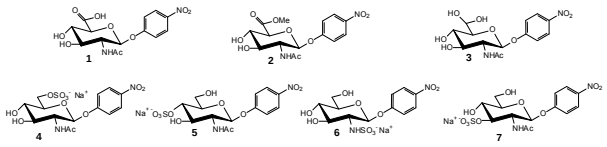
NEPŘIROZENÉ SUBSTRÁTY β-*N*-ACETYLHEXOSAMINIDAS: SYNTÉZA NOVÝCH IMUNOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

KRISTÝNA SLÁMOVÁ[a,b], PAVLA BOJAROVÁ[a], KAREL KŘENEK[a], RADEK GAŽÁK[a], KAREL BEZOUŠKA[c], SPENCER J. WILLIAMS[d], MARTINA MACKOVÁ[b] a VLADIMÍR KŘEN[a]

[a]Centrum biokatalýzy a biotransformací, MBÚ AV ČR, 142 20 Praha 4; [b] Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, 166 28 Praha 6; [c]Katedra biochemie, PřF UK v Praze, 128 40 Praha 2; [d]Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, 30 Flemington Rd, 3010 Parkville, Victoria, Australia kristynaslamova@atlas.cz

Fungální β-*N*-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) jsou glykosidasy s širokou substrátovou specifitou a velkým syntetickým potenciálem. Byly použity k syntéze nových *N*-acetylgluko- a galaktosaminidů s vysokou imunologickou aktivitou[1]. Tyto látky se váží na CD69 receptor lidských přirozených tzv. zabíječských (NK) buněk, čímž se spustí signální kaskáda vedoucí k aktivaci cytotoxických mechanismů[2]. Naše nejnovější výsledky ukazují, že vazba aktivačních molekul na receptor je zesílena přítomností negativně nabité skupiny.

Byla připravena sada sedmi derivátů *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (Obr. 1). Připravené glykosidy byly testovány jako ligandy aktivačních receptorů CD69. Zatímco přítomnost nabité skupiny na C-6 (sulfát, karboxylát) přinesla značné zesílení vazby ligandu na receptor CD69 oproti nenabitému analogu, nabitá skupina na jiném uhlíku cukerného skeletu neumožňuje vazbu ligandu na receptor. Screening 24 fungálních β-*N*-acetylhexosaminidas z knihovny glykosidas Laboratoře biotransformací ukázal, že glykosid **3** byl obecně nejlépe akceptovaným substrátem, zatímco látky **2** a **5** nebyly štěpeny prakticky vůbec. V současné době je naším cílem připravit z těchto substrátů transglykosylací s β-*N*-acetylhexosaminidasami nové vysoce imunoaktivní disacharidy.



Obr.1. **Modifikované substráty β-*N*-acetylhexosaminidas**

Tato práce vznikla za podpory grantů IAA 400200503 a MŠMT LC06010.

LITERATURA
1. Fialová P., Namdjou D.-J., Ettrich R., Přikrylová V., Rauvolfová J., Křenek K., Elling L., Bezouška K., Křen V.: Adv. Synth. Catal. *347*, 997 (2005).
2. Krist P., Herkommerová-Rajnochová E., Rauvolfová J., Semeňuk T., Vavrušková P., Pavlíček J., Bezouška K., Petruš L., Křen V.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *287*, 11 (2001).

ŠTÚDIUM HOJENIA KOŽNÝCH RÁN A EXPRESIE GÉNOV SÚVISIACICH Z HOJENÍM NA MODELE DIABETU MELLITUS TYPU 2 - POTKANOVI ZUCKER DIABETIC FATTY (ZDF)

R. SLAVKOVSKÝ[a,b], R. KÖHLEROVÁ[b], M. HAJZLEROVÁ[b], A. JIROUTOVÁ[b], L. SOBOTKA[c], V. VELEBNÝ[a] a J. KANTA[b]

[a]CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč 401, 561 02, Dolní Dobrouč; [b]Ústav lékařské biochemie, Lékářska fakulta v Hradci Králove, Šimkova 870, Hradec Králové; [c]Klinika gerontologická a metabolická, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Komplikované diabetické defekty sú ťažko liečiteľné a často vedú k chronickým ranám či amputáciám dolných končatín. Patogenéza diabetických defektov je komplikovaná. Jedným z prístupov ako porozumieť tomuto fenoménu je aj štúdiom na experimentálnom zvieracom modeli. Nami volený model diabetes mellitus typu II (DM2), potkan ZDF, má geneticky podmienenú náchylnosť k vývoju výživou a obezitou indukovaného DM2 kvôli recesívnej mutácii leptínového receptoru a vyznačuje sa mnohými parametrami zhodnými s DM2 u človeka. Cieľom tejto práce je zistiť, aké sú rozdiely v hojení rán a v expresii vybraných génov v rane medzi diabetickými a zdravými potkanmi ZDF.

Boli porovnané štyri skupiny zvierat: diabetické a zdravé, oboch pohlaví. Zvieratám boli na chrbte vytvorené cirkulárne excizné rany o priemere 2 cm, pravidelne bolo pozorované hojenie (0, 3, 5, 7, 10ty deň) a v intervale 10 dní po poškodení boli odobraté vzorky regenerujúceho sa tkaniva kvôli histologickým, biochemickým a molekulárne-genetickým analýzam.

V porovnaní s kontrolnými zvieratami u obéznych a diabetických zvierat bola pozorovaná obmedzená počiatočná kontrakcia rany. Výraznejšie rozdiely v hojení sme našli u samíc ako u samcov. Samice mali vyšší stupeň obezity, ale podstatne nižšiu hladinu glukózy oproti samcom. Diametrálne rozdielny je vzhľad rany, u diabetických je sprevádzaný nadmernou tvorbou chrasty a s vizuálnymi znakmi zápalu. Diabetické zvieratá majú tendenciu ranu hojiť reepitelizáciou, kontrolné zvieratá kontrakciou rany. Veľkosť jaziev je po zahojení zvýšená u samcov o 40% a u samíc až o 150% oproti kontrole. Technikou DNA array a realtime-RT-PCR sme v rane u samcov pozorovali zvýšenú expresiu prozáplového interleukínu 6, osteopontínu, rac2 podjednotky NADPH oxidázy a zníženú expresiu tropoelastínu. Obsah hydroxyprolínu, ukazovateľa kolagénu, bol výrazne znížený u samcov. Zvýšený zápal u diabetických zvierat bol pozorovaný aj histologicky, kde bola pozorovaná zvýšená infiltrácia polymorfonukleárnych buniek.

Ukazuje sa, že DM2 má vplyv na charakter a mechanizmus hojenia, choré zvieratá majú zvýšené známky zápalu, ktorý pravdepodobne spomaľuje hojenie. Z daných výsledkov sa nám ukazuje, že vysoký stupeň obezity má väčší vplyv na zhoršené hojenie ako vysoká hyperglykémia.

SPEKTROFLUOROMETRICKÁ ANALÝZA VÄZBY MITOCHONDRIÁLNEHO PROTEÍNU A TELOMÉROVÉHO OLIGONUKLEOTIDU

EVA SMREKOVÁ[a], MAREK ŠEBESTA[b], JOZEF NOSEK[b], ĽUBOMÍR TOMÁŠKA[c] a IVAN VALENT[a]

Katedra [a]fyzkálnej a teoretickej chémie, [b]biochémie a [c]genetiky, Universita Komenského, PrF, Mlynská dolina CH-1 and B-1, 842 15 Bratislava, Slovensko

Prevedenie genetických informácií kódovaných DNA závisí aj od prídavných bunkových komponentov, vrátane veľkého počtu proteínov, ktoré regulujú ich vyššiu štruktúru, prístupnosť k DNA modifikujúcim komplexom a faktory, ktoré sa zúčastňujú na génovej expresii. Proteín viažúci sa na mitochondriálne teloméry (mtTBP) je vo väzbe s jednovláknovou DNA a vykazuje preferenciu väzby na 5´ koncový telomérový zvyšok lineárnej mitochondriálnej DNA (mtDNA) kvasinky *Candida parapsilosis*[1,2]. Pre detailnejšiu charakterizáciu vlastností DNA-väzby s proteínom mtTBP bol skúmaný prirodzaný typ mtTBP a dva mutantné typy ($mtTBP^{G28E}$ a $mtTBP^{W61L}$) s poslednými 51 nukleotidmi (TEL51) 5' telomérového zvyšku mtDNA kvasinky *C. parapsilosis*.

Väzba DNA a proteínov bola skúmaná pomocou techniky fluorescenčného zhášania vzhľadom na tzv. stacking interakciu tryptofánového zvyšku (Trp) s DNA špirálou[3]. Pre tieto merania boli použité spektrofluorometre FloroLog FL3-11 a Shimadzu RF-5301 PC.

Výsledky poukázali na 30–45 % pokles intenzity fluorescenčného emisného maxima tryptofánu v 343 nm po 60 min inkubácie v pomere [DNA]/[mtTBP] = 0.6 pre prirodzený typ proteínu mt TBP a G28E mutantného proteínu pri koncentrácii 3×10^{-7} M. Mutantný typ W61L, ktorý obsahoval len jeden z dvoch Trp zvyškov, nevykazoval fluorescenčné zhášanie. Na rozdiel od HEPES pufra, PBS pufor spôsoboval posuny emisného maxima, čo poukazuje na dôležitosť výberu správneho pufra pre nasledujúce fluorescenčné experimenty.

Ďalší výskum bude zameraný na stanovenie asociačných konštánt a popis kinetiky interakcie pri rôznych podmienkach.

Táto práca je podporovaná Howard Hughes Medical Institute grant (55005622), the Fogarty International Research Collaboration Award (2-R03-TW005654-04A1), the Slovak grant agencies VEGA (1/2331/05, 1/3247/06) a APVT (20-001604, LPP-0164-06).

LITERATURA
1. Tomáška Ľ., Nosek J., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. *272,* 3049 (1997).
2. Nosek J., Tomáška Ľ., Pagáčová B, Fukuhara H.: J. Biol. Chem. *274*, 8850 (1999).
3. Khamis M. I., Casasfinet J. R., Maki A. H., Murphy J. B., Chase J. W.: J. Biol. Chem. *262*, 10938 (1987).

NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION OF PROSTATE CANCER CELLS

K. SOUČEK[a], Z. PERNICOVÁ[a,b], E. LINCOVÁ[a,b], A. STARŠÍCHOVÁ[a,b], and A. KOZUBÍK[a,b],

[a]Institute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno; [b]Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno
ksoucek@ibp.cz

Prostate cancer is one of the most common cancers among men especially in Western countries. Androgen–independent neuroendocrine cells are minor type of prostate epithelial cells found in both normal and cancer prostate tissue. It has been shown that these cells can contribute to the progression of prostate cancer. However, mechanism of this process is not fully understood. Our purpose was to find mechanism and characterize in more details neuroendocrine differentiation (NED) induced by prolonged cultivation of prostate cancer cell line in absence of androgens. NED was confirmed by observing of the protein and mRNA levels of well known neuroendocrine markers such as neuron-specific enolase and beta III tubulin. Interestingly, an increased level of specific NED markers was paralleled with changes in expression of other differentiation markers such as cytokeratin-18 and 19. Androgen ablation and NED induction led to the massive G0/G1 cell cycle arrest associated with downregulation of cyclin D1 and p21 protein expression and p27 upregulation. Our study indicates that pathway leading to NED of prostate cancer cells is complex process including also events characteristic for general epithelial differentiation.

This work was supported by grants GA CR No. 204/07/0834 and 310/07/0961 and by the Research Plan AV0Z50040507 and AV0Z50040702 of AS CR.

KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY A PERIODONCIA

T. SOUKUP[a], B. VÍŠEK[a], J. SUCHÁNEK[b], R. IVANČAKOVÁ[b] a J. MOKRÝ[a]

[a]Ústav histologie a embryologie, UK v Praze, LF v Hradci Králové; [b]Stomatologická klinika, UK v Praze, LF v Hradci Králové a FN Hradec Králové
soukupto@lfhk.cuni.cz

Zubní pulpa (ZP) stálé dentice se utváří ve 12. týdnu a ZP dočasné dentice dokonce již v 8. týdnu embryonálního vývoje. Od této doby je pomocí tvrdých zubní tkání ohraničena od okolního vaziva a zachovává si strukturu primitivního vaziva. Cílem naší práce je stanovení fenotypu, proliferačního a diferenciačního potenciálu, sledování morfologických změn a viability kmenových buněk zubní pulpy (KBZP) a kmenových buněk periodoncia (PLSC) kultivovaných *in vitro*. V experimentu bylo použito celkem 10 linií KBZP izolovaných z 3. molárů a 1. premolárů a 1 linie PLSC. Buňky byly kultivovány v modifikovaném médiu pro MKB obohaceném o růstové faktory (EGF, PDGF), 2%FCS a ITS suplement. Pro fenotypizaci v průtokovém cytometru (Cell Lab Quanta) jsme použili primární protilátky značené fluorochromy FITC resp. PE. DNA analýza byla prováděna značením PI. Pro stanovení kvantitativních parametrů a viability buněk jsme použili přístroje Vi-Cell XR a Z2 Counter. Enzymatickou disociací celé zubní pulpy bylo izolováno v průměru 45 ± 6 (10 – 108) kmenových buněk. Tyto jsme kultivovali přes 50 populačních zdvojení (PD) v modifikovaném médiu pro MKB. Analýza ukázala zvýšení času potřebného pro zdvojení z původních 12–50 hodin pro prvních 43 PD na 60–90 hodin po překročení 55 PD. Viabilita kultivovaných buněk byla dlouhodobě 96 ± 3 %. V průběhu dlouhodobé kultivace KBZP jsme nepozorovali známky degenerace kultury či znaky spontánní diferenciace buněk. DNA analýza prokázala 42 ± 5 % KBZP v SG_2 fázi buněčného cyklu. Fenotypická analýza KBZP subodontoblastického kompartmentu prokázala vysokou pozitivitu pro CD29, CD44, CD90, střední pozitivitu CD16 a nízkou pozitivitu pro CD11b,CD11c,CD49a,c,d,e, CD105, CD117, CD166. Fenotypická analýza KBZP perivaskulárního kompartmentu prokázala vysokou pozitivitu pro CD29, CD44, CD90, střední pozitivitu CD63, nízkou pozitivitu pro CD49a,c,d,e, CD105, CD146, CD166. KBZP ochotně diferencovaly v osteoblasty i chondroblasty a to jak při 2D kultivacích v monolayeru, tak při 3D kultivacích ve formě trojrozměrných sferoidů či na nosičích. Během dosavadních 15 pasáží jsme pro studovanou buněčnou populaci PLSC zjistili tyto parametry: průměr buněk 15 μm (SD = 4,55 %), 37 populačních zdvojení za uplynulých 45 dní (2. až 15. pasáž), průměrná viabilita 95,2 %, plating efficiency (15. pasáž) 78,2 %. Dle výsledků průtokové cytometrie námi kultivovaná populace PLSC vykazovala vysokou pozitivitu v mezenchymálních znacích CD29, CD44, CD73, CD105 a HLA1. Střední úroveň pozitivity vykazoval znak CD90. Nízkou expresi jsme zaznamenali u znaků CXCR4, CD235a a HLA2, negativní expresi vykazovali CCR7 a CD45. DNA analýza prokázala toto stabilní zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu: G_0/G_1 64,1%, S 9,64%, G_2/M 18,68%. Z porovnání našich výsledků s dosud publikovanými pracemi vyplývá, že námi sledovaná populace PLSC vykazuje fenotyp odpovídající MKB. Jedná se o morfologicky homogenní populaci s výrazným proliferačním potenciálem a se stabilním projevem v kultivačních podmínkách *in vitro*. Do budoucna připravujeme další výzkum PLSC a to zejména v oblasti diferenciace ve 2D kulturách a na trojrozměrných nosičích.

Kmenové buňky zubní pulpy a periodoncia představují vysoce potentní zdroj histokompatibilních kmenových buněk pro buněčnou terapii a to nejen onemocnění zubní pulpy a periodoncia. Jejich široký diferenciační potenciál otevírá cestu využití těchto buněk i v dalších medicínských oborech.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NR 9182-3/07.

PŘÍPRAVA, PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE NATIVNÍHO KOMPLEXU CFP-10/ESAT-6

ONDŘEJ STANĚK[a], MARCELA ŠIMŠOVÁ[a,b] a PETER ŠEBO[a]

[a]Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Praha; [b]Proteix s.r.o., Vestec

V poslední době opět stoupá počet lidí nakažených tuberkulózou a to nejen v rozvojových zemí třetího světa, ale v důsledku migrace také v zemích vyspělých. Kritickým bodem v boji proti této zákeřné nemoci je včasné a přesné odhalení latentní infekce bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI). V současné době pro tyto účely nejpoužívanější Tuberkulinový kožní test, založený na stimulaci PPD (Purified Protein Derivative), je však nepřesný díky křížovým reakcím s antigeny environmentálních mykobakterií a používaní BCG vakcíny. Tento nedostatek se podařilo vyřešit u nových diagnostických testů použitím antigenů CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) a ESAT-6 (6-kDa early secreted antigenic target). Ty jsou kódovány v lokusu RD1 (Region of Diference) přítomném pouze u infekčních kmenů. Připravili jsme expresní vektory pro produkci volných rekombinantních antigenů CFP-10, ESAT-6 a rovněž jejich 1:1 komplexu CFP-10/ESAT-6 v buňkách *E. coli*. Použitím kmene *E.coli* ArcticExpress DE3, exprimujícího chaperony *Cpn60* a *Cpn10* a kultivace za nízké teploty (10 °C) se podařilo dosáhnout i produkce rozpustného proteinu ESAT-6 a předejít jeho precipitaci do inkluzních tělísek. Komplex CFP-10/ESAT-6 byl stabilizován již ko-produkcí antigenu CFP-10, který plnil funkci chaperonu ESAT-6. Při izolaci antigenů z biomasy bylo využito zahřátí cytoplazmatické frakce na 70 °C po dobu deseti minut s následnou precipitací denaturovaných balastních proteinů. Tvorba komplexu CFP-10/ESAT-6 izolovaného přímo z buněk, nebo připraveného smícháním byla ověřena pomocí nativní elektroforézy BN-PAGE a interakce protein-protein byly charakterizovány pomocí CD spektroskopie a rezonance povrchových plazmonů.

VYUŽITÍ DNA ČIPŮ V DIAGNOSTICE A VÝZKUMU LEUKÉMIÍ A LYMFOMŮ

KATEŘINA STAŇO KOZUBÍK [a], BORIS TICHÝ [a], PETR KUGLÍK [b], MICHAEL DOUBEK [a], JIŘÍ MAYER[a] a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ [a]

[a]Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika, FN Brno a LF MU, Černopolní 9, 625 00 Brno; [b] Oddělení lékařské genetiky, Černopolní 9, FN Brno a LF MU

Většina nádorů je provázena abnormalitami genomu nádorových buněk jako jsou bodové mutace, delece a amplifikace úseků DNA, případně přestavby chromozomů. Znalost těchto aberací má velký význam pro určení prognózy i výběr terapeutického plánu. Současné molekulárně biologické a cytogenetické postupy umožňující detekci jedné nebo několika změn současně jsou proto postupně nahrazovány novými komplexními technologiemi, například čipy DNA.

Čipy cílené na konkrétní onemocnění mohou upřesnit nejen diagnózu, ale i prognózu onemocnění a v neposlední řadě pomoci odhalit regulační dráhy vedoucí k maligní transformaci buňky. Na našem pracovišti využíváme DNA čipové technologie u hematoonkologických onemocnění, zejména u chronické lymfocytární leukémie (CLL) a u lymfomů. Analyzujeme jak genomy nádorových buněk pomocí komparativní genomové hybridizace (array-CGH), tak i expresi genů. Obě technologie využívají oligonukleotidové čipy a přinášejí komplexní informace o změnách genomu a jeho expresi na úrovni DNA i RNA včetně mikroRNA.

Pro analýzu změn genomu nádorových buněk jsme využili CGH čipy (Human HD-CGH Microarray 4x44K) obsahující cca 44 000 oligonukleotidů o délce 60 bazí navržených pro rovnoměrné pokrytí celého genomu. Analyzovali jsme vzorky pacientů s CLL, které byly cytogeneticky charakterizovány pomocí fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH). Chromosomální aberace byly nalezeny u téměř 90 % pacientů s B-CLL. Mezi nejvýznamnější změny a současně prognostické markery tohoto onemocnění patří delece 13q14 (geny RB1, miR-15 a miR-16), delece 11q22 (gen ATM), trizomie chromosomu 12 a delece/mutace nádorového supresoru TP53 v lokusu 17p13. Pomocí CGH čipů jsme detegovali všechny cytogenetické aberace zjištěné předchozím vyšetřením, navíc jsme nalezli množství nových, cíleným vyšetřením nezjištěných, změn genomu. Potenciálně velký význam má nově identifikovaný prognostický marker u CLL – krátká delece na cytobandu 22q11 u pacientů s velmi špatnou prognózou.

Metodu profilování genové exprese jsme využili především pro subklasifikaci lymfomů. Vytvořili jsme vlastní design expresního DNA čipu určeného pro odlišení folikulárního lymfomu od jiných maligních lymfomů a pro jeho molekulární a klinickou subklasifikaci. Na základě našich poznatků i recentně publikovaných prací jsme vybrali přibližně 3500 genů, u kterých se dá předpokládat rozdílná exprese u různých lymfomových subtypů. Podařilo se nám identifikovat rozdíly v genové expresi mezi jednotlivými typy lymfomů i mezi subtypy jednotlivých diagnóz. Výsledky ukazují na velký potenciál této metody při stanovení diagnózy a upřesnění prognózy lymfomů.

Čipové technologie mají v lékařské diagnostice nadějnou budoucnost. Umožňují velmi efektivní vyšetření celého genomu a transkriptomu z jediného vzorku DNA nebo RNA. Otevírají tak cestu k účinné a časné diagnostice, prognostice a následné léčbě rakoviny.

Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR NR/9293-3.

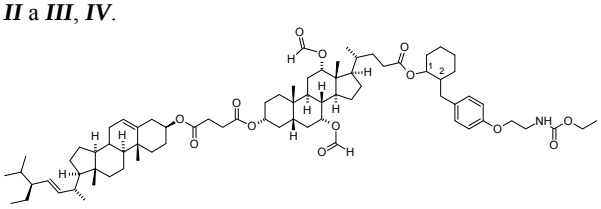
STEROIDNÍ DERIVÁTY BIOLOGICKY AKTIVNÍCH ALKOHOLŮ

HANA SVOBODOVÁ[a,b], ZDENĚK WIMMER[b], ONDŘEJ JURČEK[a,b] a PAVEL DRAŠAR[a]

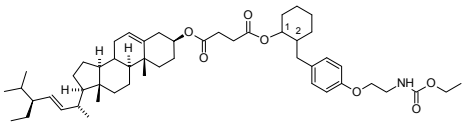
[a] Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6; [b] Isotopová laboratoř, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4 svobodoh@vscht.cz

Cílem práce bylo připravit steroidní deriváty biologicky aktivních alkoholů. Za modelové příklady biologicky aktivních látek jsme si zvolili syntetické bioanalogy juvenilních hormonů, tzv. juvenoidy[1], které ovlivňují morfologii a fyziologii vybraných druhů hmyzu. Použité postupy derivatizace lze ale aplikovat i na jiné biologicky aktivní alkoholy.

Již dříve byly připraveny sloučeniny juvenoidů s některými mastnými kyselinami[2] a sacharidy[3]. V této práci jsme k derivatizaci použili v přírodě se běžně vyskytující steroidy jako jsou cholová kyselina a stigmasterol. Zaměřili jsme se na přípravu konjugátů juvenoidů se steroidní součástí, která se skládá z jedné, či více steroidních jednotek, nicméně jedna z nich je vždy fytosterolem, např. struktury ***I***, ***II*** a ***III***, ***IV***.



I 1,2-*trans*; ***II*** 1,2-*cis*



III 1,2-*trans*; ***IV*** 1,2-*cis*

Derivatizace juvenoidů se provádí za účelem cílené úpravy jejich fyzikálně-chemických vlastností. Předpokládá se, že tyto změny budou mít za následek usnadnění aplikace látky do organismu a zajistí její protrahovaný účinek, neboť biologicky aktivní látka se bude působením hydrolytických enzymů a podmínek prostředí ze struktury postupně uvolňovat. Další výhodou připravených látek je skutečnost, že jejich odbouráváním nevznikají s vyjímkou samotného juvenoidu žádné toxické produkty. Získané struktury navíc představují zajímavé stavební bloky pro výstavbu supramolekul.

Připravené deriváty je možné považovat za aplikační formy analogů juvenilních hormonů a budou testovány na vybraných druzích hmyzu.

Práce vznikla za finanční podpory projektu 2B06024 (NPV II, MŠMT) a výzkumného záměru MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Wimmer Z., Rejzek M., Zarevúcka M., Kuldová K., Hrdý I., Hrdý V., Němec V., Romañuk M.: J. Chem. Ecol. *23*, 605 (1997).
2. Wimmer Z., Šaman D., Kuldová J., Hrdý I., Bennetová B.: Bioorg. Med. Chem. *10*, 1305 (2002).
3. Wimmer Z., Pechová L., Sīle L., Šaman D., Jedlička P., Wimmerová M., Kolehmainen E.: Bioorg. Med. Chem. *15*, 7126 (2007).

EXPRESNÍ PROFILOVÁNÍ SPINOCELULÁRNÍCH KARCINOMŮ V OBLASTI HLAVY A KRKU

JANA ŠÁCHOVÁ[a,b], ZDENĚK ČADA[c], MICHAL KOLÁŘ[a], LUKÁŠ LACINA[c], JAN PAČES[a], KAREL SMETANA[c], HYNEK STRNAD[a], ČESTMÍR VLČEK[a] a VÁCLAV PAČES[a]

[a]Ústav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, [b]Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, [c]Anatomický ústav 1. lékařské fakulty UK, U nemocnice 3, 128 00 Praha 2 sachovaj@img.cas.cz

Náš projekt je zaměřen na identifikaci specifických markerů v nádorové tkáni s možností aplikace v medicínské diagnostice. Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) jsou zhoubné epiteliální novotvary vznikající komplexním procesem maligní transformace buněk epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému. Jsou charakterizovány značnou lokální agresivitou, častými recidivami a vysokou frekvencí výskytu mnohočetných nádorů. HNSCC tvoří 85–90 % všech zhoubných nádorů hlavy a krku. Každým rokem je celosvětově registrováno 500 000 nových případů HNSCC, což je řadí na 5. místo v četnosti zhoubných nádorů člověka. Nejčastěji se setkáváme s postižením dutiny ústní včetně jazyka, hltanu a hrtanu. Klasická léčba těchto nádorů se skládá z operativního zákroku v kombinaci s radioterapií a chemoterapií.

Rychlý rozvoj čipových technologií v posledních letech umožnil paralelní analýzu exprese až několika desítek tisíc genů zároveň v jediném experimentu, což představuje silný nástroj pro onkologický výzkum. Pomocí mikročipového výzkumu lidského transkriptomu byly objeveny nové diagnostické a prognostické markery.

Výchozím materiálem pro naše experimenty je nádorová tkáň, tkáň přilehlá k nádorové a tkáň odpovídající histologicky normální zdravé tkáni získaná z operací spinocelulárních karcinomů. Z důvodů heterogenity HNSCC využíváme laserové záchytné mikrodisekce (LCM), což je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk z tkáňového řezu pro jejich následnou molekulární analýzu. Ze vzorků izolujeme celkovou RNA pomocí RNeasy Micro kitu. Získanou RNA následně spektrofotometricky kvantifikujeme. Vedle koncentrace RNA posuzujeme i její čistotu. Integrita RNA je ověřována pomocí Agilent Bioanalyzeru 2100 a její míra je vyjádřena jako hodnota RIN (RNA Integrity Number). Hodnoty RIN se

výrazně liší pro vzorky získané po disekci a bez disekce, tedy samotné tkáňové řezy. Zkoumali jsme proto vliv disekce na integritu RNA. Vzorky s dostatečnou koncentrací a integritou RNA byly připraveny pro lineární amplifikaci, reakci značení a následnou hybridizaci na čipy. Pro detekci odpovídající sady genů používáme čipy Illumina a Affymetrix. Následně porovnáváme expresní profily nádorové a normální tkáně. Všechny výchozí údaje (pacienti, diagnosy, histologie) i následně získaná data (LCM, izolace RNA, hybridizace aj.) jsou shromažďována v databázi.

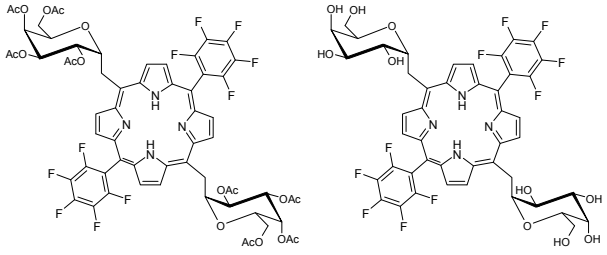
Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics), MŠMT NPVII-2B06106 a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

PŘÍPRAVA A AGREGACE PORFYRINŮ SUBSTITUOVANÝCH V *MESO* POLOZE „SACHARIDOVÝMI“ SUBSTITUENTY

ONDŘEJ ŠIMÁK[a], JAKUB KAMINSKÝ[b] a PAVEL DRAŠAR[a]

[a]Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha ;Technická 5, 166 28 Praha 6, [b]Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR vvi, Flemingovo náměstí 2, 166 10, Praha 6 Ondrej.Simak@vscht.cz

Sloučeniny, ve kterých je aktivní struktura (farmakofor, chromofor …) spojena s vektorem typu peptidového, oligonukletidového, či sacharidového[1] segmentu, vzbuzují stále větší zájem. Použití chirálního polárního vektoru odvozeného od struktury sacharidu předurčuje takovou supramolekulární strukturu jako možný prostředek pro molekulární rozpoznávání v polárním (např. vodném) prostředí. Podobné sloučeniny, odvozené od porfyrinu, jsou díky svým unikátním vlastnostem studovány mimo jiné i jako senzibilizátory pro fotodynamickou terapii či pro silné interakce s DNA a nukleotidy[2].



Byly připraveny konjugáty se spojením porfyrin-sacharid, ve kterých je cukerný skelet připojen k makrocyklu v *meso* poloze pomocí robustní, avšak flexibilní C-C vazby, která je na rozdíl od klasické *O*-glykosidické vazby odolná vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. Pro jejich přípravu byla využita cesta založena na jejich postupné výstavbě z dipyrrolových prekurzorů.

Změny optických vlastností způsobené agregací připravených porfyrinů ve větší celky byly zkoumány UV/VIS a fluorescenční spektroskopií a díky indukci chirality v agregátech i pomocí cirkulárního dichroismu. Interpretací získaných spekter s pomocí metod výpočetní chemie (zejména DFT) byl studován způsob skládání molekul v agregátech a jejich charakter.

Práce byla podporována projekty MŠMT MSM6046137305, 1P04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt a GA ČR 203/06/0006 a grantem NATO CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Mikata Y., Ouchi Y., Tabata K., Ogura S.-I., Okura I., Ono H., Yano S.: Tetrahedron Lett. *8*, 3007 (1998).
2. Sirish M., Schneider H.-J.: Chem. Commun. *2000*, 23.

ŠTRUKTÚRA Na_3AlF_6–Fe_2O_3 A Na_3AlF_6–FeO TAVENÍN: VIAC-JADROVÉ ŠTÚDIUM POMOCOU VYSOKOTEPLOTNEJ NMR TECHNIKY

FRANTIŠEK ŠIMKO[a], CATHERINE BESSADA[b], AIDAR RAKHMATOULLINE[b], VLADIMÍR DANĚK[a] a MIROSLAV BOČA[a]

[a]Ústav anorganickej chémie, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 36 Bratislava; [b] Centre de Recherches sur les Matériaux à Haute Température CNRS, 1D av. de la Recherche Scientifique, 450 71 Orléans, Francúzsko

Uvedené sústavy sa skúmali v rámci výskumu nečistôt, prítomných v procese elektrolytickej výroby hliníka Hall-Héroultovým spôsobom. Medzi nečistoty, ktoré negatívne ovplyvňujú proces výroby hliníka, patrí aj železo. V procese výroby hliníka je prítomné buď vo forme jeho dvoj-, alebo trojmocných iónov, najmä vo forme oxidov ($Fe^{II}O$, $Fe^{III}{}_2O_3$) alebo fluoridov ($Fe^{II}F_2$, $Fe^{III}F_3$). Železo, zlúčeniny železa, negatívne ovplyvňujú proces výroby hliníka. Reagujú so zložkami elektrolytu a tým menia štruktúru elektrolytu a taktiež znižujú prúdovú účinnosť procesu a kontaminujú produkovaný hliník. Z týchto dôvodov bolo potrebné klasifikovať úlohu železa v mechanizme úbytku prúdovej účinnosti, najmä čo sa týka oblasti cyklických redukčno-oxidačných reakcií v elektrolyte.

Po prvý krát sa rozpustnosť oboch oxidov železa v kryolitovej tavenine študovala pomocou vysokoteplotnej NMR techniky. Uskutočnili sa merania rezonančných signálov ^{27}Al, ^{23}Na a ^{19}F izotopov v závislosti od množstva skúmaných oxidov, ako aj v závislosti od doby trvania experimentu, pri konštantnej teplote elektrolytu 1020 °C. Pri oboch sústavách sa dokázal vznik oxofluorohlinitanových, $Al_2OF_6^{2-}$ resp. $Al_2O_2F_4^{2-}$, komplexov. Pri analýze ^{19}F izotopu sa zistilo odlišné správanie sa skúmaných oxidov v kryolitovej tavenine. Pri sústave s dvojmocným železom sa ^{19}F sa dokázal vznik zlúčeniny, obsahujúcej vo svojej štruktúre atómy železa, ktorá odchádza zo systému v parách. Naopak, pri sústave s trojmocným železom vzniká stabilná „Fe“ zlúčenina, ktorá ostáva prítomná v tavenine, pravdepodobne vo forme FeF_6^{3-} iónu.

(NE)PŘÍTOMNOST GLYKOSYLACE U PROTEINŮ SPIROCHET LYMSKÉ BORELIÓZY

JÁN ŠTĚRBA[a], MARIE VANCOVÁ[a,b], NATALIIA RUDENKO[a,b], MARYNA GOLOVCHENKO[a,b], JOHN F. KELLY[c], C. ROGER MACKENZIE[c], SUSAN M. LOGAN[c] a LIBOR GRUBHOFFER[a,b]

[a]Přírodovědecká fakulta JČU v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 37005 České Budějovice; [b]Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav, Branišovská 31, 37005, České Budějovice; [c]Institute for Biological Sciences, National Research Council of Canada, 100 Sussex Drive, K1A OR6 Ottawa, Kanada

Stále větším problémem současnosti jsou takzvané emergentní nákazy (emerging diseases), mezi které patří i klíšťaty přenášená Lymská borelióza. Toto chronické onemocnění, postihující kožní tkáně, klouby, srdce a posléze nervový systém, je způsobeno spirochetami *Borrelia burgdorferi*.

U těchto bakterií byla dosud publikována přítomnost *N*-glykosylace u třech proteinů: membránových proteinů OspA a OspB[1] a bičíkového proteinu FlaA[2]. Ani v jednom případě nebyla určena struktura těchto glykanů.

Při snaze o zjištění složení glykanů těchto boreliárních proteinů jsme však nebyli schopni prokázat přítomnost glykosylace ani u jednoho z těchto proteinů, izolovaných z borelií kultivovaných ve standardních podmínkách, žádnou z použitých metod (Schiffovo barvení, barvení značenými lektiny, lektinová afinitní chromatografie, enzymatická deglykosylace, hmotnostní spektrometrie). Naproti tomu jsou ve vzorcích izolovaných z borelií přítomny glykoproteiny o větší molekulové hmotnosti. Některé z nich jsou patrně složky kultivačního média.

LITERATURA
1. Sambri V., Stefanelli C., Cevenini R.: Arch. Microbiol. *157*, 205 (1992).
2. Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C. A., Charon N. W.: J. Bacteriol. *180*, 2418 (1998).

NOVÝ LEKTIN BCLC Z LIDSKÉHO PODMÍNĚNÉHO PATOGENU *Burkholderia cenocepacia*

ONDŘEJ ŠULÁK[a], MONIA DELIA[a], NIKOLA KOSTLÁNOVÁ[a], ANNE IMBERTY[b] a MICHAELA WIMMEROVÁ[a,c]

[a]Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, Brno; [b]CERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France; [c]Ústav biochemie, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, Brno

Burkholderia cenocepacia je Gram negativní baktérie, kterou lze nalézt prakticky všude v prostředí a je jedním z patogenů tzv. *Burkholderia cepacia* komplexu (BCC). Velké problémy způsobuje pacientům trpícím cystickou fibrózou a chronickým granulomatózním onemocněním. Obecně největší komplikací je tzv. *Cepacia syndrom*, rychle postupující plicní onemocnění, vedoucí často k respiračnímu selhání s fatálními následky.

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které mohou aglutinovat buňky a precipitovat glykokonjugáty. Tyto lektiny specificky rozpoznávají cukerné zbytky obsažené na povrchu buněčných stěn a membrán, a tak mění fysiologii ovlivňující aglutinaci, mitózu a další biochemické změny v buňce. Jejich specifita je obvykle definována monosacharidy a oligosacharidy, které jsou tak i nejlepšími přirozenými inhibitory. Zájem o studium lektinů spočívá v jejich široké paletě vlastností a potenciálních aplikací (zemědělství, farmakologie, imunologie, léčba rakovinového bujení atd.).

Hlavním smyslem této studie je snaha porozumět molekulárním mechanismům, zejména protein – sacharidovým interakcím, které umožňují patogenní bakterii takto napadat, kolonizovat a ovlivňovat fysiopatologii jejich hostitele.

V genomu *B. cenocepacia* byly nalezeny čtyři geny kodující proteinové homology lektinu PA-IIL z *Pseudomonas aeruginosa*, který je jedním z virulentních faktorů tohoto patogenu[1]. Jeden z nich, lektin BclC, byl klonován a připraven v rekombinantní formě. BclC je 28 kDa protein, který je schopen rozpoznávat D-manosylované sacharidové struktury. Sekvenční analýza dále ukázala na přítomnost dvou oddělených domén ve struktuře proteinu. C-terminální část, kóduje lektinovou doménu, zatímco N-terminální část nemá žádného známého sekvenčního homologa v současných genomových či proteinových databázích. Obě domény byly také klonovány zvlášť, což zjednodušuje další strukturně – funkční charakterizace.

Detailní funkční studie pomocí Surface Plasmon Resonance a mikrokalorimetrických metod umožnily charakterizovat vazebné vlastnosti (afinita, specifita) a termodynamické parametry interakce lektinu s vybranými sacharidy.

Znalost afinity lektinu k různým sacharidům, podpořená zároveň i znalostí struktury proteinu může v budoucnu posloužit jako výchozí bod v designu nových a účinných ligandových analogů a inhibitorů. Takovéto studie mohou napomoci k vytvoření koncepce účinného boje proti těmto patogenním agens.

Tato práce byla podporována Ministerstvem školství (MSM0021622413), Grantovou agenturou ČR (303/06/0570) a francouzskou nadací Vaincre la Mucoviscidose.

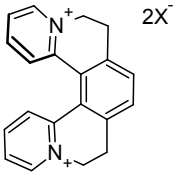
LITERATURA
1. Lameignére, E. Malinovská, L., Sláviková, M., Duchaud, E., Mitchell, E.P., Varrot, A., Šedo, O., Imberty, A., Wimmerová, M.: Biochem. J. (2008) Immediate Publication, doi:10.1042/bj20071276

HELQUAT: SNADNÁ PŘÍPRAVA UNIKÁTNÍHO HELIKÁLNÍHO DIKATIONTU

LOUIS ADRIAENSSENS[a], LUKÁŠ SEVERA[a], TEREZA ŠÁLOVÁ[a], RADEK POHL[a], DAVID ŠAMAN[a], IVANA CÍSAŘOVÁ[b], LUBOMÍR POSPÍŠIL[a], PETR SLAVÍČEK[c] a FILIP TEPLÝ[a,*]

[a]Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha, [b]Katedra anorganické chemie, PřF, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha, [c]Ústav fyzikální chemie, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
teply@uochb.cas.cz

N-Heteroaromatické kationty jsou látky se širokým aplikačním potenciálem. Katalyzátory fázového přenosu, iontové kapaliny, molekulární zařízení, látky pro nelineární optiku, barviva, DNA interkalátory a řada biologicky účinných struktur pochází z této skupiny[1]. Helikálně chirální *N*-heterohelicenia[2] patří v tomto směru k obzvláště atraktivním a dosud opomíjeným species[3].



I helquat

Vyvinuli jsme krátkou syntézu helikálního extendovaného diquatu (helquat), který je reprezentatem originální skupiny vodorozpustných neplanárních organických dikationtů. Třístupňová syntéza čistého vzorku látky ***I*** lze snadno provést bez potřeby chromatografické separace. Syntéza využívá [2+2+2] cykloisomerizační strategie[4], která se ukazuje jako vhodná metoda pro přípravu této slibné skupiny látek. Studovali jsme chování při dvouelektronové redukci látky ***I*** a také kinetiku inverze helixu. Příprava a využití dalších látek z této rodiny je předmětem výzkumu.

Podporováno ÚOCHB AV ČR (výzkumný záměr Z4 055 0506).

LITERATURA

1. Parenty A. D. C., Smith L. V., Guthrie K. M., Long D. L., Plumb J., Brown R., Cronin L.: J. Med. Chem. *48*, 4504 (2005) a citace tam uvedené.
2. Sato K., Arai S., v knize: *Cyclophane Chemistry for the 21st Centur,* str. 186. (Takemura H., ed.), Research Signpost, Trivandrum 2002.
3. Herse C., Bas D., Krebs F. C., Bürgi T., Weber J., Wesolowski T., Laursen B. W., Lacour J.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. *42*, 3162 (2003).
4. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: J. Org. Chem. *63*, 4046 (1998).

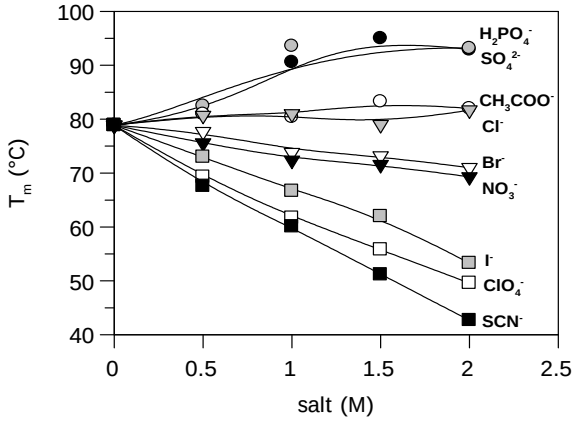
MODULÁCIA LOKÁLNEJ A GLOBÁLNEJ DYNAMIKY FERRICYTOCHRÓMU *c*

N. TOMÁŠKOVÁ, R. VARHAČ a E. SEDLÁK

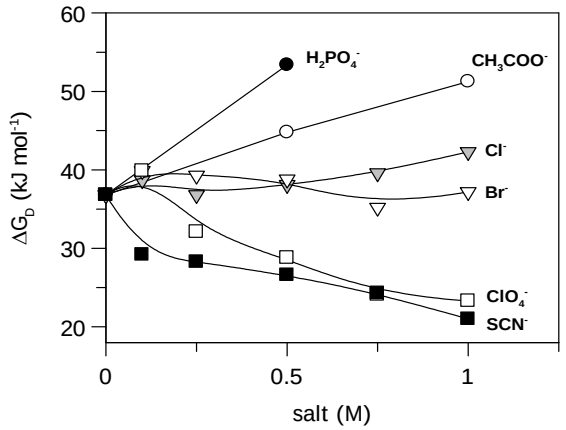
Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice, Slovensko

Dynamika proteínov ovplyvňuje ako globálne (napr. termodynamickú stabilitu) tak aj lokálne (napr. aktivitu) vlastnosti proteínov. Preto je dôležité nájsť vzťah medzi dynamikou a termodynamickými vlastnosťami proteínov. V tejto práci sme sledovali lokálnu dynamiku ferricytochrómu *c* prostredníctvom rýchlosti viazania kyanidu na hémové železo. Zmenu jeho globálnej dynamiky sme monitorovali prostredníctvom zmeny termodynamickej stability v dôsledku teplotnej a izotermálnej denaturácie. Ako modulátory dynamiky proteínu boli použité ióny Hofmeisterovej série.

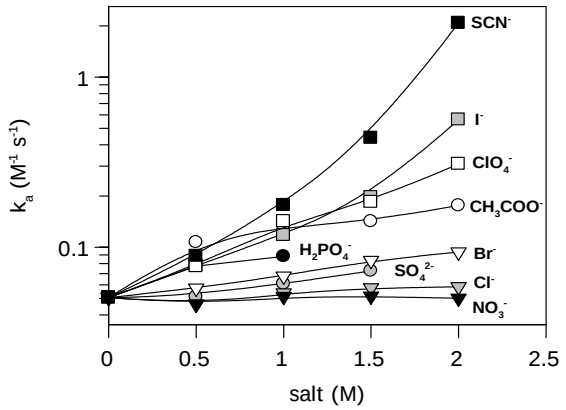
Ukázali sme, že zmena celkovej konformačnej dynamiky proteínu má výrazný vplyv na kinetické a termodynamické parametre reprezentované rýchlostnou konštantou asociácie (k_a) viazania kyanidu, teplotou topenia (T_m) a Gibbsovou voľnou energiou (ΔG_D) izotermálnej denaturácie. Z našich výsledkov vyplýva, že kozmotropné ióny zvyšujú T_m a chaotropné ióny naopak prispievajú k znižovaniu T_m ferricytochrómu *c* (Obrázok 1). Podobným spôsobom sa prejavil účinok iónov aj na hodnoty ΔG_D, kedy sa táto hodnota menila z 36,8 kJ mol^{-1} (bez soli) na 53,4 kJ mol^{-1} (0,5 M NaH_2PO_4, Obrazok 2). V prípade silného chaotropného iónu SCN^-, sa ΔG_D zredukovalo na 21,0 kJ mol^{-1} (1,0 M KSCN). Hodnoty k_a sa pohybovali od 0,051 M^{-1} s^{-1} (bez soli) do 2,08 M^{-1} s^{-1} (2,0 M KSCN, Obr. 3) a korelovali so schopnosťou použitých iónov destabilizovať štruktúru proteínu. Za zmienku stojí, že prítomnosť iónov nijako neovplyvňovala natívnu konformáciu ferricytochrómu *c* pri laboratórnej teplote a pH 6,0. Naše výsledky poukázali na skutočnosť, že anióny Hofmeisterovej série efektívne modifikujú dynamické vlastnosti ferricytochrómu *c* ako aj na to, že existuje blízky vzťah medzi lokálnou stabilitou/flexibilitou a globálnou stabilitou proteínu.



Obr. 1 Závislosť T_m denaturácie ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované pri 396 nm v 50 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0



Obr. 2 Závislosť ΔG_D ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované v 5 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0, 24 °C



Obr. 3 Závislosť k_a viazania kyanidu do ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované pri 418 nm v 50 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0, 24 °C

EKDYSTEROIDY ZVYŠUJÍ VÝTĚŽEK FOTOSYNTETICKÉ FIXACE CO_2

ONDŘEJ UHLÍK[a,b], MAREK KAMLAR[a,b], LADISLAV KOHOUT[a], JURAJ HARMATHA[a] a TOMÁŠ MACEK[a]

[a]Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; [b]VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6
ondrej.uhlik@seznam.cz

Ekdysteroidy jsou nízkomolekulární látky steroidní povahy, jejichž funkcí je regulace celé řady fyziologických procesů u hmyzu, např. svlékání, syntéza kutikuly nebo embryonální vývoj. Nedostatek nebo přebytek těchto látek v těle hmyzu může mít fatální následky. Ekdysteroidy jsou ale hojně syntetizovány i v rostlinách. Jejich funkce ani mechanismus působení v těchto organismech však dosud nebyl dostatečně prozkoumán. Cílem této studie bylo izolovat vazebné bílkoviny ekdysteroidů a přispět tak k objasnění funkce těchto látek v rostlinách.

Výchozím materiálem pro izolaci vazebných bílkovin byl špenát, který obsahuje velké množství ekdysteroidů, především pak 20-hydroxyekdysonu. Tento steroid byl navázán na nosič a vazebné bílkoviny byly z rostlinného materiálu izolovány pomocí afinitní chromatografie. Specificky navázané proteiny byly eluovány změnou pH, elektroforeticky rozděleny a následně identifikovány. Touto metodou se podařilo izolovat dva proteiny odpovídající malé a velké podjednotce enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (RuBisCO), nejrozšířenějšího enzymu biosféry, který je zodpovědný za zabudování oxidu uhličitého do organické hmoty. Na rychlosti této reakce závisí výtěžek celé fotosyntézy. Protože enzym RuBisCO vykazoval afinitu k 20-hydroxyekdysonu, byl dále testován vliv tohoto steroidu na karboxylasovou aktivitu volného enzymu. Tyto testy ukázaly, že je-li 20-hydroxyekdyson vůči enzymu v desetinásobném přebytku, dojde ke zvýšení výtěžku fixace CO_2 katalyzované enzymem RuBisCO o 13 %. Další přírodní ekdysteroidy ajugasteron C, polypodin B nebo směsné ekdysteroidní frakce izolované z kořenů leuzey saflorové (*Leuzea carthamoides*) vykazovaly obdobný účinek jako 20-hydroxyekdyson – pokud byly přidány do reakční směsi, byl výtěžek reakce vyšší o 10–13 %.

Tato studie představuje první případ, kdy byl popsán regulační účinek ekdysteroidů v rostlinách. Zároveň tyto výsledky reprezentují objev nové skupiny regulačních molekul enzymu RuBisCO, jejichž použití by mohlo mít v budoucnu velké využití.

Tato práce byla podporována projekty Z40550506, MSM6046137305 a 1M06030.

KMENE ZELENEJ RIASY *Scenedesmus quadricauda* REZISTENTNÉ K SELÉNU

D. UMYSOVÁ, M. HLAVOVÁ, I. DOUŠKOVÁ, M. VÍTOVÁ a V. ZACHLEDER

Mikrobiologický ústav AV ČR, 379 81 Třeboň

Selén je esenciálny prvok potrebný v diéte mnohých organizmov, vrátane človeka. Medzi jeho nedostatkom a toxicitou je len veľmi malá hranica. Toxicita selénu je spôsobená vznikom reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré poškodzujú DNA. V malých dávkach však selén pôsobí antioxidačne, protirakovinovo, imunostimulačne a chemopreventívne. Štúdie ukazujú, že sa podieľa na detoxikácií ťažkých kovov a organických karcinogénov v organizme a je vo forme peroxidáz jednou z najaktívnejších zložiek antioxidačnej a antiradikálovej ochrany organizmu.

Scenedesmus quadricauda je chlorokokálna jednobunková riasa deliaca sa formou cenóbií. Jej dlhodobým kultivovaním v médiu s vysokou koncentráciou selénu sa nám podarilo vyselektovať kmene odolné voči rôznym formám a koncentráciám selénu. Patentovali sme tri kmene odolné voči vysokým koncentráciám selénu a to buď vo forme selenanu, seleničitanu alebo súčasne obom formám selénu v médiu. Tieto kmene môžu byť vhodným zdrojom

organicky viazaného selénu pre výrobu selénom obohatenej biomasy.

Tento projekt bol podporený grantom GA AV číslo A600200701, projektom EUREKA číslo OE221 a výskumným zámerom číslo AV0Z5020903.

CHITOSAN JAKO PRODRUG FORMA ISONIAZIDU

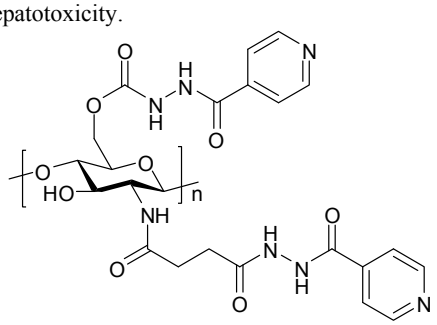
EVA VAVŘÍKOVÁ a JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Polymerní sloučeniny jsou v dnešní době stále častěji využívány jako vhodné biodegradabilní nosiče léčiv. Používají se k pomalému uvolňování účinné složky tedy jako depotní formy, ke zvyšování rozpustnosti a lepší možnosti cíleného podání.

Chitosan patří mezi méně časté polykationtové polysacharidy vyznačující se výjimečnými vlastnostmi, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní[1]. Samotný vykazuje antibakteriální a protinádorovou aktivitu, v poslední době byla publikována též jeho antioxidační aktivita[2]. Tyto jeho vlastnosti z něho činí velmi zajímavý bioaktivní materiál pro farmaceutické a biomedicínské odvětví. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním aspektem je kontrolované uvolňování, cílení léčiva a prodloužení doby působení.

Naše práce se zabývá spojením chitosanu a antituberkulotika první volby isoniazidu, tedy vytvořením prodrug formy, která by byla dobře rozpustná ve vodě a méně hepatotoxická než samotný isoniazid. Pro spojení hydroxylové nebo aminové skupiny s isoniazidem byl vybrán *O*-karboxymethylový[3] nebo *N*-sukcinylanhydridový[4] můstek. K aktivaci byl použit *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N´*-ethylkarbodiimid. V prezentaci budou uvedeny hlavní charakteristiky produktů, vyhodnocení biologické aktivity a popř. hepatotoxicity.



Tato práce vznikla za podpory MSM 0021620822 a GAUK 76807/2007.

LITERATURA
1. Uraganu T., Tokata S. (ed.): *Material Science of Chitin and Chitosan*, Springer, New York 2006.
2. Vavříková E., Vinšová J.: Chem. Listy (2008), posláno do tisku.
3. Fan L., Du Y., Zhang B., Yang J., Zhou J., Kennedy J. F.: Carbohydr. Polym. *65*, 447 (2006).
4. Yan Ch., Chen D., Gu J., Hu H., Zhao X., Qiao M: The Pharmaceutical Society of Japan *126*, 789 (2006).

CHARAKTERIZÁCIA VLASTNOSTÍ MITOCHONDRIÁLNEHO HMG-BOX OBSAHUJÚCEHO PROTEÍNU *Ca*mtHMG1 *Candida albicans*

KATARÍNA VIŠACKÁ[a], JOZEF NOSEK[b] a ĽUBOMÍR TOMÁŠKA[a]

[a]Katedra genetiky a [b]Katedra biochémie, Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina [a]B-1 a [b]CH-1, 842 15 Bratislava
visacka@fns.uniba.sk

Molekuly mitochondriálnej DNA (mtDNA) sú zbaľované do komplexov nazvaných mitochondriálne nukleoidy. Tieto štruktúry sú vyžadované v stabilizácii, udržiavaní a dedičnosti mitochondriálnych genómov. Študovanie ich štruktúry a dynamiky môže prispieť k odhaleniu molekulárnych princípov, ktoré regulujú mitochondriálnu dedičnosť. Hlavným proteínovým komponentom mt-nukleoidov *Saccharomyces cerevisiae* je Abf2p obsahujúci dve *HMG-box* domény umožňujúce viazanie a zbalenie mtDNA[1]. Analýzou genómovej sekvencie kvasinky *Candida albicans* bola zistená prítomnosť otvoreného čítacieho rámca kódujúceho potenciálny mitochondriálny proteín *Ca*mtHMG1 obsahujúci minimálne jednu *HMG-box* doménu a N-koncovú presekvenciu[2]. *Ca*mtHMG1 môže reprezentovať alternatívny typ zbaľovacieho proteínu, ktorého molekulárno-biologické vlastnosti sme skúmali.

LITERATÚRA
1. Diffley J. F., Stillman B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 7864 (1991).
2. Nosek J., Tomáška Ľ., Boloti-Fukuhara M., Miyakawa I.: FEMS Yeast Res. *6*, 356 (2006).

CHARAKTERIZACE VOSKOVÝCH ESTERŮ POMOCÍ MALDI-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

VLADIMÍR VRKOSLAV, MILOSLAV ŠANDA a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
vrkoslav@uochb.cas.cz

Voskové estery, estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů, jsou produkovány téměř všemi rostlinami i živočichy ve směsích s dalšími látkami s nízkou polaritou[1]. Tyto směsi (vosky) plní různé funkce. Vosky tvoří ochrannou vrstvu povrchu těla rostlin a hmyzu. Některé

druhy hmyzu (včely, čmeláci) vytvářejí pomocí speciálních žláz vosk, který využívají pro skladování potravy nebo vývoj larev. Jsou obsaženy také v sekretech, kterými si ptáci mastí peří a savci srst, hlubokomořské organismy je využívají jako zásobárnu energie namísto triacylglyceridů. U člověka hrají důležitou úlohu při ochraně pokožky a slzného filmu oka. Voskové estery našli uplatnění ve farmaceutickém, kosmetickém, potravinářském a elektrotechnickém průmyslu. Základním předpokladem úspěšného výzkumu a využití voskových esterů je dostupnost spolehlivých metod pro jejich analýzu. Nejvyužívanější metodou analýzy je plynová chromatografie. Tato technika je vhodná pro analýzu těkavějších voskových esterů. Zastoupení méně těkavých voskových esterů v přírodních směsích však tímto způsobem odhalit nelze. Hlavním cílem tohoto projektu je najít vhodnou matrici a vyvinout metodu pro charakterizaci přírodních směsí voskových esterů za využití MALDI-TOF, která umožní charakterizovat voskové estery i vyšších molárních hmotností.

Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) a její alkalické soli (^{6}LiDHB, LiDHB, NaDHB, KDHB, RbDHB a CsDHB) byly studovány jako potenciální matrice pro ionizaci voskových esterů. Tyto soli byly připraveny neutralizací DHB příslušnými uhličitany. Standardy voskových esterů poskytovali s matricemi LiDHB, NaDHB a KDHB molekulové adukty $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$. Energie potřebná k jejich tvorbě se vzrůstajícím protonovým číslem alkalického kovu rostla. Odpovídající molekulové adukty voskových esterů při použití matric RbDHB a CsDHB pozorovány nebyly. S DHB se tvořily také molekulové adukty $[M+Na]^+$, očekávané adukty $[M+H]^+$ nebyly pozorovány. Přírodní lithium obsahuje 5 % ^{6}Li a 95 % ^{7}Li. LiDHB připravené z tohoto uhličitanu poskytuje složitější isotopový klastr, což znesnadňuje interpretaci MALDI spektra komplexních přírodních směsí voskových esterů. ^{6}LiDHB se ukázala být nejvhodnější ze studovaných matric pro jednoduchost isotopového klastru a nejvyšší intenzitu signálu poskytovanou při nízké intenzitě energie laseru. Pro ^{6}LiDHB byl optimalizován způsob nanášení matrice a vzorku na terčovou desku. Jako nejvhodnější se ukázala metoda dvou vrstev, kdy byl na povrchu terčové desky z vytvořen povlak z 0,8 μl roztoku matrice (10 mg.ml^{-1}) a na něj byl dávkován stejný objem roztoku vzorku. Byl zjištěn optimální molární poměr vzorku:matrici – 1:100. Za těchto podmínek bylo dosaženo detekčního limitu v oblasti stovek fmol. Za použití techniky fragmentace za zdrojem (PSD) byla měřena fragmentační spektra voskových esterů. Majoritní pík ve spektru odpovídá litnému aduktu kyseliny, která voskový ester tvoří. Vyvinutá metoda byla otestována na řadě přírodních směsí voskových esterů.

Tato práce byla financována z prostředků AV ČR - startovací projekt č. AV0Z40550506-I058.

LITERATURA

1. Hamilton R. J. (ed.): *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press Ltd., Dundee 1995.

BIODEGRADACE PBDE POMOCÍ KONSORCIÍ MIKROOGANISMŮ Z KALŮ ČOV, IDENTIFIKACE PRODUKTŮ A MONITORING EKOTOXICITY

JANA ZLÁMALÍKOVÁ[a], KATEŘINA DEMNEROVÁ[a], MARTINA MACKOVÁ[a], JANA HAJŠLOVÁ[b], JANA PULKRABOVÁ[b] a HANA STIBOROVÁ[a]

[a]Ústav biochemie a mikrobiologie, a [b]Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
zlamalij@vscht.cz

Polybromované difenylethery (PBDE) se řadí mezi bromované retardátory hoření (BFR). PBDE jsou značně lipofilní a perzistentní látky, které mohou být bioakumulovány v tukových tkáních živých organismů[1]. Jsou strukturně podobné polychlorovaným bifenylům (PCB) a dichlordifenyltrichlormethanu (DDT), proto mají podobné chemické vlastnosti[2]. Velké riziko vzniká při jejich spalování, protože mohou vznikat velmi toxické sloučeniny jako polybromované dibenzofurany (PBDF) a polybromované dibenzodioxiny (PBDD)[3]. Ačkoli je jejich akutní toxicita nízká, působí níže bromované kongenery jako endokrinní disruptory, karcinogeny a neurotoxické látky. Také dekabromdifenylether (BDE 209) je klasifikován jako možný lidský karcinogen a existují zprávy o jeho debrominaci na níže bromované kongenery[4]. Proto jsme se rozhodly studovat bioremediaci těchto látek.

V projektu se zabýváme biodegradací PBDE ve vzorcích kalů čistíren odpadních vod (ČOV) jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek. Kromě analýzy obsahu PBDE jsou identifikovány meziprodukty degradace a změna ekotoxicity. Množství PBDE je měřeno plynovou chromatografií (GC/MS-NCI). Ekotoxicita je sledována pomocí tří testů: testu inhibice růstu kořene salátu hlávkového ve vodném výluhu; testu inhibice růstu kořene salátu hlávkového kontaktním testem; stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi bakterie *Vibrio fischeri*. K identifikaci vzniklých meziproduktů degradace využíváme databáze relativních retenčních časů ($RRT_{database}$) vypočtených pro 126 BDE kongenerů[5].

Po provedeném monitoringu kontaminace a ekotoxicity 15 kalů a 13 sedimentů byly pro degradační pokusy vybrány kal ČOV Hradec Králové a kal ČOV Modřice. Po 3 měsících kultivace byl zaznamenán úbytek PBDE u kultivace za aerobních podmínek až o 30 %. Nově vzniklé meziprodukty byly identifikovány jako 4,4'-dibromdifenylether a tribromovaný kongener (koeluce BDE 34, 26, 29 a 32). V průběhu degradačního pokusu byla současně sledována ekotoxicita vzorků.

Autoři děkují Ing. Monice Stavělové za pomoc při získání vzorků kontaminovaných kalů a sedimentů a za finanční podporu projektů MŠMT NPVII 2B06151, GA ČR 104/08/P188 a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. http://www.env.cz/zzp05/c2.htm (staženo 14. 1. 2008).

2. Rahman F., Langford K. H., Scrimshaw M. D., Lester J. N.: Sci. Total Environ. *275*, 1 (2001).
3. Poustka J., Hajšlová J., Kazda R.: *Závěrečná zpráva.* VŠCHT v Praze, Praha 2004.
4. He J., Robrock K. R., Alvarez-Cohen L.: Environ. Sci. Technol. *40*, 4429 (2006).
5. Korytár P., Covaci A., de Boer J., Gelbin A., Brinkman U. A. Th.: J. Chromatogr., A *1065*, 239 (2005).

VÝZKUM BIOSYNTÉZY SLOŽEK SAMČÍCH ZNAČKOVACÍCH FEROMONŮ ČMELÁKŮ DRUHŮ *BOMBUS LUCORUM* A *BOMBUS LAPIDARIUS*

PETR ŽÁČEK[a,b], ANNA LUXOVÁ[a], JIŘÍ KINDL[a] a IRENA VALTEROVÁ[a]

[a]Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; [b]Katedra analytické chemie, PřF UK, Albertov 8, 128 40 Praha 2
zacek@uochb.cas.cz

Tato práce se zabývá studiem biosyntézy složek samčího značkovacího feromonu čmeláků druhů *Bombus lucorum* a *Bombus lapidarius*. Strategie výzkumu byla založena na aplikaci deuterovaných mastných kyselin o různé délce uhlíkového řetězce do abdomenu. Oblast aplikace byla zvolena na základě předpokladu, že jako prekurzory feromonů používají čmeláci mastné kyseliny[1,2] uskladněné ve formě acylglycerolů v tukovém tělese v abdomenu. Značkovací feromon je produkován a uskladňován v cefalické části labiální žlázy[3]. Po 2–4-denní inkubaci značených mastných kyselin byly extrakty labiálních žláz a tukových těles obou druhů analyzovány technikou dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analýzy extraktů těchto orgánů potvrdily přítomnost deuterovaných metabolitů vzniklých z aplikovaných značených kyselin. Byly nalezeny sloučeniny, které dokazují, že enzymatický systém čmeláka byl schopen použít aplikované deuterované látky na syntézu některých složek feromonu. Sloučeniny vzniklé z aplikovaných látek: mono, di a triacylglyceroly, ethylestery, alkoholy, uhlovodíky a rovněž jejich homology vzniklé prodloužením deuterovaného uhlíkového řetězce příslušné aplikované kyseliny. U všech typů nalezených metabolitů byly rovněž objeveny sloučeniny s nasyceným i nenasyceným uhlíkovým řetězcem. Vzniklé sloučeniny ukazují na přítomnost enzymů ve zkoumaných částech čmeláčího těla obou druhů – ethylesteras, desaturas, elongas, reduktas a dekarboxylas.

Analýzy zároveň poskytly data o chování deuterovaných a částečně deuterovaných sloučenin ve dvoudimenzionálním separačním systému a o jejich hmotnostních spektrech.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (číslo projektu: 2B06007) a Grantové agentury Akademie věd České republiky (čísla projektů: A4055403 a Z40550506).

LITERATURA

1. Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A.-B.,Törnbäck B.: Comp. Biochem. Physiol. *88B*, 631 (1987).
2. Luxová A., Valterová I., Stránský K.,Hovorka O., Svatoš A.: Chemecol *13*, 81 (2003).
3. Bergström G., Svensson B. G., Appelgren M., Groth I.: Academic Press, London and New York Vol. *19*, p. 175 (1981).

SIGMA-ALDRICH

REJSTŘÍK **AUTORŮ**

Adameová, Adriana 374
Adriaenssens, Louis 398
Altmannová, Veronika 384
Andronova, Angelina 367
Babák, Vladimír 391
Babčanová, Soňa 377
Babušíková, Eva 367, 375
Bártek, J. 386
Bartoš, Milan 380, 389
Bartošová, Ladislava 380
Bělohradský, Martin 368, 369
Bessada, Catherine 396
Bezouška, Karel 391
Bláha, Luděk 387
Blanářová, Olga 367
Blokešová, Darja 384
Boča, Miroslav 396
Bojarová, Pavla 391
Brichac, Jiri 368
Buděšínský, Miloš 370
Budka, Jan 382
Buchta, Michal 368
Burketová, Lenka 381
Bystrický, Slavomír 372
Císařová, Ivana 382, 398
Clemence, Nathan 367
Cvačka, Josef 379, 400
Čada, Zdeněk 395
Čejka, Jiří 369
Damborský, J. 387
Daněk, Vladimír 396
Dekoj, Václav 369
Delia, Monia 397
Demel, Jan 369
Demnerová, Kateřina 401
Dobrota, Dušan 367, 390
Doležal, Karel 373
Doležílková, Ivana 370
Doubek, Michael 394
Doušková, I. 399
Dračínský, Martin 370
Drašar, Pavel 386, 395, 396
Drobcová, B. 371
Dvořák, P. 387
Dvořáková, Hana 382
Eigner, Václav 382
Eignerová, Barbara 371
Farkaš, Pavol 372
Fedoročko, Peter 373, 379
Fodor, József 381
Frei, E. 381
Galiová, Gabriela 372
Gažák, Radek 391
Gemrotová, Markéta 373
Glogarová, Milada 380
Golovchenko, Maryna 375, 397
Grada Kuliková, Lucia 373
Grubhoffer, Libor 375, 390, 397
Grznárová, P. 374
Gunišová, S. 374
Hajšlová, Jana 401
Hajzlerová, M. 392
Hampl, A. 384
Harčárová, Anna 374
Harmatha, Juraj 399
Hatok, Jozef 367, 375, 390
Henke, Adam 380
Hlavová, M. 399
Hodek, Petr 388
Hofmanová, J. 367
Holčáková, Jitka 377
Holý, Petr 368
Honzatko, Ales 368
Horáčková, Jana 375
Hošek, Jan 380
Houser, Josef 376
Hroudová, Miluše 376
Hrstka, Roman 377
Hublarová, Pavla 377
Chaloupková, R. 387
Chocholoušová, Jana 378
Chrastilová, Zuzana 370, 378
Imberty, Anne 397
Ivančaková, R. 393
Janiczek, Oldřich 376
Jendželovský, Rastislav 379
Jiroutová, A. 392
Jonsztová, Beata 386
Jun, Daniel 389
Jurček, Ondřej 395
Jurečeková, Jana 375
Kaftan, Filip 379
Kaminský, Jakub 396
Kamlar, Marek 399
Kanta, J. 392
Kello, Martin 379
Kelly, John F. 397
Kindl, Jiří 402
Kirschnerová, Renáta 367
Kiššová, I. 371
Klán, Petr 387
Kliment, Ján 390
Kliment, Ján ml. 390
Klvaňa, M. 387
Kohout, Ladislav 398
Kohout, Michal 380
Kolarov, J. 371
Kolář, Michal 395
Kolorz, Michal 380
Kopecký, Jan 390
Korbelová, Barbora 381
Kostlánová, Nikola 397
Kotik, Michael 368
Kotora, Martin 370
Kotrba, Pavel 385
Kotrbová, V. 381
Kovaľ, Ján 379
Kozubík, A. 367, 384, 393
Köhlerová, R. 392
Král, Vladimír 378
Kramara, J. 374
Krejčí, Lumír 384
Krejčík, Zdeněk 376
Křen, Vladimír 391
Křenek, Karel 391
Křenek, Peter 374
Kuča, Kamil 389
Kuglík, Petr 394
Kundrát, Ondřej 382
Kuznetsov, Yurii 372
Kuželová, Magdaléna 374
Lacina, Lukáš 395
Lamač, Martin 382
Langrová, Tereza 383, 391
Lhoták, Pavel 382
Lincová, E. 384, 393
Lipnická, Šárka 368, 369
Lipov, J. 374
Logan, Susan M. 397
Ludwig, Jost 378
Luxová, Anna 402
Macek, Tomáš 370, 385, 399

Mackenzie, C. Roger 397
Macková, Martina 370, 378, 385, 391, 401
Maixnerová, Jana 384
Maletínská, Lenka 384
Marini, Victoria 384
Matáková, Tatiana 375, 390
Matulová, Petra 384
Mayer, Jiří 394
McPherson, Alexander 372
Mentel, M. 371
Mikeš, Jaromír 379
Mistrík, M. 386
Míšek, Jiří 378
Mokrý, J. 393
Moserová, M. 381
Nagata, Y. 387
Najmanová, Jitka 385
Nalivaeva, Natalia 367
Nenutil, Rudolf 377
Nisler, Jaroslav 385
Nosek, Jozef 392, 400
Novák, Petr 388
Nováková, Zdena 386
Novotná, Vladimíra 380
Obšil, Tomáš 388
Opluštilová, L. 386
Pačes, Jan 395
Pačes, Václav 376, 395
Palumbo, Giuseppe 373
Park, Sang-Eon 369
Pavlíková, Nela 387
Pavlová, M. 387
Pernicová, Z. 384, 393
Petrovič, Pavol 388
Pešlová, Kateřina 388
Picklo, Matthew J. 368
Pohanka, Miroslav 389
Pohl, Radek 398
Pojarová, Michaela 382
Polčic, P. 371
Pospíšil, Lubomír 398
Pospíšilová, Šárka 394
Pražáková, Veronika 389
Pulkrabová, Jana 401
Račay, Peter 375
Rakhmatoulline, Aidar 396
Rídl, Jakub 376
Rudenko, Nataliia 375, 397
Ruml, Tomáš 372, 374
Růžek, Daniel 390
Rybáček, Jiří 368
Ryšánek, Dušan 383, 391
Sedlák, E. 398
Severa, Lukáš 398
Sivoňová, Monika 375, 390
Skládal, Petr 389
Sládek, Zbyšek 383, 391
Sláma, Petr 383, 391
Slámová, Kristýna 391
Slavíček, Petr 398
Slavkovský, R. 392
Smetana, Karel 395
Smreková, Eva 392
Sobotka, L. 392
Souček, K. 367, 384, 393
Soukup, T. 393
Sova, P. 367
Spíchal, Lukáš 373, 385
Staněk, Ondřej 394
Staňo Kozubík, Kateřina 394
Stará, Irena G. 367, 378
Staršíchová, A. 384, 393
Starý, Ivo 367, 369, 378
Stibor, Ivan 382
Stiborová, Hana 401
Stiborová, M. 381
Strnad, Hynek 376, 395
Strnad, Miroslav 373, 385
Suchánek, J. 393
Svoboda, Jiří 380
Svobodová, Hana 395
Šáchová, Jana 395
Šálová, Tereza 398
Šaman, David 398
Šanda, Miloslav 379, 400
Šebesta, Marek 392
Šebo, Peter 394
Šimák, Ondřej 396
Šimko, František 396
Šimšová, Marcela 394
Šmerdová, Tamara 377
Šťastná, Hana 390
Štěpnička, Petr 369, 382
Štěrba, Ján 397
Šulák, Ondřej 397
Šulc, Miroslav 388
Teplý, Filip 398
Tibor, Füzik 372
Tichý, Boris 394
Tomáška, Ľ. 374
Tomáška, Ľubomír 392, 400
Tomášková, N. 398
Turner, Anthony 367
Uhlík, Ondřej 399
Ulbrich, Pavel 372
Umysová, D. 399
Vacek, Jaroslav 378
Vaculová, A. 367
Valent, Ivan 388, 392
Valentová, Olga 381
Valterová, Irena 402
Vancová, Marie 390, 397
Vančo, Ján 389
Varhač, R. 398
Vavříková, Eva 400
Velebný, V. 392
Vinšová, Jarmila 400
Višacká, Katarína 400
Víšek, B. 393
Vítová, M. 399
Vlček, Čestmír 376, 395
Vojta, Petr 376
Vojtěšek, Bořivoj 377
Vrkoslav, Vladimír 400
Wade, R.C. 387
Williams, Spencer J. 391
Wimmer, Zdeněk 395
Wimmerová, Michaela 376, 397
Zahradník, Ivan 388
Zahradníková, Alexandra 388
Zachleder, V. 399
Zatloukal, Marek 373
Zima, Jiří 368
Zlámalíková, Jana 401
Zouharová, Monika 383, 391
Žáček, Petr 402
Železná, Blanka 384

ÚOCHB AV ČR

May 27, 2008

Invited Lecture Series

Topic: Geminal Fluorination

Theoretical Studies of the Schizophrenic Effects of Geminal Fluorination on Organic Reactions: Explanations and Predictions

Dolbier and coworkers have found that geminal fluorination has a large effect on lowering the barrier to *cis–trans* isomerization of 1,2-dimethyl-cyclopropane. Lemal and coworkers have shown that geminal fluorination actually stabilizes [2.2.2]propellane toward ring opening. In order to understand these very different effects of geminal fluorination, *ab initio* calculations have been performed and, from the results, explanations proposed and experimentally testable predictions made.

Speaker: Professor Wes Borden

Department of Chemistry
University of North Texas, Denton, Texas, USA

ÚOCHB AV ČR

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.
Flemingovo nám. 2, Praha 6

Lecture Hall 10:00 am

information: stara@uochb.cas.cz

Česká společnost chemická
Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5
116 68 Praha 1
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778
e-mail: chem.spol@csvts.cz
http://www.csch.cz

Proč se stát členem České společnosti chemické

Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS , GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.
Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.

Česká společnost chemická · Univerzita Palackého
Statutární město Olomouc · SIGMA-ALDRICH – hlavní sponzor

SIGMA-ALDRICH

60. JUBILEJNÍ SJEZD ASOCIACIÍ ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Olomouc 1. – 4. září 2008

Program:
Pondělí 1.9.
Moravské divadlo 15:00 – 22:00
Slavnostní zahájení
J.-M. Lehn: ***From Supramolecular Chemistry to Constitutional Dynamic Chemistry***
Večer na uvítanou
Úterý 2.9.
Regionální centrum Olomouc 8:30 – 16:00
Irena Valterová: ***Biosyntéza hmyzích feromonů***
Ľubor Fišera: ***1,3-Dipolárne cykloadície chirálnych nitrónov a ich využitie v syntéze***
Přednášky v sekcích, minisymposia, soutěž „Cena SHIMADZU“
Umělecké centrum Univerzity Palackého 16:30 – 23:00
Plakátová sdělení
Výstava firem (Umělecké centrum Univerzity Palackého)
Setkání u moravských vín
Středa 3.9.
Regionální centrum Olomouc 8:30 – 18:00
Miloslav Frumar: ***Rychlé reversibilní změny amorfní-krystalická fáze a nové materiály pro optické a elektrické paměti vysoké hustoty***
Karel Lemr: ***Hmotnostní spektrometrie – od elektrického výboje k zobrazování tkání***
Přednášky v sekcích, minisymposia
Regionální centrum Olomouc 19:00 – 22:00
Vyhlášení vítězů plakátových sdělení a společenský večer, k tanci a poslechu hraje cimbálová muzika Poljanka
Čtvrtek 4.9.
Exkurze, výlety (www.ckpressburg.cz)

Termíny:
Uzávěrka abstraktů je 15. 4. 2008.
Přijetí abstraktu je podmíněno uhrazením registračního poplatku do 31. 5. 2008.

www.sjezd2008.upol.cz

OBSAH

ÚVODNÍK 313

REFERÁTY

Tvorba fibrinu a jeho degradace 314
R. Kotlín a Jan E. Dyr

Cyklus Na^+ iónov u bakterií a Methanoardchaea 319
Z. Nováková a P. Šmigáň

Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách 327
P. Hulín, P. Dostálek a I. Hochel

Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami 338
M. Skokanová a K. Dercová

Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti 346
P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza a T. Vaněk

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Vliv dlouhodobého užívání pervitinu na metabolismus vápníku a fosforu v kostech 353
S. Jirsáková, R. Pikner a V. Vyskočil

Tribotechnická diagnostika v prevádzke použitých olejov I. Metódy hodnotenia častíc opotrebovania v olejoch 358
J. Mihalčová a H. Al Hakim

ZPRÁVY 363

RECENZE 364

VIII KONFERENCE SIGMA-ALDRICH 365

CONTENTS

EDITORIAL 313

REVIEW ARTICLES

Fibrin Formation and Degradation 314
R. Kotlín and Jan E. Dyr

Cycle of Sodium Ions in Bacteria and Methanoarchaea 319
Z. Nováková and P. Šmigáň

Methods for Determination of Gluten Proteins in Food 327
P. Hulín, P. Dostálek, and I. Hochel

Interactions of Humic Acids with Contaminants 338
M. Skokanová and K. Dercová

Fytoremediation and Possibilities of Increasing Its Effectivity 346
P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza, and T. Vaněk

LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS

The Effect of Long-Term Pervitine Abuse on Calcium and Phosphorus Metabolism 353
S. Jirsáková, R. Pikner, and V. Vyskočil

Tribotechnical Diagnostics in Waste Oil Operation I. Methods of Evaluation of Wear Particles in Oils 358
J. Mihalčová and H. Al Hakim

NEWS 363

BOOK REVIEWS 364

VIII SIGMA-ALDRICH CONFERENCE 365

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 102 (2008), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 132, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 118 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohlav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámostný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: http://www.chemicke-listy.cz • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy •

Copyright © 2008 Chemické listy/Česká společnost chemická •

Cena výtisku 153 Kč, roční plné předplatné 2008 (12 čísel) 1570 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 785 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 83 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 63 EUR (doručování via SCHS), 234 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: M. Pojarová • Dáno do tisku 28.4.2008.