BIOPROSPECT

Osmnáctý ročník
Číslo 1/2008

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN

BIOTECHNOLOGICKÉ

SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu vědeckotechnických společností (ČSVTS)
a
člena „European Federation of Biotechnology" (EFB)

Redakční rada

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Petra Lipovová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

http://bts.vscht.cz

B
I
PROSPECT

18th Volume
No. 1/2008

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitaly important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive commitee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:
Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 445 137
e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítám Vás v prvním čísle 18. ročníku bulletinu naší Biotechnologické společnosti a chtěl bych Vás pozvat na některé akce, které se uskuteční v blízké budoucnosti. Nejbližší akcí je 4th Swiss-Czech Symposium (4. Švýcarsko-České symposium), jehož hlavním tématem je „Biopharmaceuticals: why use yeast", ale projednávána budou i další biotechnologická témata. Jak již většinou víte, symposium se uskuteční ve dnech 22. a 23. května ve Wadenswill, blízko Zurichu. Stále se na něj ještě můžete přihlást. Na dalších stránkách se setkáte s upoutávkou, která Vás vyzývá k účasti. Bližší informace najdete na webové stránce www.biotech2008.ch nebo www.swiss-czech.net .

*Nejbližší domácí akcí bude již tradiční seminář o geneticky modifikovaných organismech zaměřený letos opět na jejich méně známé aplikace. V přednáškách se zaměříme na některé možnosti aplikace transgenních rostlin , např. k výrobě protilátek a dozvíme se i něco o moderních směrech v biotechnologiích a v mikrobiologii. Seminář nazvaný „**Novinky v aplikaci genetických modifikací**" se uskuteční ve středu **28. května 2008 na VŠCHT v Praze** v posluchárně BII od 13 hod. Program semináře bude oznámen na webových stránkách naší společnosti a zaslán všem zapojeným do e-mailového servisu.*

Další mezinárodní akcí, kterou znovu připomínáme, je 13. mezinárodní biotechnologické symposioum a výstava (13th International Biotechnology Symposium & Exhibition) v čínském Dalianu, které se bude konat 12. – 17. října 2008. Bližší informace naleznou zájemci na webových stránkách http://www.ibs2008.org. Potravináři zřejmě dají přednost 14. světovému kongresu potravinářské vědy a technologie (14th World Congress of Food Science and Technology), který se koná o týden později v čínské Šanghaji, 19. – 23. října 2008. Informace na http://www.iufost2008.org.

V příštím roce bude významnou událostí v Praze 34th FEBS Congress (Kongres Evropské federace pro biochemii a molekulární biologii), který se bude konat ve dnech 4. – 9. července 2009 v kongresovém centru v Praze 4. Bližší informace o kongresu naleznete na www.febs2009.org. Pro potravinářskou a zemědělskou odbornou veřejnost bude jistě zajímavé symposium „Biochemical processes in food and feed improvement".

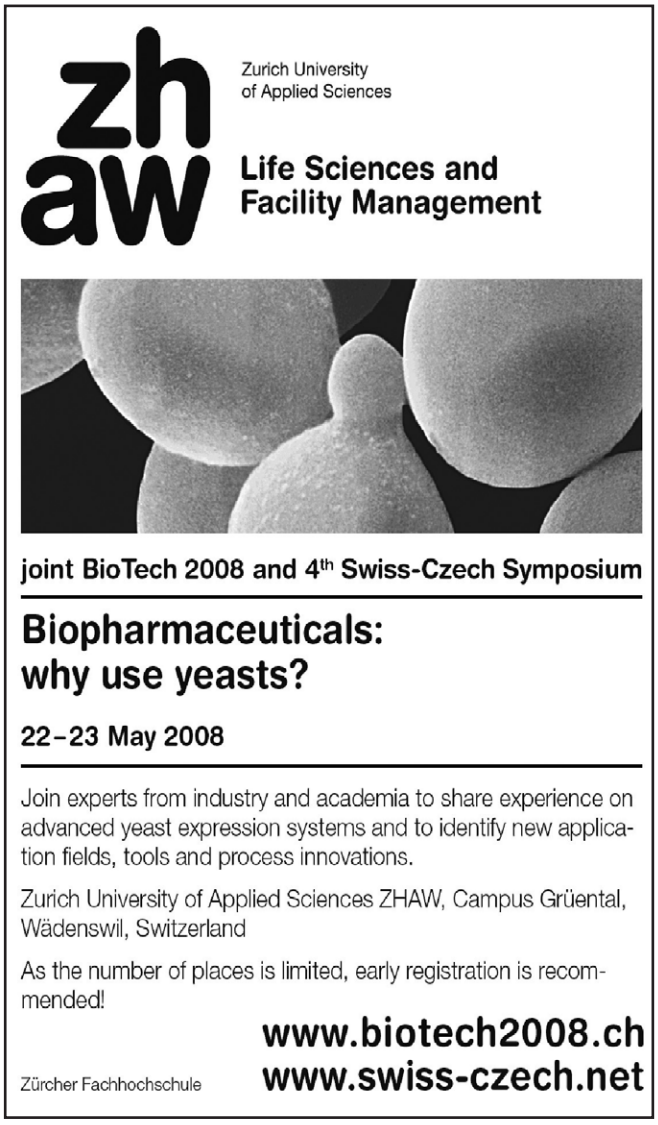
I v tomto čísle pokračujeme ve snaze poskytnout Vám články na velmi rozdílná témata, abyste zde všichni našli něco zajímavého k přečtení. Tentokrát se dozvíte něco rozvoji velmi nebezpečného nádorového onemocnění kůže – maligním melanomu, něco z biotransformací a biodegradací i z potravinářské biotechnologie (o laktobacilech).

Informujeme Vás také o Biotechnologickém a biomedicinském centru AV ČR, které bude vybudováno ve Vestci u Prahy.

Těším se na další spolupráci s Vámi a zejména na Vaše příspěvky.

Se srdečnými pozdravy

Váš, Jan Káš



BIOCEV – BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR

V projektu BIOCEV (**BIO**technologické a biomedicínské **CE**ntrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve **V**estci) propojily své výzkumné i lidské potenciály dvě vedoucí výzkumné instituce České republiky, Akademie věd a Univerzita Karlova. Společným cílem obou partnerů je vybudování celoevropsky významného centra excelence ve Vestci u Prahy, orientovaného (jak už název napovídá) na špičkový biotechnologický a biomedicínský výzkum, především proteinové a tkáňové inženýrství. Vzniklé Centrum bude plně integrováno do Evropského výzkumného prostoru (ERA) a zapojí se do sítě výzkumných infrastruktur ESFRI (European Strategic Forum on Research Infrastructures).

Šest výzkumných institucí na straně Akademie věd společně s dvěmi fakultami Univerzity Karlovy (1. Lékařská fakulta a Přírodovědecká fakulta) zakládají nový typ partnerství a spolupráce, vytvoří nezisková zájmové sdružení právnických osob, jež bude platformou pro přípravu projektu. AV ČR pro tento projekt zakládá nový Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., vznikající k 1. 1. 2008 z Biotechnologického sektoru Ústavu molekulární genetiky AV ČR, který bude hlavní součástí a do budoucna aplikačně patrně nejvýznamnějším členem Centra. Hlavní myšlenkou projektu je vybudování společné výzkumné základny, která bude využívána nejen pracovníky institucí účastnících se přípravy a realizace projektu, ale bude přístupná všem zájemcům z akademické sféry. Svou úrovní technologické vybavenosti a svým personálním obsazením bude BIOCEV plně integrovaný do evropského výzkumného prostoru, v němž ve vytčených oblastech výzkumu bude sloužit jako „národní až nadnárodní sdílené výzkumné zařízení". Plánované je pořízení infrastruktury a technologických celků napojených na kapacity budované v EU ve směrech vytčených ESFRI (např. myší klinika napojená na síť INFRAFRONTIERS, nebo zařízení pro proteinovou krystalografii zařazené do Integrated Structural Biology Infrastructure.

Orientovaný výzkum centra excelence BIOCEV ve Vestci bude rozvíjet do aplikací především vědecké výstupy nejvýznamnějšího centra základního výzkumu v molekulární a buněčné biologii a biomedicíně (ústavy AV ČR a IKEM v Krči), jež se nachází ve vzdálenosti 5 km od lokality ve které AV ČR zakoupila pro projekt BIOCEV pozemek o rozloze 5,5 ha.

BIOCEV bude mít dvě hlavní výzkumná střediska. Centrum buněčné biologie a molekulárních biotechnologií, jehož hlavními garanty jsou Biotechnologický ústav AV ČR a Přírodovědecká fakulta UK, se bude zabývat zejména molekulární a buněčnou biologií, proteinovým a buněčným inženýrstvím. Nejdůležitějšími garanty druhého centra, Centra tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny, budou Ústav experimentální medicíny AV ČR, 1. Lékařská fakulta UK a Ústav makromolekulární chemie AV ČR, jejichž předmětem zájmu bude zejména výzkum zobrazovacích metod, biologie a využití kmenových buněk a polymerních materiálů a biomateriálů pro tkáňové náhrady.

Velký důraz je již při přípravě projektu kladen na přenos technologií a výsledků výzkumu a na spolupráci s firemním sektorem. BIOCEV se stane zdrojem nového poznání a aplikovatelného duševního vlastnictví a součástí projektu je i centrum pro valorizaci výsledků výzkumu, zahrnující středisko ochrany duševního vlastnictví, přenosu technologií a 'business development unit'. Členové BIOCEV již mají navázanou spolupráci s více než dvaceti průmyslovými partnery v oborech své působnosti a špičkové přístrojové vybavení, unikátní infrastruktura a možnost rychlé realizace výsledků výzkumů ve spolupracujících podnicích podpoří schopnost centra katalyzovat vznik dalších spin-off firem a přilákat do BIOCEV řadu špičkových mladých vědeckých pracovníků, jak českého původu, tak ze zemí EU a v neposlední řadě i ze zemí třetího světa. S biotechnologickými společnostmi které již sídlí ve Vestci bude založen biotechnologický klastr, který přizve k členství a spolupráci high-tech biotechnologické společnosti z ČR. Díky přímé účasti fakult Univerzity Karlovy a vzdělávacím a školícím programům se BIOCEV stane zdrojem špičkových specialistů pro základní i aplikovaný biotechnologický výzkum a pro moderní biologický průmysl v ČR. BIOCEV tak významně přispěje k rozvoji zaměstnanosti, k udržitelnému ekonomickému růstu a ke konkurenceschopnosti regionu Středočeského kraje i celé ČR.

Peter Šebo
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

FOTOTRANSFORMACE A BIOTRANSFORMACE STILBENICKÝCH SLOUČENIN

Irena Kolouchová, Lenka Moravcová
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Přirozeně se vyskytující stilbeny jsou substituované sloučeniny se dvěma benzenovými kruhy spojenými alifatickým dvouuhlíkatým řetězcem se strukturou C_6-C_2-C_6. Deriváty stilbenu se vyskytují jako volné sloučeniny nebo jako glykosidy. Jako přirozená barviva rostlin nemají prakticky žádný význam, ale řada sloučenin vykazuje významné biologické vlastnosti. Uplatňují se například jako antimikrobiání látky, kterými se napadená rostlina brání nepříznivému vlivu mikroorganismů. Napadení pak vyvolává zvýšenou tvorbu těchto obranných látek. Některé stilbeny se proto řadí mezi fytoalexiny.

Resveratrol je přírodní látka rostlinného původu vyskytující se zejména v hroznech révy vinné (*Vitis vinifera*) a následně i ve víně. V rostlinách vzniká jako odezva na stres vyvolaný mechanickým či mikrobiálním působením a je tudíž z chemo-ekologického hlediska typickým fytoalexinem. Chemicky jde o látku polyfenolického charakteru stilbenového typu (3,4′,5-trihydroxystilben), která se vyskytuje ve dvou izomerních formách s *cis*- (*Z*) nebo *trans*- (*E*) uspořádáním substituentů na dvojné vazbě. Resveratrol, v přírodních zdrojích převládající jako *trans*-izomer, vykazuje celou řadu biologických aktivit[1,2]. Je považován za nejúčinnější složku pozitivně ovlivňující arteriosklerotické změny a koronární onemocnění srdce. Je nejvíce zkoumaným funkčním faktorem tzv. francouzského paradoxu[3].

Pinosylvin (3,5-dihydroxystilben) a pterostilben (3,5,-dimethoxy-4′-hydroxystilben) jsou strukturními analogy resveratrolu. Oba se taktéž vyskytují v *cis*- a *trans*- isomerních formách. Pinosylvin se nachází v listech, kůře a dřevě mnoha různých stromů. Je produkován během přeměny bělové části dřeva na jádrovou. Jeho zvýšená produkce a akumulace v jádrovém dřevě byla zjištěna jako odpověď na zranění nebo kolonizaci mikrobiálními patogeny. Pterostilben má podstatně vyšší fungicidní aktivitu než ostatní 4-hydroxystilbeny. V nepřítomnosti tohoto stilbenu podléhají lesní porosty houbové nákaze. Na rozdíl od resveratrolu však nebyl identifikován působením plísně *Botrytis cinerea*, ale infekcí *Plasmopara viticola*.

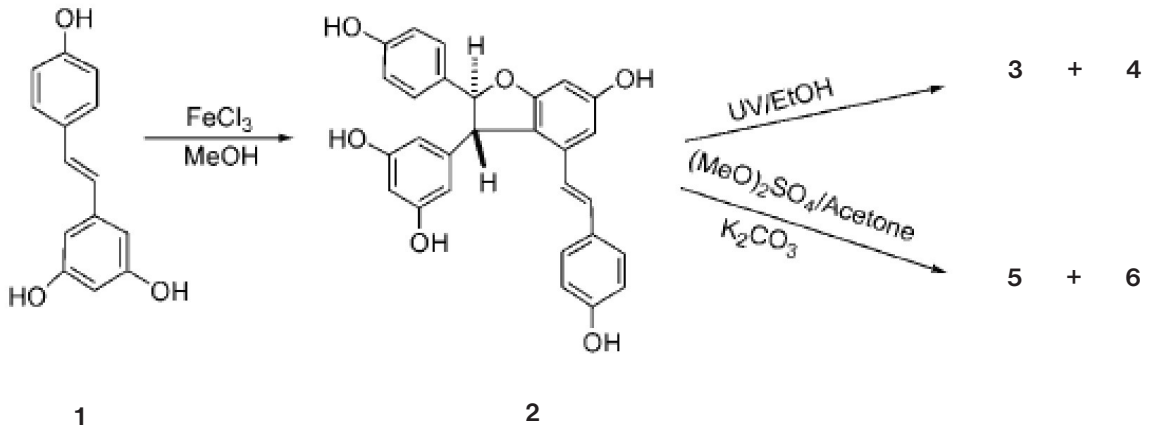
Bylo zjištěno, že vlivem denního rozptýleného světla a UV záření dochází u resveratrolu k fotoizomeraci a fototransformaci, jejímiž produkty jsou *cis* izomery, dimery, trimery a další oligomery[1]. Důvodem výzkumu je zájem o poznání nových biologických vlastností resveratrolu, které se předpokládají i u jeho strukturně modifikovaných sloučenin[4,5]. Některé oligostilbeny totiž vykazují širší biologické účinky než jejich monomery.

Fototransformace stilbenických sloučenin

Fotooxidační reakce *trans*-ε-viniferinu

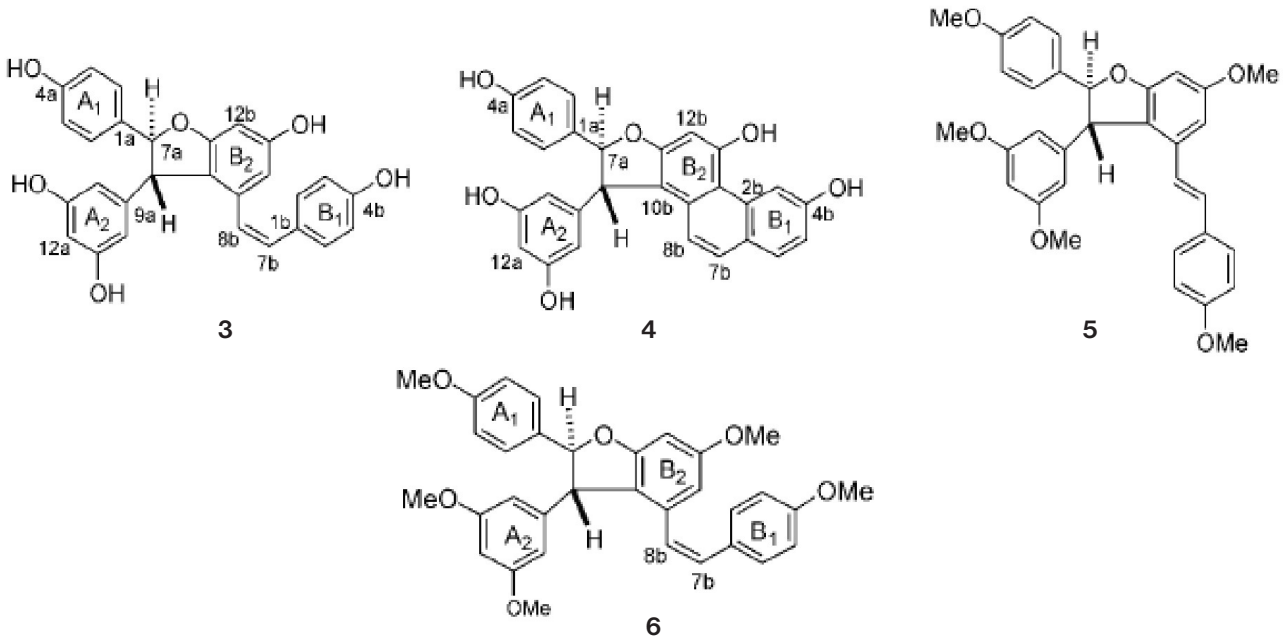
Některé oligostilbeny vykazují širší a účinnější biologickou aktivitu než jejich monomery. Dříve se izolovaly z přírodních zdrojů, ale dnes se úspěšně připravují synteticky. V roce 1998 Ito a spol.[6] přeměnili (+)-*trans*-vitisin A z *Vitis coignetiae* na jeho *cis* izomer, (+)-*cis*-vitisin A, fotochemickou reakcí. Další úspěšně provedenou fotoizomerací byla přeměna znázorněná na Obr. 1. a 2. (cit.[7]).

Produkty **3**, **4**, **5** a **6** byly testovány z hlediska farmakologických účinků. Při koncentraci 10^{-5} mol.l^{-1} těchto látek byly inhibiční poměry ε-TNF (faktor odumření tumoru) 51,43 %, 36,64 %, 12,73 % a 7,81 %. Bylo zjištěno, že sloučeniny **3** a **4** na rozdíl od sloučenin **5** a **6** vykazují inhibiční vlastnosti, z čehož vyplývá, že pro tuto



1 2

Obr. 1. Fotoizomerace *trans*-ε-viniferinu.



Obr. 2. Struktury sloučenin **3 – 6**:
trans-resveratrol (**1**), *trans*-ε-viniferin (**2**), *cis*-ε-viniferin (**3**), 2b,14b-dehydro-bisresveratrol (**4**), pentamethoxyl *trans*-ε-viniferin (**5**), pentamethoxy-*cis*-ε-viniferin (**6**).

aktivitu je důležitá přítomnost fenolických hydroxylů a *cis* olefínové vazby ve struktuře molekuly.

Fotooxidační reakce UV zářením

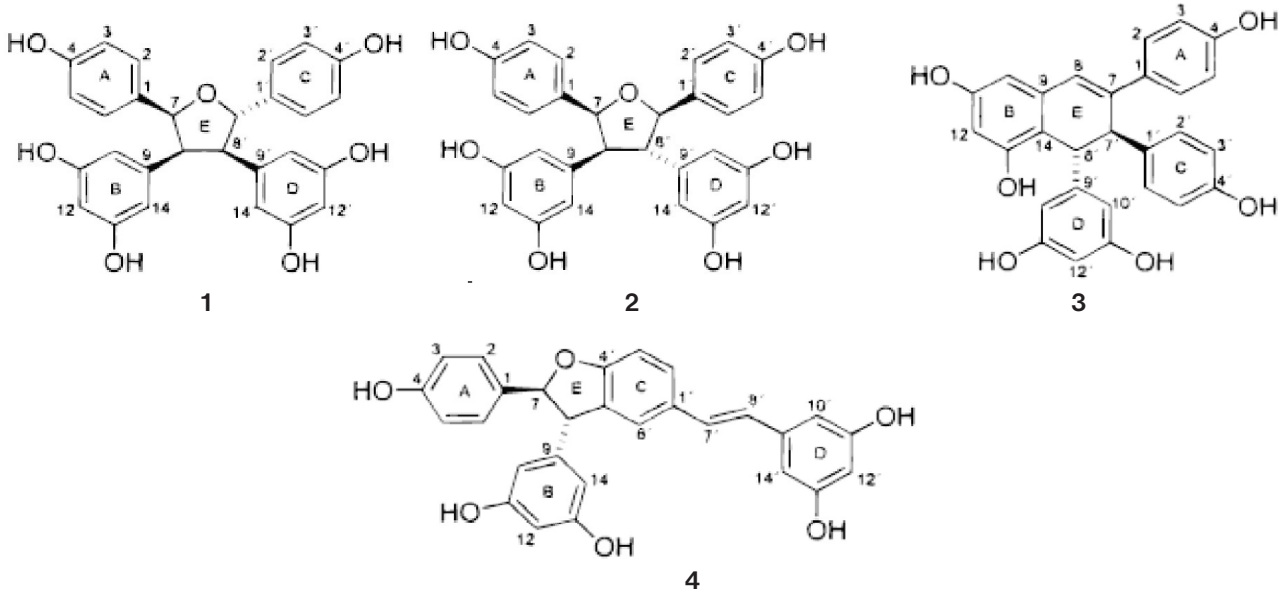
Deak a spol.[8] prováděli fotoizomeraci *trans*-resveratrolu pomocí UV lampy (Hanau TQ 150 Z2 UV-lamp). Fotoizomerační výtěžek z *trans*-resveratrolu na *cis* byl asi 90 % aniž by byla zaznamenána tvorba vedlejších produktů. Fotoizomerace probíhala pod argonovou atmosférou a rozpouštědlem byl methanol. Použitím rozpouštědla DMSO (dimethylsulfoxid) docházelo ke tvorbě neznámých barevných vedlejších produktů.

Kromě UV záření byla izomerace zkoušena i pomocí tepelných účinků. Předběžné experimenty ukázaly, že nejvhodnější teplota pro studium tepelných rovnováh je okolo 80 °C. Pokusy tedy probíhaly při teplotě 81, 83 a 85 °C a při nich zjištěnými rychlostními konstantami $9{,}0.10^{-6}$, $1{,}7.10^{-5}$ a $2{,}7.10^{-5}$ s^{-1}. Hodnota aktivační energie byla spočítána na 280 kJ/mol.

Rozdíl mezi oběma izomery v Gibbsově energii byl stanoven na 11 – 14 kJ/mol. Vysoká hodnota aktivační energie naznačuje, že se *cis* izomer nebude z důvodu tepelné rovnováhy v přírodě běžně vyskytovat.

Biotransformace resveratrolu

Fyziologická funkce resveratrolu v rostlinách není stále zcela jasná. Tvorba fytoalexinů (*trans*-resveratrolu a jeho derivátů) je jedním z mechanismů rezistence buňky v podmínkách ekologického stresu. Při napadení révy vinné plísněmi (např. *Botrytis cinerea* či *Plasmopara viticola*) nebo po expozici UV zářením se začnou tvořit a akumulovat obranné látky fytoalexiny.



Obr. 3. Struktura sloučenin: restrytisol A-C (**1** – **3**), resveratrol *trans*-dehydrodimer (**4**).

Dimerizace resveratrolu

Víno napadené vinným patogenem *Botrytis cinerea* produkuje fytoalexin resveratrol, který se hromadí v blízkém okolí botrytidové infekce. Se stoupající hladinou resveratrolu ve tkáni se snižuje šíření infekce *Botrytis cinerea*. Patogenita této plísně pozitivně souvisí s tvorbou oxidas „blue-copper" známé jako stilbenoxidasy nebo lacasy (lacasy jsou polyfenolové oxidasy katalyzující reakce fenolických substrátů).

Výsledkem kultivace *Botrytis cinerea* ATCC 11542 s resveratrolem byly tři nové (restrytisol A-C, **1**-**3**) a tři již známé dimery (resveratrol *trans*-dehydrodimer (**4**), leachinol F a pallidol) (Obr. 3.). Baňky s kulturou byly během kultivace zakryté hliníkovou fólií, aby byly chráněné před světlem a umožněnou izomerací[9].

Deriváty resveratrolu z kořenů *Vitis thunbergii*

Kořeny révy Thunbergovy jsou na Taiwanu tradičně používány na léčbu průjmů, zlomenin a úrazů, žloutenky a hepatitidy. Bylo zjištěno, že rostliny rodu *Vitis thunbergii* obsahují resveratrolové oligomery. Huang a spol.[10] z těchto kořenů izolovali tyto deriváty: vitisinoly A-D (**1**-**4**) (Obr. 4.), (+)-ε-viniferin, (-)-viniferol, ampelopsin C, miyabenol A, (+)-vitisin A a (+)-vitisin C.

Vitisinol A byl získán jako hnědý prášek, vitisinol B jako žlutohnědý prášek. Struktura těchto sloučenin byla stanovena pomocí spektroskopické analýzy (NMR, MS).

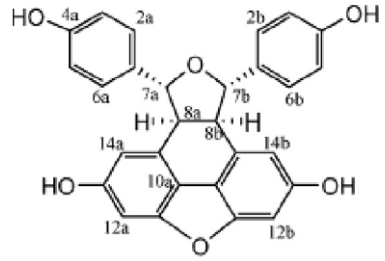
Biotransformace pomocí *Bacillus cereus*

Resveratrol je možné transformovat na jeho glukosidovanou formu resveratrol-3-O-ß-D-glukosid, tzv. piceid, kultivací s bakterií *Bacillus cereus* UI 1477. Tato grampozitivní bakterie se vyskytuje jak v půdě, vodě, vzduchu, tak i v různých rostlinách.

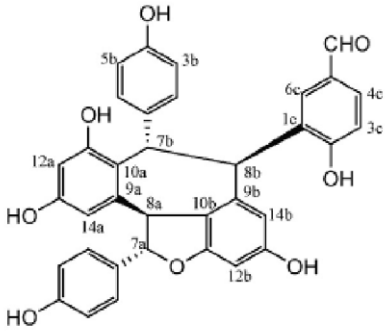
Bylo zkoumáno celkem 12 mikrobiálních kultur z hlediska jejich schopnosti biotransformovat resveratrol. Piceid vznikal pomocí buněčné suspenze *Bacillus cereus* s 11 % výtěžkem[11].

Syntéza *trans*-dehydrodimerů pomocí lacasy

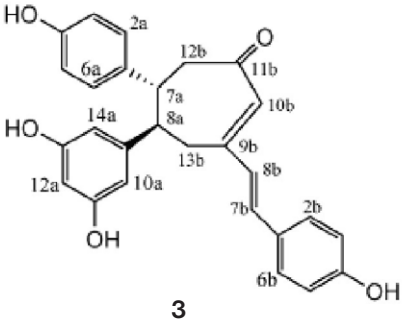
Nicotra a spol.[12] oxidovali resveratrol pomocí enzymů lacas, které byly izolovány z mikroorganismů *Myceliophtora thermophyla* a *Trametes pubescens.* Lacasy neboli oxidoreduktasy se vyskytují v některých houbách, bakteriích a vyšších rostlinách. Katalyzují oxidaci fenolických sloučenin při výdaji molekulárního kyslíku. Aktivní centrum těchto enzymů tvoří kovové seskupení ze 4 atomů Cu, zapojených do redoxního procesu radikálového cyklického mechanismu. Oxidace fenolických derivátů závisí na změně redoxního potenciálu mezi cílovou sloučeninou a tzv. T1-Cu. Lacasy vykazují výjimečnou substrá-



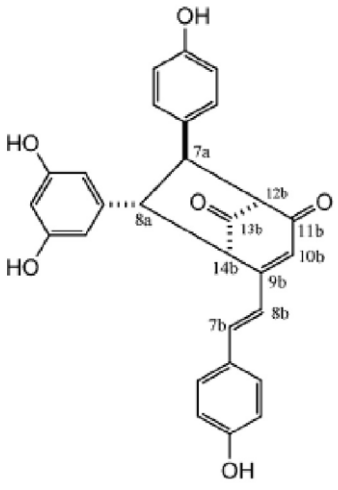
1



2



3



4

Obr. 4. Struktura vitisinolů A-D (**1**-**4**).

tovou přizpůsobivost, a proto jsou vhodné biokatalyzátory pro mírnou oxidaci organických sloučenin.

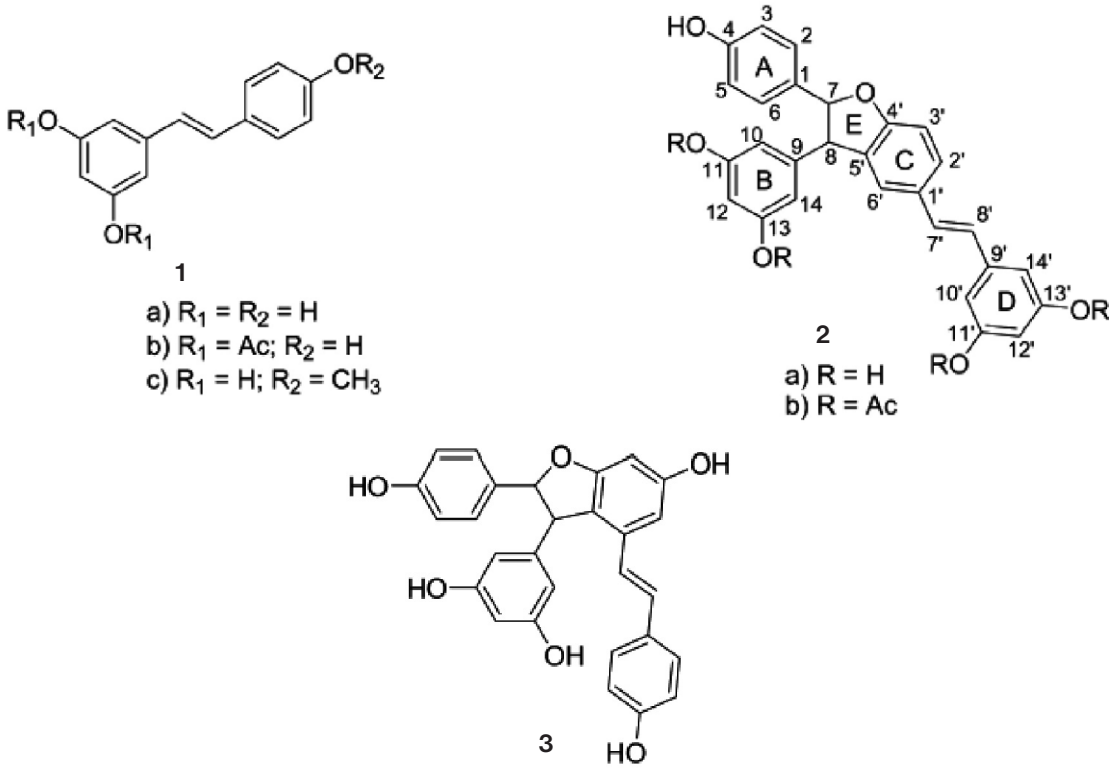
Struktura dehydrodimeru (**2a**, Obr. 5.) ukázala, že dimerizační reakce probíhá výhradně přes fenoxyradikál odvozený ze 4'-OH skupiny *trans*-resveratrolu (**1a**). Dalším důkazem je, že 4'-O-methyl resveratrol (**1c**) nereaguje za stejných reakčních podmínek, zatímco 3,5-diacetylovaný derivát (**1b**) je oxidován za vzniku trans-dehydromeru.

Oxidace *trans*-resveratrolu, katalyzovaná laccasou z *Myceliophtora thermophyla,* poskytuje dehydrodimer (**2a**), žlutou amorfní látku pevného skupenství získánou v 31 % výtěžku. Oxidace *trans*-resveratrolu, katalyzovaná laccasou z *Trametes pubescens,* poskytuje dehydrodimer v 18 % výtěžku.

Závěr

Bylo zjištěno, že fototransformací dochází ke vzniku množství dimerů, trimerů i tetramerů, které jsou ale odlišné od látek vznikajících biotransformacemi. Převážně jde o strukturní analogy přírodních látek, které jsou vhodné k dalšímu biologickému testování a vzájemnému porovnávání jejich biologických vlastností. Je možné, že vzniklé produkty budou mít ještě výraznější vliv jako ochranné látky např. proti stresovým faktorům jak na buňky tak i na lidský organismus.

Tato práce vznikla za podpory GAČR (projekt č. 203/07/1227).



Obr. 5. Struktura dehydrodimerů.

Literatura:

1. Kolouchová I.: Disertační práce. VŠCHT Praha, FPBT, ÚKCHB, 2003.
2. Šmidrkal J., et al.: Resveratrol. Chem. Listy, 2001, 95, 602-609.
3. Jones F.: Víno, každý den sklenku pro zdraví. 1. vyd. Praha, 1998.
4. Harmatha J.: Cyklus organická chemie. Fenylpropanoidy, lignany a jejich biologické účinky. 1. vyd. svazek 27.Praha: ÚOCHB AV ČR., 2002. 133-142.
5. Harmatha J., Dinan L.: Phytochem. Rev., 2003, 2, 321-330.
6. Ito J., et al.: Tetrahedron, 1998, 54, 6651-6660.
7. Yao Ch., Lin M., Wang Y.: Chinese J. Chem., 2004, 22, 1350-1355.
8. Deak M., Falk H.: Monatshefte fur Chemie, 2003, 134, 883-888.
9. Cichewicz R.H., Hamann M.T.: J. Nat. Prod., 2000, 63, 29-33.
10. Huang Y.L. et al.: J. Nat. Prod., 2005, 68, 217-220.
11. Cichewicz R.H., Kouzi S.A.: J. Nat. Prod., 1998, 61, 1313-1314.
12. Nicotra S., et al.: Tetrahedron, 2004, 60, 595-600.

BIOLOGICKÁ DEGRADACE POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

Veronika Sochorová
Laboratoř aplikované biologie, FPBT, VŠCHT Praha

Problémy spojené s životním prostředím a ekologií jsou stále častěji diskutovány a dostávají se do popředí jako otázka, kterou je nutno řešit. Kontaminace okolního prostředí látkami antropogenního původu je jedním z nejvážnějších ekologických problémů. Zvlášť závažnou kontaminací tvoří látky hydrofobního charakteru jako například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH). V současné době je nutné považovat za alarmující signifikantní nárůst koncentrací PAH v osídlených oblastech s vysokou mírou technické, průmyslové a ekonomické vyspělosti. Hlavním zdrojem PAH je především nedokonalé spalování organické hmoty, spalování tuhých a kapalných paliv, provoz motorových vozidel či některé průmyslové technologie (např. karbonizace uhlí, krakování ropy, apod.)[1,2,3,4,5].

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) se skládající ze dvou a více fúzovaných aromatických jader s konjugovaným systémem dvojných vazeb[3,4,6]. PAH lze řadit mezi perzistentní kontaminanty životního prostředí, tj. kontaminanty s vysokou stabilitou vůči chemickým, fyzikálním a biologickým účinkům okolí, schopné dlouhodobě setrvávat, cirkulovat a kumulovat se v ekosystému[3,6]. Díky nepolárnímu charakteru a relativně vysoké molekulové hmotnosti je rozpustnost PAH ve vodných roztocích značně limitovaná. Stejně jako ostatní nepolární xenobiotika se PAH výrazně sorbují na nerozpuštěných částech prostředí, kde je jejich koncentrace již nezanedbatelná[3,4,5,7]. Mnohé PAH patří také mezi patogeny s karcinogenními a mutagenními vlastnostmi[3,8]. PAH jako značně lipofilní látky mají tendenci tvořit koncentrační deponie v lipidických tkáních savčích buněk. Biotransformační dráhu PAH lze tradičně rozčlenit na dvě principielně odlišné fáze I. a II., reakce na úrovni I. fáze bývá obvykle oxidace či hydroxylace (zapojuje se nejčastěji monooxygenasy např. cytochrom P-450 epoxid-hydrolasa, glutathione-transferasa, UDP-glukuronosyltransferasa, sulfotransferasa, NAD(P)H-chinon-oxidoreduktasa, aldo-keto-reduktasa apod.)[2,3, 9]. Vzniklé epoxidy či fenoly mohou být dále metabolizovány reakcemi II. fáze, kdy dochází nejčastěji ke konjugacím s endogenními látkami jako jsou kyselina glukuronová, glutathion či kyselina sírová[2,3]. Z primárních oxidovaných meziproduktů biotransformace – epoxidů mohou sledem navazujících reakcí II. fáze vznikat dihydrodioly, které jsou dále metabolizovány konjugačními reakcemi či další oxidačními reakcemi směrem k více polárním látkám, které lze snáz vyloučit[2,3,10]. Nicméně v průběhu enzymatických reakcích, majících za cíl xenobiotikum transformovat, do co nejvíce rozpustné formy, mohou vznikat nestabilních a reaktivních intermediáty, které atakují DNA. Poškození DNA může být pro buňku toxické a může docházek k nesčetným buněčným změnám[9].

Vzhledem ke zvýšeným koncentracím PAH v životním prostředí, jejich perzistenci a toxicitě je jejich eliminace předmětem řady studií snažících se predikovat fyzikálně-chemické procesy a biodegradační dráhy ovlivňující jejich osud. Zapojení PAH do metabolického aparátu degradující buňky může probíhat jak v přítomnosti tak v nepřítomnosti kyslíku[10,11]. Anaerobní procesy jsou vývojově starší a mikroorganismy jejich pomocí získávají menší množství energie než při aerobní disimilaci. Aerobní způsob respirace je vývojově mladší a vyvinul se z anaerobních dehydrogenací[12]. Degradace PAH v aerobním režimu je díky příznivému časovému horizontu a možnosti kompletní mineralizace substrátu až na oxid uhličitý a vodu upřednostňována oproti režimu anaerobnímu, kde degradace aromatických uhlovodíků probíhá velmi pomalu a pro úplnou mineralizaci uhlovodíků je často nutný tzv. „respirační stupeň"[13].

Za aerobních podmínek slouží kyslík v katabolickém rozkladu PAH jednak jako terminální akceptor elektronů, které jsou uvolňovány během oxidace organické molekuly, jednak jako reaktant a to při primárním ataku uhlíkatého skeletu aromatického kruhu[13]. Využívání molekulového kyslíku v mikrobiálních katabolických cestách mikrobiálního metabolismu je podmíněno přítomností specifických enzymatických katalyzátorů – oxygenas (monooxygenasy a dioxygenasy)[13]. Iniciačním krokem v aerobní metabolické dráze PAH většiny bakterií je inkorporace molekuly kyslíku pomocí multisložkového dioxygenasového enzymatického komplexu za vzniku *cis*-dihydrodiolu[13,14,15]. Tato sloučenina je následně stereoselektivně dehydrogenována (rearomatizována) pomocí *cis*-diol dehydrogenasy a vzniká široká škála dihydroxylovaných intermediátů. Dihydroxylované sloučeniny mohou být dále štěpeny dioxygenasami *ortho*- či *metha*- drahou až na finální produkty trikarboxylové kyseliny, které následně vstupují do Krebsova cyklu a jsou dále metabolizovány[10,12,14,15].

Jak je popsáno výše, PAH mohou být kompletně degradovány za aerobních podmínek. Do současnosti byla popsána celá řada mikroorganismů (*Alcaligenes denirificans*, *Mycobacterium* sp., *Psedomonas putida*, *P. florescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, P. cepacia, P. *testosteroni*, *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio* sp. and *Cyclotrophicus* sp.), u nichž byla pozorována degradace naftalenu až na finální metabolity – oxid uhličitý a vodu. Mezi fenanthren degradující bakterie patří např. *Aeromonas* sp., *Alcaligenes faecalis*, *A. denitrificans*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Beijerinckia* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *P. paucimobilis*, *Rhodococcus* sp., *Vibrio* sp., *Nocardia* sp., *Flavobacterium* sp., *Streptomyces* sp. and *Bacillus* sp[2]. Existují také novodobé studie snažící se nalézt takové druhy mikroorganismů, popřípadě konsorcia, která by dokázala otevřít stabilní struktury vyšších aromátů tj. aromátů se čtyřmi cykly a výše[2].

Přestože je aerobní degradace PAH velice rozšířenou bioremediační technologií, je nutné si uvědomit i řadu úskalí, kterým může sanační proces se zapojením biodegradačního potenciálů aerobních mikroorganismů čelit. Jedna z technických překážek může spočívat v nedostatečné aeraci sanované lokality, zvláště, jedná-li se o sanaci sedimentů, kde zóna s dostatečnou koncentrací kyslíku se omezuje pouze na povrchovou vrstvu sedimentu. Tato povrchová vrstva mnohdy nedosahuje tloušťky více než 1 až 10 mm a kontaminace PAH je tak odsouzena k setrvání v silně anoxických podmínkách[16,17]. Možnost zapojení nucené aerace anaerobní zóny je velice nákladná technika a je nutno počítat s limitovanou rozpustnopstí kyslíku ve vodných prostředích[16]. Aromáty tedy mohou být také kompletně degradovány za anaerobních podmínek, ale tento proces je daleko pomalejší ve srovnání s aerobní degradací[10,11,17,18]. Aplikovatelnost anaerobní degradace PAH není omezena pouze pro matrici sedimentů, ale lze ji jak dokumentují některé práce aplikovat i na jiné matrice a systémy jako takové, které nemají dostatečnou koncentraci kyslíku. Jako akceptory alektronů jsou v procesu anaerobního metabolismu zapojeny např. nitráty, sulfáty, železité kationty, kde koncepce mikrobního metabolického aparátu dovoluje katabolizovat takové sloučeniny jako je benzen, tolulen, ethylenbenzen a xylen (BTEX)[10,11,16,17]. Je známo, že sloučeniny s více kondenzovanými aromatickými jádry jsou stabilní vůči ataku anaerobního metabolismu mikroorganismů[16,17]. Vysoká stability PAH znesnadňuje primární štěpení aromatického kruhu bez přítomnosti kyslíku a v předešlých letech byla anaerobní degradace PAH považována za absurdní. V současné době existují práce, kde mono-aromatické uhlovodíky stejně jako PAH, je možno kompletně degradovat za anaerobních podmínek[16]. Anaerobní mineralizace aromátů často vyžaduje směsnou mikrobní komunitu, která vzájemně spolupracuje, ačkoliv každý mikroorganismus může vyžadovat různý oxido-redukční potenciál. Počáteční transformace v takových systémech jsou často prováděny fermentativně a jejich výsledným produktem bývají aromatické kyseliny, které jsou dále transformovány na acetát, CO_2 a formiát[10]. Tyto malé molekuly mohou být utilizovány methanogenními mikroorganismy. Dosud není zcela jasné, jak takováto kooperující komunita řeší problém s požadavkem na různé oxido-redukční potenciály v těsné blízkosti. Je zřejmé, že vyšší oxido-redukční potenciály jsou vyžadovány pro degradaci komplexnějších substrátů jako je benzoát[10,11]. Menší organické kyseliny nebo alkoholy jsou degradovány za nižšího oxido-redukčního potenciálu. V některých případech je možno dosáhnout nejlepších výsledků při použití sledu anaerobně-aerobní degradace[10]. Anaerobní metabolismus je také daleko citlivější na možnou substituci a její stupeň v rámci aromatické struktury polutantu[11].

Mezi kmeny schopné kompletně mineralizovat aromáty za aerobních podmínek patří *Holophaga foetida*, *Sporobacter termidis*, *S. olearium* a *Parasporobacterium paucivorans*[12]. Během redukčních podmínek probíhá biodegradace organických molekul za účasti anaerobní respirace mikroflóry, částečně může docházet také k jevu disimilační denitrifikace, kterou lze zaznamenat především za vyššího oxido-redukčního potenciálu, kde nitrátové ionty hrají úlohu elektron akceptorů[18]. U naftalen, fenanthrenu, ethylbenzenu a pyrenu jsou popsány kompletní metabolické dráhy až na finální oxid uhličitý za denitrifikačních podmínek. Naftalen a fenantren může být také kompletně mineralizován za sulfátreduktivních podmínek, které jsou ovšem velmi specifické pro sulfátredukující bakterie a za tak anoxických podmínek pak sulfát funguje jako akceptor elektronů[18].

Se zvyšující životní úrovní také roste míra znečištění životního prostředí polyaromatickými cyklickými uhlovodíky. Je třeba mít na paměti jejich nebezpečí pro organismus a podnikat takové kroky, které by v první řadě snižovaly jejich produkci a v řadě druhé využívat vždy takové technologie, které nám umožní výrazně snížit jejich koncentraci v okolním prostředí.

Literatura:

1. Barra R., Castillo C., Torres J.P.: *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, 191, 1-12 (2007).
2. Samantha S.K., et al.: *TRENDS Biotechnol.*, 20 (6), 243-248 (2002).
3. Červinka O., et al.: Organická chemie sloučenin. SNTL Praha, 1985.
4. Mikošková J., Čáp L., Lemr K.: *Chem. Listy*, 98, 80-85 (2004).
5. Pitter P.: Hydrochemie. VŠCHT v Praze, 1999. ISBN 80-7080-340-1.
6. Pacák J.: Jak porozumět organické chemii, UK Praha, 1997, ISBN 80-7184-261-3.
7. U.S. Environmental Protection agency: <http://www.epa.gov>, 21.11.2007.
8. Horák J., et al.: Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. VŠCHT v Praze, 2004, ISBN 80-70-80-548-X
9. Shimada T.: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21 (4), 257-275 (2006).
10. Mrozik A., et al.: *Polish J. Environ. Stud.*, 12, 15-25 (2003).
11. Mechichi T., Patel B.K.C., Sayadi S.: *Int.. Biodeter. Biodegr.*, 56, 224-230 (2005).
12. Siglová, M.: http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/biodegrdbiodet.pdf , 21.10.2007.
13. Horáková, D.; Němec, M.: http://www.mub.prf.cz/sylaby/LCFII.pdf, 21. 3. 2005.
14. Cajthaml T., Pacáková V., Šašek V.: *Chem. Listy*, 95, 404-410 (2001).
15. Habe H., Omori T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 225-243 (2003).
16. Rockne K.J., Strand S.E.: *Environ. Sci. Technol.,* 32, 3962-3967 (1998).
17. Coates J.D., Anderson R.T.: *TIBTECH*, 18, 408-412 (2000).
18. Ambrosoli R., et al.: *Chemosphere*, 60, 1231-1236 (2005).

MALIGNÍ MELANOM: UPLATNĚNÍ ADHEZIVNÍCH MOLEKUL A PROTEINŮ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX V ROZVOJI ONEMOCNĚNÍ

Daniela Plánská[1,2], Vratislav Horák[2]
[1]Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2
[2]Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., 277 21 Liběchov

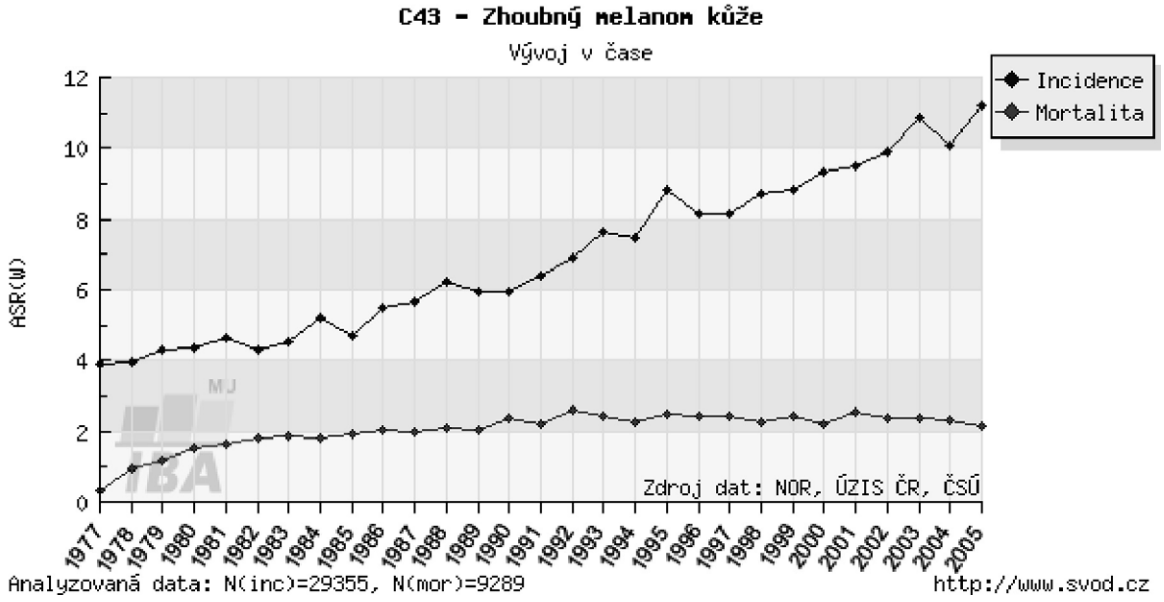
Melanom je nejagresivnější formou kožních nádorů a také nejčastější příčinou smrti u dermálních malignit. V celosvětovém měřítku narůstá jeho výskyt u bělochů o 2,5-4 %. Ze srovnávací studie provedené v roce 2002 a prezentované na webovém portálu „Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice" (www.svod.cz), která vychází z údajů Národního onkologického registru ČR a Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC), vyplývá, že ze 172 zemí hodnocených dle výskytu pacientů s melanomem (přepočteno na 100 000 obyvatel) zaujala první místo Austrálie následovaná Novým Zélandem. V těchto lokalitách byla incidence melanomu zhruba 3-4 krát vyšší než u nás. Ve zmíněném srovnání obsadila Česká republika nelichotivé 9. místo, pokud jde o muže, a 15. místo v „kategorii" žen. Ze zveřejněných údajů je zřejmé, že celosvětový trend růstu výskytu melanomu platí rovněž pro ČR (Obr. 1.). Při porovnání jednotlivých krajů byl melanom nejčastěji nalezen u obyvatel Prahy, za niž se zařadil Plzeňský a Jihomoravský kraj (Obr. 2.), tedy lokality s odlišnou strukturou průmyslu, zemědělství i krajinné ekologie. Odhalit všechny příčiny vedoucí ke vzniku melanomu se zatím nepodařilo. Za hlavní rizikový faktor je považováno opakované nadměrné slunění (při kterém se uplatňuje především UV-složka slunečního záření), jež vede až ke „spálení" pokožky. Zhruba 10 % melanomů vykazuje dědičný charakter. Dosud byly odhaleny dva kandidátní geny (CDKN2A, CDK4), jejichž mutace podmiňují familiární výskyt melanomu.

Klinický obraz melanomu

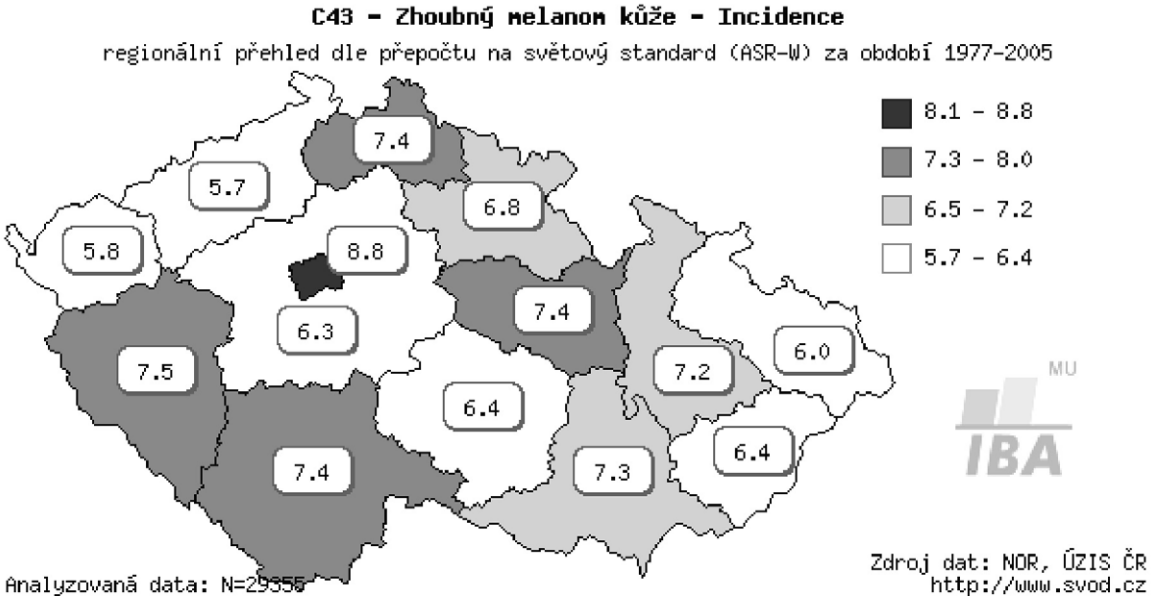
Kožní melanom se vyskytuje kdekoli na těle, ale nejčastěji je diagnostikován u žen na dolních končetinách a u mužů na trupu. Jeho klasickými klinickými znaky jsou barevná nejednotnost, změna velikosti, povrchu, ulcerace (zvředovatění), krvácení a svědění.

Melanomové metastázy jsou nejčastěji nalézány v plících, játrech, mozku a v lymfatických uzlinách. Vzácně se mohou vyskytovat i v jiných viscerálních orgánech např. v srdci, nadledvinkách, slezině, vaječnících a prostatě. Selhání životně důležitých orgánů v důsledku diseminace nádoru je hlavní příčinou smrti postižených jedinců.

Při časném stanovení diagnózy je melanom léčitelný až u 95 % pacientů. Metastazující melanom však znamená pro více jak 85 % nemocných jistou smrt. Základní léčebnou metodou je chirurgický zákrok. K léčbě metastazujícího melanomu se v současné době užívá řada dalších terapií. S ohledem na relativní rezistenci melanomových buněk představují chemoterapie a radioterapie stále jen paliativní postupy. Poměrně slibných výsledků bylo dosaženo různými formami imunoterapie (např. aplikací interferonů, interleukinu-2, aktivací autologních dendritických buněk nebo cytotoxických T-lymfocytů *in vitro* a poté jejich přenos pacientovi). Tyto postupy jsou však vysoce nákladné a pouze ve stádiu experimentálních studií, či v prvních fázích klinického ověřování.



Obr. 1. Časový vývoj výskytu a mortality maligního melanomu v ČR.



Obr. 2. Výskyt maligního melanomu v jednotlivých krajích ČR.

Jak melanom vzniká

Melanocyty jsou buňky pokožky, které produkují hnědočerné barvivo melanin, a primárně tak určují barvu kůže. Ontogeneticky pocházejí z neurální lišty, odkud migrují na patřičné místo v organizmu (např. kůže a slizniční povrchy). Leží v bazální vrstvě epidermis, kde jsou samostatně distribuovány mezi keratinocyty a jiné buňky pokožky.

Melanocyty se za normálních podmínek nedělí příliš rychle, ale např. UV-záření jejich proliferaci a produkci cytoprotektivních pigmentů podporuje. Když je DNA vystavena UV–záření, může dojít k akumulaci energie dvou sousedních pyrimidinových bází, následně pak k jejich spojení kovalentními vazbami a tvorbě pyrimidinových dimerů (zejména thyminových). Může též docházet ke tvorbě zlomů na úrovni DNA, a tak k poškození genetické informace buňky. Například takto se melanocyty transformují v melanomové buňky a ty poté mohou zformovat melanom.

U většiny tumorů jsou patrné dvě biologické fáze růstu, radiální a vertikální. V průběhu radiální fáze dochází k růstu melanomu v radiálním směru buď nad, nebo těsně pod bazální membránou. Toto období není spojeno s metastatickou aktivitou daného nádoru a v závislosti na typu melanomu může být krátké a nebo trvat i několik let. Ve vertikální růstové fázi dochází k šíření melanomových buněk hluboko do dermis a do podkoží. Odtud mohou (za určitých podmínek) nádorové buňky migrovat a vytvářet sekundární ložiska metastázy.

Klíčová úloha keratinocytů

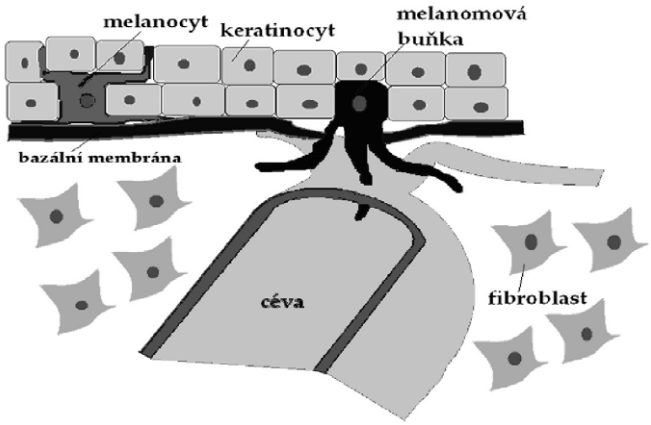
Symbióza melanocytů a skupiny keratinocytů představuje tzv. epidermální melaninovou jednotku, kde na jeden melanocyt připadá obvykle deset až dvacet okolních keratinocytů. Tyto dva buněčné typy vzájemně regulují své biologické aktivity. Příkladem jsou keratinocyty, které vylučují růstové faktory a podporují tak přežívání melanocytů. Mohou regulovat melanocyty i pomocí přímých, epidermálně specifických spojů. Dnes se předpokládá, že díky těmto kontaktům keratinocyty kontrolují expresi některých povrchových molekul melanocytů.

Melanomové buňky jsou ale schopné uniknout „dozoru“ prováděnému keratinocyty díky specifickým mechanizmům: **1.** snížené expresi receptorů důležitých pro kontakt s nimi – např. **E-kadherinu**, který melanomové buňky nahrazují N-kadherinem. Ten poté zprostředkovává kontakt s fibroblasty a endoteliálními buňkami stromatu nádoru; **2.** zvýšené expresi receptorů a signálních molekul, jež se nenacházejí na melanocytech a jsou důležité pro interakce melanom-melanom nebo melanom-fibroblast – např. **N-kadherin**, melanomové adhezívní molekuly – **Mel-CAM**, vaskulární adhezívní molekuly – **VCAM**; **3.** zrušení jejich ukotvení k bazální membráně – např. odlišnou expresí **integrinů** (viz dále); **4.** zvýšené sekreci **metaloproteináz** (viz dále).

Migrace melanomových buněk (Obr. 3)

Díky signálům přijímaným z okolního mikroprostředí (růstové faktory, chemokiny nebo přes extracelulární matrix – ECM) se buňky mohou pohybovat. Změna polohy a tvaru buňky je závislá na polymerizaci aktinového cytoskeletu ve vychlipujících se organelách (filopodia a lamelipodia), jež se váží na ECM. Aby melanomové buňky mohly pronikat skrz mezibuněčnou hmotu, dochází na jejich vlečeném konci k rušení kontaktů ECM-buňka. Maximální pohyblivost byla pozorována u buněk s intermediálním stupněm adheze, která dovolovala částečnou adhezi na vedoucím pólu buňky a rozvolňování kontaktů na opačném – „vlečeném“ pólu. Změny v adhezivitě jsou dány interakcí cytoplazmatické části integrinu s různými proteiny. Integriny

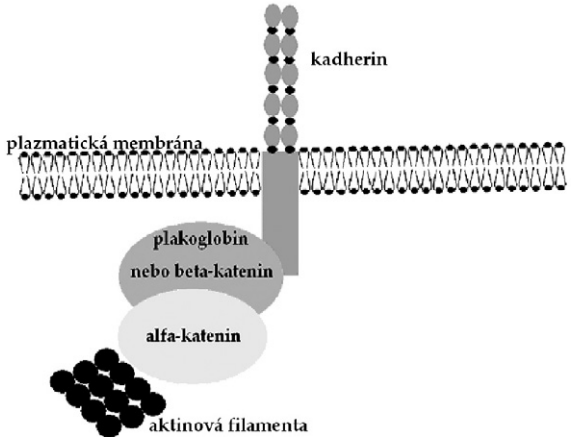
reagují s ECM i s cytoplazmatickými aktino-myozinovými adaptorovými proteiny, a pomáhají tak realizovat buněčný pohyb.



Obr. 3. Migrace melanomových buněk.

Změna exprese kadherinů v průběhu nádorového růstu

Kadheriny jsou homofilní vazebné transmembránové proteiny. Ektodomény kadherinů dvou různých buněk spolu interagují za tvorby latelárních dimerů, které tvoří jakýsi „zip" spojující dvě buňky dohromady. Cytoplazmatické konce kadherinů pak interagují s kateniny a tvoří komplex, který se váže na aktinový cytoskelet (Obr. 4.). Právě tento mechanizmus se podílí na mezibuněčné adhezi.

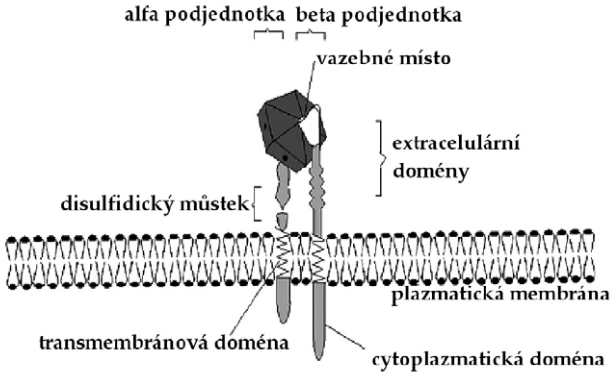


Obr. 4. Schématické znázornění interakce kadherinu s cytoskeletem.

E-kadheriny se nacházejí na intercelulárním rozhraní mezi melanocyty a keratinocyty, kde pomáhají jejich vzájemnému kontaktu. U mnoha epiteliálních nádorů se zdá být snížená exprese nebo omezená funkce E-kadherinu kritickým faktorem pro maligní progresi. Přerušení buněčné adheze zprostředkované E-kadherinem souvisí s invazí melanomu. Pokud je jeho exprese uměle indukována, dochází ke změně nádorového fenotypu. Nedávné studie prokázaly, že u keratinocytů způsobuje UV-záření parakrinní uvolňování endotelinu-1, který poté snižuje expresi E-kadherinu na melanocytech. Naopak pomocí blokování N-kadherinu u melanomových buněk došlo k nárůstu apoptózy.

Také integriny mění své zastoupení při progresi melanomu

Integriny jsou heterodimerní transmembránové glykoproteiny propojující ECM s aktinovým cytoskeletem (Obr. 5). Dosud bylo objeveno nejméně 25 integrinů, které jsou tvořeny z 8 různých beta a 18 odlišných alfa podjednotek. Integriny se účastní nejen adheze, ale i signalizace vedené mezi buňkou a jejím okolím. „Outside-in signaling" může ovlivňovat buněčné chování, proliferaci, polaritu, růst a migraci. „Inside-out signaling" mění vaznost integrinů k extracelulárním ligandům.



Obr. 5. Struktura integrinu.

Integriny společně se svými ligandy (např. proteiny ECM) hrají zásadní roli při regulaci migrace nádorových buněk. Když dojde k přerušení kontaktů mezi složkami extracelulární matrix a buňkou, je u ní indukována apoptóza. Mnohé studie prokázaly měnící se expresi integrinů v průběhu maligní transformace, přičemž jejich zvýšená exprese odpovídala více metastatickým fenotypům.

Hladiny alfa3beta1, alfa4beta1, alfa5beta1 a alfaVbeta3 integrinů jsou u primárních melanomů i v metastázách zvýšené. U melanomů *in situ* byla prokázána přítomnost alfa7beta1 integrinu. Metastazující melanomy pak vykazují signifikantní snížení exprese alfa1beta1, alfa2beta1 a alfa6beta1 integrinů.

Vysoká exprese alfaVbeta3 a alfa3beta1 integrinů je spojena s progresí a dermální invazivitou melanomu. Jakožto marker, který určuje přechod melanomu z radiální růstové fáze do vertikální fáze, byl stanoven nárůst beta3 podjednotky integrinu. Díky zvýšené expresi této podjednotky dochází k interakci beta3 integrinu s endogenním alfaV integrinem, což ještě maligní fenotyp umocňuje. AlfaVbeta3 (polyvalentní integrin, vážící např. fibronektin a vitronektin) indukuje u melanomových buněk expresi metaloproteinázy-2, jež degraduje kolagen bazálních membrán. Rovněž alfa4beta1 integrin hraje důležitou roli pro melanomové metastázy. Zvýšená exprese toho integrinu zřejmě podporuje migraci melanomových buněk po fibronektinu a následný vznik sekundárních ložisek nádoru. Obvykle je tento integrin exprimován lymfocytárními subpopulacemi a váže se např. k molekule V-CAM přítomné na endoteliálních buňkách. Alfa4beta1 integrin pak

zprostředkovává vazbou k VCAM extravazaci (prostoupení cévní stěnou) bílých krvinek. Syntézou alfa4beta1 integrinu tak zřejmě nádorové buňky napodobují lymfocyty a putují z cévního systému do tkání, které VCAM exprimují.

Pro migrující melanomové buňky je charakteristická vysoká exprese alfaVbeta3 integrinu i beta1 integrinů na vedoucím pólu buňky. Pohyb skrz ECM je částečně závislý na expresi beta1 integrinů. Zdá se, že právě beta 1 integriny hrají významnou roli při polarizaci migrujících buněk, pomocí blokujících protilátek totiž došlo k jejímu narušení, a vzniklo tak více vedoucích pólů buňky.

Matrixové metaloproteinázy (MMP) – cesta k migraci buněk

ECM je jakási síť tvořená z kolagenu, fibrilárních glykoproteinů a proteoglykanů. Kolagen je obklopen glykoproteiny, které ho chrání před proteolýzou. V průběhu degradace ECM jsou nejdříve odbourávány glykoproteiny, poté je metaloproteinázami degradován také kolagen. Proteolýzou těchto komponent je struktura ECM destabilizována a neoplastické buňky mohou migrovat. Kaskádu proteáz degradujících ECM obvykle zahajují proteázy acidické – katepsiny (soustředěné hlavně v lyzozomech). Jejich hlavní biologickou funkcí je odbourávat celulární a extracelulární proteiny.

MMP jsou širokou rodinou zinek-dependentích endopeptidáz, které jsou produkované rozličnými typy buněk. Degradují komponenty ECM a mají své role jak ve fyziologických, tak v patologických procesech. Podle struktury, substrátové specifity a buněčné polohy byly rozděleny do pěti podtříd. Patří sem kolagenázy, gelatinázy, stromelyziny, membránové typy MMP a zbylé MMP. Exprese MMP je regulována transkripčně i posttranskripčně a není omezena pouze na nádorové buňky, ale je patrná též u buněk stromatu. Mezi faktory ovlivňující transkripci patří cytokiny, růstové faktory, hormony, onkogeny a nádorové promotory. Většinu MMP buňka sekretuje v latentní podobě (jako pro-MMP). Díky tomu je mnoho MMP aktivováno až v extracelulární oblasti, a to pomocí serinových proteáz (např. urokinázový plazminogenní aktivátor – uPA) nebo ostatních MMP.

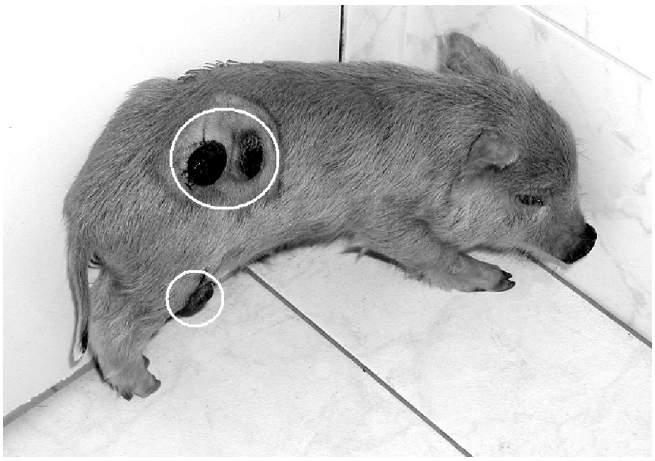
Nárůst exprese MMP-2 úzce souvisí s atypickou architekturou dané tkáně a také s následnou progresí melanomu. Nutno dodat, že zvýšená syntéza MMP-2 koreluje s hematogenními metastázami. Nedávné pokusy prováděné u melanomových myších modelů naznačily, že aktivní MMP-2 přímo moduluje adhezi melanomových buněk a jejich šíření mezi složky ECM. MMP-2 se váže pomocí své C-terminální hemopexinové domény k alfaVbeta3 integrinu, což umožňuje její lokalizaci na povrch buňky a přímou degradaci ECM. Pouze aktivní MMP-2 interaguje na povrchu endoteliálních buněk s alfaVbeta3 integrinem a v průběhu neoangiogeneze melanomu zřejmě přispívá k vaskulární invazi. Při porušení vazby MMP-2 s alfaVbeta3 integrinem totiž došlo k inhibici angiogeneze i růstu nádoru.

U lidských metastazujících melanomů koreluje vysoká exprese MMP-1 a MMP-3 s kratší dobou přežití. Studie, které se zaměřily na detekci MMP-9 pak přinesly poněkud kontroverzní výsledky. MMP-9 totiž exprimovaly výhradně melanomy v horizontální fázi růstu, ve vertikální růstové fázi se neobjevovala. U myších modelů byla exprese MMP-9 stanovena v buněčných liniích odvozených z pokročilých primárních melanomů, zatímco buněčné linie derivované z časných primárních nádorů MMP-9 neexprimovaly. Dalším zajímavým faktem je, že u MMP-9 deficientních myší docházelo k potlačení metastáz.

Jak lze melanom experimentálně studovat

Jako hlavní savčí melanomový model jsou používány inbrední myší linie. Různé linie myších melanomových buněk kultivovaných *in vitro* vytvářejí po subkutánní aplikaci melanom. Nevýhodou modelace tohoto onemocnění u myší je poněkud atypický vývoj vznikajících nádorů, které jsou tvořené především masou nádorových buněk. Nedochází tak v dostatečné míře k interakcím mezi „zdravými" (stromatickými) a nádorovými buňkami a k jejich vzájemnému ovlivňování např. produkovanými cytokiny. Tyto vztahy jsou v současné době předmětem zájmu mnoha experimentálních studií, neboť jsou řídící složkou zodpovědnou za růst a neovaskularizaci spontánně vznikajících nádorů.

U člověka a rovněž u dalších druhů savců (např. u prasete, psa, koně) se melanom vyskytuje spontánně. Proto jsou z biologického hlediska podstatně výhodnější (ale méně využívanou) alternativou pro studium melanomu speciálně vyšlechtěné linie miniaturních prasat, u kterých jsou melanomy dány dědičně a objevují se jako mnohočetné kožní léze. V USA je za tímto účelem používáno miniaturní prase Sinclair, které bylo původně vyšlechtěno v Hormelově ústavu (Minnesota) a v současné době je pro výzkum chováno soukromou společností (Sinclair Research Center, Inc., Columbia, Missourii).



Obr. 6. Sele linie MeLiM (stáří 6 týdnů) s mnohočetnými kožními melanomy.

V Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i. v Liběchově byla záměrnou selekcí vytvořena samostatná linie miniaturních prasat MeLiM (Melanoma-bearing Libechov minipigs; Obr. 6.). Mela-

nomy se u postižených zvířat vyskytují již při narození nebo se vyvíjejí krátce po něm. Linie MeLiM je využívána k řadě histopatologických, biochemických, imunologických, molekulárně-genetických a imunohistochemických studií (včetně detekce některých adhezívních proteinů a molekul extracelulární matrix), které prokázaly značnou podobnost tohoto melanomu s lidským. Na rozdíl od miniprasat Sinclair, u kterých téměř všechny melanomy spontánně regredují (odhojí se), zhruba třetina miniprasat MeLiM uhyne v důsledku progrese melanomu a mnohočetných orgánových metastáz do dvou měsíců po narození.

Závěr

Rozličné složky mezibuněčné hmoty mohou stimulovat proliferaci, migraci a přežívání melanocytů a melanomových buněk. Transformace melanocytů v melanomové buňky je doprovázena změnou exprese adhezívních molekul jako např. Mel-CAM, E-kadheriny a integriny. Proteolýza, degradace a remodelace ECM jsou kroky důležité pro migraci nádorových buněk a následný vznik sekundárních nádorových ložisek – metastáz. Těchto procesů se účastní různé MMP, které zde mají své specifické role.

Poděkování

Tato práce byla provedena za podpory výzkumného záměru ÚŽFG AV ČR, v.v.i. číslo AV0Z50450515, projektu GA ČR (reg.č. 524/04/0102) a projektu GA AV ČR reg.č. IAA 600450601).

Literatura:

1. Haass N. K., et al.: J. Mol. Histol. 35, 309-318 (2004).
2. Haass N. K., et al.: Pigment Cell Res. 18, 150–159 (2005).
3. Hofmann U. B., et al.: Biochimie 87, 307–314 (2005).
4. Klener P.: Klinická onkologie. Galén a Karolinum Praha, 2002, s. 524-527.
5. Kuphal S., et al.: Cancer Metastas. Rev. 24, 195-222 (2005).
6. Satyamoorthy K., Herlyn, M.: Cancer Biol. Ther. 1, 14-7 (2002).
7. Vincent–Naulleau S., et al.: Pigment Cell Res. 17, 24–35 (2004).

DETEKCE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ POLYMERASOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

Michal Řehák

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Metoda polymerasové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) prošla v uplynulých letech bouřlivým vývojem a její objev odkryl nevídané možnosti na poli genetiky a mikrobiologie. První publikovaná práce o PCR je datována do roku 1971, kdy K. Kleppe prezentoval použití DNA polymerasy pro opravnou replikaci DNA[1]. Za objevitele PCR se však označuje Kary B. Mullis, který v roce 1986 začal používat termostabilní *Taq* DNA polymerasu izolovanou z bakterie *Thermus aquaticus*. Použití termostabilní polymerasy je klíčové, neboť Kleppem použitá DNA polymerasa z *Escherichia coli* ztrácí svou aktivitu v průběhu denaturačního kroku (zahřátí až na 95 °C). Proto byly dřívější postupy replikace DNA neefektivní, časově náročné a vyžadovaly přidání nové polymerasy po každém cyklu. O významu PCR svědčí i finanční stránka věci. Mullis dostal od svého zaměstnavatele (fy Cetus) za objev PCR odměnu ve výši 10 000 USD, ale o pár let později byla patentová práva prodána farmaceutické společnosti Hoffmann-La Roche již za 300 miliónů USD. V roce 1989 ji dokonce časopis Science označil za nejdůležitější vědecký objev a v roce 1993 obdržel za její objev Mullis Nobelovu cenu za chemii. Avšak použití PCR jako detekčního systému má i své odpůrce. Ti argumentují tím, že PCR není schopná poskytnout dichotomní výsledek. Jedná se podle nich pouze o multiplikační metodu a závisí pouze na laboratoři, která ji aplikuje, zda bude chtít v biologickém materiálu hledanou sekvenci najít, nebo ne. I přes tato tvrzení je však v současnosti vyvinuto velké množství PCR metod pro detekci mikroorganismů, geneticky modifikovaných organismů, apod.

PCR je metoda sloužící k amplifikaci určitého úseku DNA *in vitro*. Poskytuje až 10^6 násobné pomnožení úseku během 2 – 3 hodin. Pro reakci je potřeba termostabilní polymerasa, vhodný pufr s hořečnatými ionty, směs všech čtyř deoxyribonukleotidů, cílovou DNA (templát) a 2 oligonukleotidové primery (20 – 30 basí) komplementární k 3'-koncovým sekvencím obou řetězců amplifikovaného úseku DNA. Vlastní reakce se skládá ze tří cyklicky se opakujících teplotních kroků. Prvním krokem je denaturace (cca 95 °C, cca 5 min), při které se rozpadá dvoušroubovicová molekula DNA na samostatné řetězce. V druhém kroku dojde k připojení primerů (annealing) na komplementární úsek na vláknu amplifikované DNA ochlazením reakční směsi (55 – 72 °C, 15 – 60 s). Reakční teplota při tomto kroku závisí na délce a sekvenci primerů. Posledním,

třetím, krokem je replikace (extension), při níž hybrid DNA-primer slouží jako iniciační místo odkud DNA polymerasa začne syntetizovat komplementární vlákno DNA. Reakční směs je v tomto kroku zahřáta na teplotní optimum DNA polymerasy (72 – 75 °C, 30 – 60 s). Opakováním těchto tří kroků, obvykle 20 – 35 krát, dojde k namnožení úseku DNA vymezeného použitým párem primerů. V každém cyklu PCR je daný úsek zdvojen, takže z jediné molekuly DNA po 25 cyklech může vzniknout až 33 554 432 (2^{25}) fragmentů. Celá reakce probíhá v termocykléru, což je programovatelný termostat, který musí být schopný rychlého a přesného přechodu mezi jednotlivými teplotami. V současné době je na trhu k dostání celá řada těchto přístrojů od různých výrobců. Získané produkty se pak nejčastěji detegují horizontální elektroforesou v agarosovém gelu, barvením ethidium bromidem či SYBR Green I. Porovnáním se standardem je potom možné určit velikost produktů PCR. Pro úspěšný průběh PCR nám tedy teoreticky stačí mít pouze jedinou kopii DNA ve vzorku. Tato kopie ovšem nesmí být poškozena v úseku, který má být amplifikován.

Důležitými faktory PCR jsou především koncentrace Mg^{2+} iontů a teplota nasedání primerů (hybridizace). Čím nižší teplotu hybridizace zvolíme, tím větší je pravděpodobnost vzniku nespecifických produktů, které mohou rušit další stanovení. Tento parametr je obzvláště důležité pečlivě nastavit při multiplex PCR, kdy je velké riziko vzniku vedlejších produktů. Nutností je znalost sekvence alespoň okrajů úseku, který chceme amplifikovat. Na tyto úseky pak můžeme navrhnout primery.

Chceme-li využít možnosti PCR pro detekci určitého mikroorganismu, musíme ověřit, zda pro sledovaný mikroorganismus a námi navržený pár primerů vzniká jedinečný produkt, tj. že nevzniká stejný produkt i pro jiné mikroorganismy. Podle něj pak lze kvalitativně stanovit přítomnost mikroorganismu ve vzorku. Z tohoto důvodu se využívají mezidruhově variabilní úseky DNA jako například gen *rrs* pro16sRNA, gen *rrl* pro 23sRNA, house-keeping geny nebo geny pro pathogenitu. Detekce patogenních bakterií bývá založena na identifikaci genů, zodpovědných za projevy virulence. Pro detekci mikroorganismů se pak nejčastěji používají tyto varianty PCR: multiplex PCR, nested PCR, RT-PCR a kvantitativní PCR.

Multiplex PCR

Jedná se o variantu PCR, při které se v jedné reakci používá více párů primerů najednou. To umožňuje buď navrhnout sadu primerů pro více organismů, nebo sadu primerů pro více genů jednoho organismu. Příkladem může být detekce *Listeria monocytogenes*[2]. Nejsložitější na tomto provedení je správné nastavení reakčních podmínek (koncentrace primerů, koncentrace Mg^{2+}, teplota hybridizace) a výběr vhodných primerů. Zvolené primery musí mít podobnou teplotu tání. Liší-li se příliš teplota tání jednotlivých párů primerů, pak je velké riziko, že při hybridizaci jeden pár nenasedne na vlákno DNA, nebo že pro pár s vyšší teplotou tání budou vznikat nespecifické produkty. Dále je nutné zajistit vhodnou koncentrací reakčních komponent, aby nebyl jeden produkt upřednostňován před ostatními. Produkty PCR pro jednotlivé páry primerů se musí lišit ve své délce, aby mohly být detekovány například gelovou elektroforesou. Takovéto uspořádání umožňuje velkou úsporu času i práce.

Nested PCR

Jedná se o dvoukrokovou metodou, která zvyšuje přesnost detekce[3]. V prvním kroku je templátem pro PCR DNA izolovaná ze vzorku s použitím „vnějších" primerů. V druhé reakci se použijí primery navržené na produkt první reakce, které se celkově nebo částečně liší sekvencí od prvních. V první reakci tak nevadí, když vznikají nespecifické produkty, protože ty pak nejsou amplifikovány druhou reakcí. Nutná je ovšem detailnější znalost cílové sekvence DNA.

RT-PCR (Reverse-transcription PCR)

Zkratka RT-PCR se občas používá i pro Real Time PCR (popsána níže), což vnáší do těchto zkratek zmatek, kterým se pravděpodobně jejich autoři baví na náš účet. Pomocí této metody můžeme detegovat RNA přítomnou ve vzorku (např. mRNA, virovou RNA). V prvním kroku dojde k přepisu RNA do cDNA (complementary DNA) pomocí RNA-dependentní-DNA-polymerasy (reversní transkriptasy). RNA je následně z hybridu RNA-DNA odbourána, takže zůstane jen čistá cDNA. cDNA může být následně použita pro sekvenaci nebo dále amplifikována *Taq* polymerasou v další PCR. RT-PCR byla například využita pro detekci aktivity methanotrofních bakterií v podzemních vodách[4]. Izolovaná mRNA byla po přepsání do cDNA identifikována pomocí nested PCR.

Kvantitativní PCR

Předchozí metody umožňují pouze určit, zda hledaný mikroorganismus je či není ve vzorku přítomen, ale nemůžeme s jejich pomocí stanovit množství buněk přítomného mikroorganismu. Pro takovéto stanovení můžeme využít některou z kvantitativních variant PCR. Kvantifikace spočívá ve stanovení množství vzniklého produktu po každém cyklu. Toho se nejčastěji docílí pomocí fluorescenčních sond nebo flurorescenčních barviv a specializovaných přístrojů, které dokáží měřit nárůst fluorescence v průběhu reakce. Porovnáním s kalibrační křivkou pak můžeme určit počáteční počet kopií DNA. Pro vlastní detekci mikroorganismů musíme vědět kolikrát je námi amplifikovaná sekvence přítomná v genomu daného mikroorganismu. V následujícím přehledu budou pouze krátce zmíněny nejpoužívanější systémy kvantitativní PCR: kompetitivní Real on Time PCR (RTi-PCR), PCR (QC-PCR), a PCR ELISA.

RTi-PCR *(Real on Time PCR)*

Principem této metody je sledování vznikajícího produktu v průběhu celé PCR měřením nárůstu fluores-

cence. Jak již bylo výše zmíněno, nejčastěji se používají interkalační fluorescenční barviva[8] a fluorescenční sondy. Fluorescenční barviva (např. SYBR green I) se nespecificky váží na dsDNA (do malého žlábku) a ve vazbě s ní vykazují vyšší fluorescenci než volně v roztoku. Jsou levnější, ale nevýhodou je jejich interakce i s nespecifickými produkty PCR a případnými dimery primerů, pro které je třeba provést analýzu křivek tání. Přesnější, ale také dražší, jsou fluorescenčně značené sondy (próby). Ty se na DNA váží specificky a umožňují tak stanovení i v případě vzniku vedlejších produktů PCR. Další výhodou značených sond je možnost provedení multiplex PCR s různě barevně značenými sondami, a tím detekci více genů (mikroorganismů) v jedné reakci. Nejčastěji se používají sondy hydrolyzační[9,10,11] nebo hybridizační[12,13]. Při použití hydrolyzačních sond se nejčastěji využívají RNA sondy s fluorescenčním zářičem a zhášečem fluorescence. Sonda v průběhu replikace hybridizuje s úsekem uvnitř amplifikované sekvence, následně je díky 5' -> 3' exonukleasové aktivitě *Taq* polymerasy odstraněn zhášeč a tím je umožněna fluorescenční detekce produktu. Nejčastěji používanou takovouto sondou je TaqMan. Hybridizační sondy využívají systému dvou sond (systém FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer), jedna s fluoresceinem (emise zeleného fluorescenčního světla po excitaci), druhá s barvivem (LC Red). Tyto sondy jsou opět navrženy na úsek uvnitř amplifikované sekvence. Pokud obě sondy hybridizují v průběhu replikace s DNA, pak dojde k posunu emitovaného světla ze zelené oblasti do červené. Následně jsou sondy opět odstraněny polymerasou. Další možností je použít LUX systém využívající sondy tvořící sekundární struktury, kdy volně v roztoku nedochází k fluorescenci, ale po hybridizaci s cílovou sekvencí DNA už detegujeme fluorescenční signál[14]. RTi-PCR je velmi přesná, ale její nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístrojů.

QC-PCR *(Quantitative Competitive PCR)*

V průběhu kvantitativní kompetitivní PCR dochází ke společné amplifikaci cílové sekvence a vnitřního standardu. Porovnáním množství vzniklých produktů po gelové elektroforéze a vizualizací ethidium bromidem můžeme odhadnout množství DNA ve vzorku[3]. Tato metoda je finančně méně náročná než RTi-PCR, ale jedná se pouze o semikvantitativní metodu. Nevýhodou je potřeba vnitřního standardu a obtížná optimalizace protokolu.

PCR ELISA

Jedná se o spojení PCR s detekcí vzniklého produktu pomocí protilátek metodou zvanou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Tato metoda je velmi specifická, citlivá a rychlá. Umožňuje kvantifikovat až 96 PCR produktů během několika hodin. Principem je značení PCR produktů digoxigeninem v průběhu reakce. Takto označený produkt je pak denaturován, hybridizován se sondou značenou biotinem a následně imobilizován na streptavidinem potaženou mikrotitrační destičku. Navázané produkty jsou pak kvantifikovány značenou protilátkou proti digoxigeninu. PCR ELISA umožňuje kvantifikovat relativně velmi malé množství PCR produktu a tím značně zvýšit citlivost celého stanovení. Touto metodou byly například stanoveny plísně rodu *Aspergillus*[5], kdy byla zjištěna až 100x vyšší citlivost v porovnání s použitím RTi-PCR. Uplatnění našla i pro detekci DNA virů[6], ve spojení s reverzní transkripcí je možné detegovat i RNA viry[7].

Izolace DNA

Před vlastním provedením PCR musíme izolovat DNA ze vzorku. Správné provedení izolace je velmi důležitým faktorem pro následné provedení PCR, neboť čistota a dostatečné množství DNA jsou klíčovým faktorem. Pro izolaci DNA však nesmíme použít příliš agresivní metody, protože většinou je námi hledaná DNA přítomná ve vzorku v malém množství a potřebujeme ji získat nepoškozenou v sekvencích, na které máme navržené primery. Často také vycházíme z velmi rozmanité a komplexní matrice (potraviny, vzorky z odpadních vod, apod.), ve které se nachází mnoho inhibitorů PCR. Pro zvýšení citlivosti detekce můžeme použít tzv. nabohacování, které pomáhá regeneraci buněk, ale z důvodu různých rychlostí dělení buněk nám to nemožňuje provést kvantifikaci Tento problém můžeme vyřešit použitím IMS (immunomagnetické separace) nebo mikrofiltrace[1], které slouží k zakoncentrování mikroorganismů ve vzorku. Použitím těchto metod bylo dosaženo zvýšení citlivosti detekce[15].

Izolaci DNA ze vzorku a jejímu přečišťování se lze vyhnout použitím tzv. přímé PCR (direct PCR, DPCR). DPCR probíhá přímo v odebraném vzorku, inhibiční efekt látek přítomných v přírodních vzorcích je eliminován sérií ředění. Tato metoda byla použita pro detekci methanotrofních a fototrofních bakterií[16] nebo detekci *E. coli* produkující Shiga toxin[17]. Autoři uvádějí, že tato metoda je stejně citlivá jako tradiční PCR nebo RTi-PCR.

Závěr

Hlavní výhodou detekce mikroorganismů pomocí PCR, v porovnání s kultivačními metodami, je velká časová úspora. Navíc v některých uspořádáních umožňuje analyzovat velké množství vzorků najednou. Další výhodou je možnost analyzovat přírodní vzorky obsahující těžko kultivovatelné nebo nekultivovatelné mikroorganismy. Nutností je zlepšit citlivost detekce z komplexních vzorků, které mohou selhávat v příliš složité izolaci a purifikaci DNA. Velmi zajímavým řešením je vývoj metod DPCR umožňující amplifikaci DNA bez nutnosti předchozí izolace a purifikace DNA. Z těchto důvodů je žádoucí věnovat velkou pozornost vývoji metodik PCR a jejich automatizaci. Nevýhodou PCR, v porovnání s kultivačními metodami, však je detekce mrtvých buněk, případně volné DNA, což může vést k falešně pozitivním výsledkům. Umožňuje nám však detekovat i nekultivovatelné mikroorganismy.

Literatura:
1. Kleppe K.: *J. Mol. Biol.*, 56, 341-361 (1971).
2. Zdeňková K. : Diplomová práce, VŠCHT v Praze, 1999.
3. Lengerová M.: *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 13, 184-189 (2007).
4. Lollins M.L.P.: *Nat. Sci. Dig. Library* (2001), http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/EcoNatRes.WRIGRR01-03 ,(25. 3. 2008).
5. Scotter J.M.: *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 12, 1322 (2005).
6. Bazzichi A.: *J. Virol. Meth.*, 74, 15-20 (1998).
7. Marinho V.L.A.M.: *Fitopatol. Brasil.*, 28, 374-379 (2003).
8. Bu R.: *J. Med. Microbiol.*, 54, 243-248 (2005).
9. Challier S.: *J. Clin. Microbiol.*, 42, 844-846 (2004).
10. Costa C.: *J. Microbiol. Meth.*, 44, 263-269 (2001).
11. Sanguinetti M.: *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3922-3925 (2003).
12. Klingspor L.: *Clin. Microbiol. Infect.*, 12, 745-753 (2006).
13. Costa C.: *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2224-2227 (2002).
14. Scotter J. M.: *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 12, 1322-1327 (2005).
15. Peška V.: Bakalářská práce. Masarykova univerzita Brno, 2001.
16. Frode-Vaughan K. A.: *Biotechniques*, 31, 598-604 (2001).
17. Frode-Vaughan K. A.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 37, 239–243 (2003).

LAKTOBACILY – NOVÉ MOŽNOSTI VYUŽITÍ PŘI VÝROBĚ SÝRŮ A DALŠÍCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Štěpán Tůma
Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Úvod

V polotvrdých sýrech typu Eidam se vyskytuje celá řada mikroorganismů, které ovlivňují vlastnosti sýra a hrají významnou roli při výrobě a zrání. Mezi žádoucí mikroorganismy patří bakterie mléčného kvašení rodu *Lactococcus* a *Lactobacillus* tvořící u sýrů dominantní mikroflóru. Zvláštní skupinu tvoří NSLAB (Non starter lactic acid bacteria = bakterie mléčného kvašení nezákysového původu), které se do sýra dostávají z jiných zdrojů než ze zákysových kultur. Mezi nejčastější nežádoucí mikroorganismy vyskytující se v sýrech patří koliformní bakterie, sporulující bakterie z rodu *Clostridium*, kvasinky, plísně a některé druhy NSLAB [1,10].

Využití laktobacilů

Laktobacily disponují celou řadou vlastností, které lze využít ke zvýšení kvality sýrů. V sýrech rostou velmi dobře a během zrání dosahují vysokých celkových počtů. Při výrobě sýrů se používají laktobacily nejčastěji jako doplňkové kultury. Jejich role je velmi rozmanitá. Podle svých fermentačních schopností se mohou podílet na zkvašování zbytkové laktosy a dalších sacharidů vyskytujících se v sýrech [3]. Laktobacily disponují proteolytickými enzymy, zejména aminopeptidasami a mají schopnost degradovat peptidy vzniklé působením syřidla na kasein, nízkomolekulární a vysokomolekulární sloučeniny až na aminokyseliny, a tím se podílet na vývoji chuti a vůně sýra [7].

Mezi další významné vlastnosti laktobacilů patří schopnost inhibovat nežádoucí mikroorganismy, včetně patogenů a mikroorganismů způsobujících kažení potravin, produkcí různých druhů antimikrobiálních látek a tím zvýšovat mikrobiální bezpečnost potravin.

Široké spektrum vlastností laktobacilů, přirozený charakter a výskyt v sýrech umožňuje jejich použití nejen v sýrařství, ale i v dalších mléčných výrobcích. Zejména antimikrobiální vlastnosti patří mezi ty nejzajímavější. Přesto se laktobacily jako protektivní kultury při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou používají ojediněle [3].

Dříve než mohou být laktobacily použity jako doplňkové kultury, musí být identifikovány pomocí genetických metod. Musí být otestovány všechny jejich důležité technologické a protektivní vlastnosti přímo v potravinách. Současně je nutné znát produkci biogenních aminů, sledovat případné změny v chuti a vůni během zrání sýrů, k jejichž výrobě byly použity [10].

Výskyt a vlastnosti laktobacilů v sýrech

V této práci se sledoval výskyt laktobacilů u nejprodávanějšího sýra v ČR typu Eidam 30 % tvs. A dále také složení a vlastnosti laktobacilů ze skupiny NSLAB přirozeně se vyskytujících v tomto typu sýra s cílem selekce nových kmenů se zajímavými technologickými vlastnostmi.

Sýry byly vyrobeny v provozním měřítku bez přídavku doplňkových kultur. U všech sýrů se po celou dobu zrání vyskytovaly laktobacily. Celkový počet laktobacilů 10^6-10^7 KTJ.g^{-1} se během zrání výrazně neměnil. Počty termofilních laktobacilů v průběhu zrání u všech typů sýrů klesaly. Počty NSLAB v průběhu zrání u všech sýrů rostly a pohybovaly se ke konci zrání v rozmezí 10^6-10^7 KTJ.g^{-1}. Při fázových odběrech v mlékárně Přísovice se dále prokázalo, že NSLAB se vyskytovaly nejen v sýrech, ale i v syrovém mléce, na zařízení a část NSLAB přežívala pasteraci mléka. Celkové počty laktokoků se během zrání neměnily. Výskyt NSLAB neměl výrazný

vliv na prokysávání mléka během výroby sýrů. Po solení se pH sýrů pohybovalo v rozmezí 5,5-5,6.

Jednotlivé druhy laktobacilů mají odlišné optimální podmínky pro svůj růst. Všechny kmeny nerostou při nízkém pH, vysoké koncentraci soli, v celém teplotním rozmezí a fermentují různé substráty vyskytující se v sýru [4].

Během zrání sýru typu Eidam bylo celkem izolováno 320 kmenů. Všechny izolované kmeny se podrobily mikroskopickému vyšetření. Jednalo se o Gram-pozitivní, katalasa negativní bakterie, tvaru především krátkých tyčinek o délce (2 μm), které se vyskytovaly jednotlivě nebo v páru, popř. tvořily shluky nebo krátké řetízky.

U izolovaných kmenů byla provedena jejich částečná charakteristika (stanovení optimální teploty, tolerance k NaCl, rozlišení homofermentativních a heterofermentativních kmenů, fermentace sacharidů, produkce CO_2, tolerance k pH) (Tab. 1), tak jako v dříve publikovaných pracích [7].

Na základě fenotypových vlastností, stanovení na HHD médiu a fermentačních schopnostech byly všechny izoláty získané v průběhu zrání rozděleny do tří skupin podle [6]: skupina I (obligátně homofermentativní), skupina II (fakultativně heterofermentativní) a skupina III (obligátně heterofermentativní) (Tab. 2), jejichž výskyt v sýrech s nízkodohřívanou sýřeninou byl již dříve potvrzen [1,4]. Pouze v nezralém sýru a v sýru typu Eidam 30 % tvs. Po dvou týdnech zrání převládaly homofermentativní kmeny. Homofermentativní laktobacily se často vyskytují v sýru na začátku zrání u sýru typu Arzúa převládaly z 90 % [2]. V průběhu zrání sýra typu Eidam 30 % tvs. převažovaly (z více jak 70 %) od čtvrtého týdne zrání fakultativně heterofermentativní laktobacily (FHL). Variabilita jednotlivých druhů a kmenů během zrání a převaha výskytu FHL byla pozorována i u sýrů typu Čedar [11] a u polotvrdých sýrů typu Gouda, Jarlsberg, Norwegia, Greve [1] vyrobených ve stejné sýrárně během jednoho dne.

Převaha FHL v sýru během delší doby zrání je přisuzována schopnosti laktobacilů růst při zvýšeném obsahu soli, nízkém pH a nízkém redoxním potenciálu [2].

V průběhu celé doby zrání bylo v sýrech typu Eidam 30 % tvs. zastoupení izolátů: 72 % fakultativně heterofermentativních, 20 % obligátně homofermentativních a 8 % obligátně heterofermentativních laktobacilů.

Tab. 1: Fenotypové vlastnosti laktobacilů izolovaných ze sýru typu Eidam 30 % tvs. vyrobených v mlékárně Příšovice bez použití doplňkových laktobacilových kultur v období červen-září 2004.

Doba zrání (týden)	Počet izolovaných kmenů	Fenotypové vlastnosti (růst za daných podmínek) % izolátů								
		teplota			(NaCl)			pH		produkce $C0_2$ z glukosy
		15 °C	37 °C	45 °C	2,5	4	6,5	6	9	
0	21	19	100	71	71	52	29	100	14	0
1	35	77	100	49	77	71	0	100	0	20
2	18	17	100	44	28	28	6	89	11	17
4	60	78	100	15	87	83	7	92	25	5
6	52	75	100	8	69	35	2	67	21	0
8	12	25	100	0	100	83	17	100	58	0
12	69	58	100	7	81	68	10	87	13	0
16	46	50	100	28	72	70	39	76	22	15
20	9	100	100	33	100	100	11	100	78	0

Tab. 2: Kategorizace laktobacilů izolovaných ze sýrů typu Eidam 30 % tvs. během zrání do jednotlivých skupin dle fenotypových vlastností.

Doba zrání (týden)	Počet izolovaných kmenů	obligátně homofermentativní (%)	fakultativně heterofermentativní (%)	obligátně heterofermentativní (%)
0	21	67	33	0
1	35	20	60	20
2	18	50	33	17
4	60	8	73	18
6	52	17	83	0
8	12	0	100	0
12	69	1	99	0
16	46	13	72	15
20	9	0	100	0

Antimikrobiální aktivita laktobacilů

Laktobacily mají stejně jako další BMK schopnost produkovat antimikrobiální látky a mohou tak inhibovat nežádoucí, ale i žádoucí (mezofilní zákysové, doplňkové) bakterie vyskytující se v sýrech a v dalších mléčných výrobcích [10]. U izolovaných kmenů se sledovala antimikrobiální aktivita, s cílem využití laktobacilů jako potenciální protektivní kultury pro výrobu nejen sýrů ale i dalších mléčných výrobků. Antibakteriální účinky vůči *Lactobacillus helveticus* CH1 vykázalo 60 % testovaných izolátů laktobacilů, antifungální účinky proti *Fusarium proliferatum* M5689 20 % izolátů, z nichž některé dále inhibovaly i *Penicillium* sp. DMF 0006 a *Aspergillus niger* DMF 0801.

Antifungální aktivita laktobacilů se testovala metodou mléčných agarových misek jako v minulých pracích [8] proti *Penicillium* sp. DMF 0006, *Aspergillus niger* DMF 0801 a *Fusarium proliferatum* M 5689 a porovnala se s aktivitou *Lb. rhamnosus* VT1 a *Lb. plantarum* DC1246 (popsáno Danisco, Germany). Metoda mléčných agarových misek představuje vhodný modelový systém k testování potlačování růstu plísní na povrchu sýrů.

Nejlépe laktobacily potlačily růst *F. proliferatum* M 5689 a následně *Penicillium* sp. DMF 0006. Inhibiční účinek proti *A. niger* DMF 0801 byl detekovatelný, nicméně mnohem slabší ve srovnání s účinkem proti *Fusarium* a *Penicillium*. Inhibiční účinek dříve testovaného souboru laktobacilů byl také nejvyšší proti *Fusarium* sp. a plísně *Penicillium* sp. a *A. niger* byly proti působení laktobacilů odolnější [8].

Antiklostridiální aktivita byla nalezena u 23 kmenů NSLAB izolovaných z českých a dánských polotvrdých sýrů. Pouze u *Lb. paracasei* 61H4, *Lb. paracasei* 7R1, *Lb. paracasei* 8R2, *Lb. paracasei* 171R2 a *Lb. paracasei* 171M7 byl inhibiční účinek způsoben látkami bílkovinného charakteru (bakteriociny). Bakteriociny byly odolné vůči tepelnému záhřevu (25, 30, 37 a 55 °C), aktivní v rozmezí pH 4-7 a byly inaktivovány proteolytickými enzymy. Všechny izoláty nejlépe inhibovaly *Cl. tyrobutyricum*. Tento druh je nejčastěji spojován se vznikem nežádoucího pozdního duření u polotvrdých a tvrdých sýrů.

V minulosti byla již izolována celá řada laktobacilů s antiklostridiální aktivitou, včetně NSLAB [9]. U mnoha z nich již byly prokázány inhibiční účinky spojené s produkcí bakteriocinů. Zejména schopnost potlačit růst a působení *Cl. tyrobutyricum* a jejich spor způsobujících pozdní duření je z technologického hlediska žádoucí [3,10].

Identifikace laktobacilů

Vybrané laktobacily s antifungálními a antiklostridiálními účinky byly identifikovány REP-PCR metodou jako druhy *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum a Lb. rhamnosus*. REP-PCR (repetitivní polymerásová řetězová reakce) je relativně rychlá a přímá metoda umožňující identifikaci na úrovni druhů a kmenů. Ve většině případů poskytuje REP–PCR stejné rozlišení jako PFGE nebo RAPD. Při REP-PCR se na rozdíl od klasické PCR amplifikují dlouhé úseky, které jsou specifické pro danou skupinu bakterií [5]. Pomocí REP-PCR byly úspěšně identifikovány NSLAB, zejména kmeny *Lb. paracasei* [3]. Díky PCR metodám a vhodně zvoleným primerům lze již identifikovat a rozlišit i velmi podobné druhy *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* a *Lb. casei*.

Laktobacily ze skupiny NSLAB jako potenciální doplňkové kultury

Při výrobě sýrů se často kromě zákysových bakterií používají doplňkové kultury *Lactobacillus* spp.. Použití dané doplňkové kultury závisí zejména na kysací schopnosti, růstu v mléce, proteolytické aktivitě a odolnosti vůči bakteriofágům. U vybraných kmenů *Lb. paracasei* ze skupiny NSLAB s antimikrobiálními vlastnostmi byly testovány technologicky významné vlastnosti důležité pro použití jako potenciální doplňkové kultury pro výrobu sýrů. Laktobacily rostly v mléce do koncentrací 10^8-10^9 KTJ.ml^{-1}, měly nízkou kysací schopnost, disponovaly leucin, valin a cystin-aminopeptidasami, ß-galaktosidasou a α-glukosidasou. U všech testova-

Tab. 3: Antimikrobiální aktivita vybraných laktobacilů izolovaných z polotvrdých sýrů během zrání proti vybraným indikátorovým kmenům plísní a klostridií.

číslo	kmen	*Fusarium proliferatum*	*Penicillium* sp.	*Aspergillus niger*	*Cl. tyrobutyricum 184*	*Cl. butyricum 10702*	*Cl. sporogenes 795*
ST68	*Lb. paracasei*	+	+	+	+	+	+
ST485	*Lb. paracasei*	+	+	+	+	-	-
ST491	*Lb. paracasei*	+	+	+	+	+	-
61H4	*Lb. paracasei*	ND	ND	ND	+	+	+
7R1	*Lb. paracasei*	ND	ND	ND	+	+	+
8R2	*Lb. paracasei*	ND	ND	ND	+	+	+
171M7	*Lb. paracasei*	ND	ND	ND	+	+	+
171R2	*Lb. paracasei*	ND	ND	ND	+	+	+
ST472	*Lb. rhamnosus*	+	+	+	+	-	-

(+) inhibiční účinek pozitivní, (-) inhibiční účinek negativní, (ND) nebylo stanoveno

ných kmenů byla detegována přítomnost kyselé fosfatasy. Z testování enzymové aktivity bylo zřejmé, že byla charakteristická pro daný kmen a může se lišit i v rámci jednoho druhu. Všechny testované kmeny včetně komerčních kultur disponovaly enzymy vhodnými pro použití při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou eidamského typu.

Proteolytická aktivita kmenů NSLAB byla srovnatelná s komerčními kulturami *Lb. casei* 163, ale nižší než u *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 125 a *Lb. helveticus* 121.

U vybraných kmenů laktobacilů druhů (*Lb. fermentum, Lb. rhamnosus* a *Lb. paracasei*) testovaných podrobněji na antifungální, antibakteriální a antiklostridiální aktivitu a u komerčních doplňkových kultur *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 125, *Lb*. *helveticus* 121, *Lb. casei* 163 byla testována produkce biogenních aminů (histaminu a tyraminu). U kmene *Lb. paracasei* ST 68 byla testována produkce dalších biogenních aminů z ornithinu a lysinu. Většina laktobacilů produkovala histamin a tyramin. Pouze kmeny *Lb. fermentum* 306, *Lb. paracasei* 486, *Lb. paracasei* 61H4, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 125 a *Lb. paracasei* ST68 neprodukovaly biogenní aminy.

Schopnost snižovat alergenicitu mléčných bílkovin byla testována pouze u kmene *Lb. paracasei* ST 68. Tento kmen byl vybrán díky svým antimikrobiálním vlastnostem jako vhodná doplňková protektivní kultura pro výrobu sýrů typu Eidam. *Lb. paracasei* ST68 výrazně snižoval alergenicitu kaseinu a celkových bílkovin mléka.

Ze souboru testovaných kmenů byly jako perspektivní pro případné použití ve formě doplňkových kultur vybrány kmeny *Lb. paracasei* ST68, *Lb. paracasei* ST491, *Lb. paracasei* 8R2, *Lb. paracasei* 61H4, *Lb. paracasei* 7R1 a *Lb. paracasei* 171R2.

V poloprovozním měřítku byl úspěšně vyroben sýr typu Eidam 45% tvs. s kmenem *Lb. paracasei* ST 68, s antifungální a antiklostridiální aktivitou.

Kmen *Lb. paracasei* ST68 rostl v mléce, neprodukoval plyn, rostl při teplotě 15 °C, při pH 6 a koncentraci soli 25, 40 a 100 $g.l^{-1}$. Proteolytická aktivita byla v porovnání s komerčními kulturami *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 125, *Lb. casei* 163 a *Lb. helveticus* 121 až 2x nižší. *Lb. paracasei* ST68 netvořil biogenní aminy. Kromě trypsinu a lipasy C14 byla potvrzena u *Lb. paracasei* ST68 přítomnost stejných enzymů, jako u doplňkové kultury *Lb. casei* 163. Při testování na alergenicitu vůči kaseinu a mléčným bílkovinám bylo zjištěno, že *Lb. paracasei* ST68 výrazně snižoval jejich alergenicitu.

Přídavek *Lb. paracasei* ST68 neměl vliv na senzorickou kvalitu sýra zrajícího 4 týdny. Při hodnocení sýrů s přídavkem *Lb. paracasei* ST68 zrajících 16 týdnů byly již pozorovány rozdíly v chuti a vůni. Sýr s přídavkem *Lb. paracasei* ST68 měl výraznější chuť a vůni, která byla pro některé hodnotitele až příliš intenzivní. V celkovém hodnocení však nebyl ani jeden z obou typů sýrů hodnotiteli více preferován.

Závěr

V této práci bylo zjištěno, že v sýrech typu Eidam se v průběhu zrání přirozeně vyskytují laktobacily ze skupiny NSLAB. Tyto bakterie mohou mít pozitivní, i negativní vliv na kvalitu sýra. Stejně jako jiné bakterie i NSLAB disponují mnoha vlastnostmi, z nichž celá řada může mít pozitivní vliv na kvalitu sýrů. Jejich vlastnosti a vliv na kvalitu sýrů zatím nebyly zcela podrobně prozkoumány. Mezi významné a z technologického hlediska zajímavé vlastnosti patří zejména antimikrobiální aktivita laktobacilů. U mnoha laktobacilů ze skupiny NSLAB byla nejen v této práci, ale i v mnoha dalších studiích, pozorována schopnost inhibovat celou škálu mikroorganismů, včetně nežádoucích bakterií vyskytujících se v sýrech. Kromě testování NSLAB na antimikrobiální vlastnosti byla sledována i celá řada dalších technologicky významných vlastností, které jsou důležité pro lepší poznání role NSLAB v sýrech během zrání a jejich případné využití v technologii sýrů. Zejména využití NSLAB s antimikrobiálními vlastnostmi přirozeně se vyskytujících v sýrech jako protektivní doplňkové kultury by bylo velkým přínosem pro technologii sýrů.

Tato práce byla podpořena z výzkumného záměru MSM 6046137305

Literatura:

1. Beresford T.P., et al.: *Int. Dairy J.* 11, 259-274 (2001).
2. Centeno J.A., et al.: *Int. Dairy J.* 6, 65-78 (1996).
3. Christiansen P., et al.: *Int. Dairy J*. 15, 901-909 (2005).
4. Curry B., Crow V.: *Lactobacillus* spp. V knize: *Encyclopedia of Dairy Sci.s* (Roginski H., Fuquay J., Fox P.F., ed.), Acad. Press, London 2002.
5. Depouilly A., et al.: *Lait* 84, 155-167 (2004).
6. Harrigan W.F.: V knize: *Laboratory Methods in Food Microbiolgy* (Harrigan W.F.ed.). Acad. Press, London 1998.
7. Hebert E.M., et al.: *Int. J. Food Microbiol.* 59, 19-27 (2000).
8. Plocková M., et al.: *Czech J. Food Sci.*19, 46-50 (2001).
9. Rodriguez E., et al.: *Int. Dairy J.* 10, 7-15 (2000).
10. Tůma Š., et al.: *Mlék. Listy* 93, 18-21 (2005).
11. Williams A.G., et al.: *Food Res. Int.* 35, 483-493 (2002).

FYTOESTROGENY A DALŠÍ ZDRAVÍ PROSPĚŠNÉ LÁTKY V SÓJI

Anette Tizolová
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Fytoestrogeny jsou látky přirozeně se vyskytující v rostlinách s estrogenní nebo antiestrogenní aktivitou. Jsou strukturně podobné estradiolu, avšak jejich účinnost je mnohonásobně nižší. Základní struktura je nezbytná pro působení fytoestrogenů. Mezi prvky této struktury patří isoflavonový kruh, který na receptoru napodobuje estrogen. Společná je také nízká molekulová hmotnost a hydroxylační vzor. V rostlinách jsou přítomny jako součást obranného systému, zejména proti houbám. Vliv fytoestrogenů byl pozorován poprvé v roce 1940 u pasoucích se ovcí. Tyto ve velkém množství spásaly červený jetel, který je na fytoestrogeny mimořádně bohatý. U ovcí se účinek patologicky projevil na plodnosti, ale brzy se přišlo na to, že fytoestrogeny se liší v účinku na monogastrické organismy. Vyskytují se v mnoha potravinách využívaných lidstvem, např. ve fazolích, kapustě, špenátu, obilninách a chmelu a zejména sóji. Existuje spekulace, že příjem potravin s vysokou hladinou fytoestrogenů může způsobit hormonální nerovnováhu. Ale zatím se nepodařilo pro toto tvrzení najít vědecké opodstatnění. Konzumace těchto potravin není riziková ani z hlediska bioakumulace, ke které v případě fytoestrogenů nedochází[1].

Základními skupinami fytoestrogenů jsou isoflavony, kumestany, lignany a stilbeny. Tyto látky mohou mít pozitivní i negativní účinky na řadu onemocnění spjatých s hormonálním působením. Laboratorní pokusy na hlodavcích prokázaly, že vysoké dávky fytoestrogenů během prenatálního vývoje měly neblahé účinky na správný vývoj mozku a reprodukčních orgánů. Podle epidemiologických studií se přítomnost fytoestrogenů ve stravě dospělých lidí projevuje spíše příznivě, a to ochranou před některými chronickými stavy a nemocemi, jako jsou např. rakovina prostaty, tlustého střeva, konečníku, žaludku a plic. Stejný efekt může způsobit vysoký příjem vlákniny, luštěnin, zeleniny a ovoce. Doposud nebylo možné určit, které konkrétní látky v potravě jsou zodpovědné za tento pozitivní vliv na lidský organismus. U žen může strava se zvýšeným obsahem fytoestrogenů mít vliv na snížený výskyt rakoviny prsu a na zmírnění příznaků menopausy a post-menopausního syndromu, zejména osteoporózy, kde mají fytoestrogeny podobné účinky jako preparáty na udržování hustoty kostí. Sója se také podílí na snižování rizika vzniku kardiovaskulárních chorob a aterosklerózy, a to svým kladným vlivem na udržování hladiny krevních lipidů. Nicméně, stále neexistuje dostatek důkazů, které by všechny tyto kladné vlivy přiřadily výhradně fytoestrogenům. Mnoho dalších sloučenin obsažených v sóji je biologicky aktivních a právě ony mohou být zodpovědné za tyto projevy pravidelného příjmu sóji. Mnoho z těchto látek a zejména fytoestrogeny mohou interferovat s metabolismem steroidů a mohou inhibovat enzymy klíčové pro dělení buňky, jako jsou tyrosinkinasa a topoisomerasa a mohou tak chránit buňku před patologickým dělením[2,3].

Jiná studie prokázala vliv fytoestrogenů, genisteinu a daidzeinu, na snižování plasmatického cholesterolu u lidí i pokusných zvířat. Mechanismus jejich působení je ale rovněž neznámý. Tato studie se snažila dokázat vliv obou fytoestrogenů na metabolismus cholesterolu u hepatocytů. Byl pozorován výrazný vliv na metabolismus mastných kyselin, zejména některé enzymy. Výrazně byla snížena sekrece apolipoproteinu, konkrétně apoB[4]. Apolipoprotein B je hlavní součástí „low-density" lipoproteinů (LDL, známé také jako „špatný cholesterol"), které jsou zodpovědné za přenos cholesterolu do tkání. ApoB hraje hlavní roli na buněčném receptoru pro LDL, a i když není jeho úloha v LDL přesně objasněna, je známo, že je zcela esenciální pro uspořádání LDL částic[5].

Na téma snižování LDL cholesterolu byl proveden velmi zajímavý pokus. 143 dobrovolníků bylo rozděleno do dvou skupin, jedné byl podáván jogurt se sójovými proteiny a standardizovaným obsahem isoflavonů, druhá skupina dostávala placebo. Výsledkem byl výrazný pokles LDL cholesterolu ve skupině, která dostávala sójový jogurt oproti skupině konzumující placebo. Žádný vliv se neprojevil na snížení HDL cholesterolu, triacylglycerolů a homocysteinu[6].

Rovněž byl sledován vliv sóji na leukocyty, konkrétně neutrofily. Předpokládá se, že se podílejí na zvýšeném riziku vzniku kardiovaskulárních chorob. *In vitro* byla sledována produkce superoxidového aniontu a elastasy. Vznikaly agregáty neutrofilů, pozorované pod mikroskopem. Genistein a daidzein a také equol výrazně snižovaly svým působením produkci superoxidového aniontu a snižovaly vznik homotypických agregátů neutrofilů, uvolňování elastasy bránil zejména genistein. Z pokusů vyplývá, že kardioprotektivní účinky sóji mohou být právě důsledkem vlivu fytoestrogenů na mechanismus působení neutrofilních leukocytů. Celá studie byla založena na pozorování asijských zemí, kde dochází k vysoké konzumaci potravin obsahujících sóju a je významně snížena incidence kardiovaskulárních chorob[7].

Dalším ze sledovaných vlivů fytoestrogenům byl snížený výskyt karcinomu prostaty u asijských mužů. Stejný snížený výskyt byl rovněž prokázán u mužů dodržujících vegetariánskou skladbu jídelníčku. Společným znakem asijských mužů a mužů vegetariánů byla strava obsahující málo tuků a hodně vlákniny. Taková zdravá skladba stravy může sama o sobě vést ke snížení výskytu nejrůznějších chorob, takže přímá příčina nižšího výskytu karcinomu prostaty není zcela jasná[3].

Jinou rakovinou, která je spjata s působením hormonů, je rakovina prsu. Výzkum metabolismu isoflavonů genisteinu a daidzeinu prokázal, že jejich metabolický derivát isoflavan equol je velmi silným estrogenem a antioxidantem. Tato přeměna je závislá na vhodné mikroflóře subjektu, proto se neobjevuje u všech zkoumaných objektů[8].

Další epidemiologicky významnou chorobou je diabetes spojený s obezitou. Studie prokázaly, že příjem sóji a lněného semínka příznivě ovlivnil kontrolu hladiny glukosy a inzulinovou rezistenci. Na zvířecích modelech obezity se po konzumaci projevilo snížení hladiny insulinu. U lidských modelových objektů, které měly nebo neměly diabetes, se projevil příjem sóji zmírněním hyperglykémie a redukcí tělesné hmotnosti, hyperlipidémie a hyperinsulinémie[9].

V moderní společnosti je stále více rozšířeno chronické selhání ledvin, jen ve Velké Británii postihuje 5 – 10 % obyvatelstva. Nemoc má pět stádií, od prvotních mírných příznaků přes vývoj abnormalit s postupně se snižujícím podílem filtrátu z nefronů až k akutnímu selhání ledvin v pátém stádiu. Léčbou je dialýza nebo transplantace ledvin[10]. Několik nezávislých studií prokázalo, že prenatální dieta zahrnující příjem sójového proteinu ve srovnání s kaseinovou dietou vedla ke zmírnění vývoje ledvinového selhání v postnatální fázi života. Jmenovitě vedla k redukci zánětu, oxidativního poškození ledvin a buněčného dělení. Příjem sójových proteinů po ukončení kojení vedlo ke snížení infiltrace makrofágů až o 48 %. Nicméně nebyl pozorován tak blahodárný účinek, pokud tato sójová dieta byla započata až po ukončení kojení na rozdíl od započetí již v prenatální fázi. Toto pozorování naznačuje, že velmi záleží na vývojovém stádiu, ve kterém je započata intervence pomocí sójové diety. Týkalo se to zejména snížení proteinurie. Za vyzdvihnutí stojí fakt, že i krátkodobá terapie ve vhodný okamžik vývoje může mít dlouhodobé příznivé účinky[11].

Závěrem je nutno shrnout, že všechny uvedené poznatky o blahodárných účincích sóji, jsou založené na objektivním pozorování asijských populací, které celá století mají téměř neměnné složení stravy a vyvíjely se velmi izolovaně. Rozdíl v četnosti výskytu jednotlivých onemocnění je nasnadě přičítat právě oněm významným rozdílům ve stravě, které je možno tak snadno vypozorovat, zejména již mnohokrát výše citovaným fytoestrogenům. Nesmíme ovšem zapomínat ani na významný obsah bílkovin, nízký obsah tuků a vysoký podíl vlákniny. Sója je jediným plnohodnotným zdrojem bílkovin z rostlinné říše a složení tuků je velmi dieteticky vhodné. Bude zapotřebí ještě mnoho dalších studií na zvířecích i lidských modelech a nespočet analýz a důkazů potřebných k identifikaci jednotlivých látek a popsání jejich biologické aktivity.

Literatura:

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Phytoestrogen, *Wikipedia,* 17.11.2007.
2. Humfrey C.D.: *Natural Tox.*, **6**, 51-59 (1999).
3. Denis L.M.M.: *Europ. Urol.*, 35, 377-387 (1999).
4. Borradaile N.M.: *Biochem. J.*, **366**, 531-539 (2002).
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Apolipoprotein_B, *Wikipedia,* 25. 11. 2007.
6. Puska P.K.V.: *Brit. J. Nutr.*,. **91**, 393-401(2004).
7. Rotondo S., et al.: *Brit. J. Nutr.*, **97**, 1-8 (2007).
8. Wiseman H.: *Expert Opin. Investig. Drugs*, **9**, 1829-1840 (2000).
9. Bhathena S.J., Velasquez M.T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1191-1201 (2002).
10. http://en.wikipedia.org/wiki/ Chronic_kidney_disease, *Wikipedia,* 17.11.2007.
11. McMullen S.: *Brit. J. Nutr.*, **97**, 4-5 (2007).

O B S A H

Káš J.: **Úvodem** 1

Šebo P.: **BIOCEV – Biotechnologické centrum AV ČR** 2

Kolouchová I., Moravcová L.: **Fototransformace a biotransformace stilbenických sloučenin** 3

Sochorová V.: **Biologická degradace polycyklických aromatických uhlovodíků** 7

Plánská D., Horák V.: **Maligní melanom: uplatnění adhezívních molekul a proteinů extracelulární matrix v rozvoji onemocnění** 9

Řehák M.: **Detekce mikroorganismů pomocí polymerasové řetězové reakce** 13

Tůma Š.: **Laktobacily – nové možnosti využití při výrobě sýrů a dalších mléčných výrobků** 16

Tizolová A.: **Fytoestrogeny a další zdraví prospěšné látky v sóji** 20

C O N T E N T S

Káš J.: **Editorial** 1

Šebo P.: **BIOCEV – Biotechnology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic** 2

Kolouchová I., Moravcova L.: **Phototransformation and biotransformation of stilbene compounds** 3

Sochorová V.: **Biological degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons** 7

Plánská D., Horák V.: **Malignes melanom: participation of the adhesive molecules and proteins of extra cellular matrix in illness development** 9

Řehák M.: **Detection of microorganisms by means of polymerase chain reaction** 13

Tůma Š.: **Lactobacilli – new options in processing of cheeses and other dairy products** 16

Tizolová A.: **Phytoestrogens and other health promoting compounds in soy** 20

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,
aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako “attachment” spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ,** nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. Nepoužívejte automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji L. Fukal

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994