

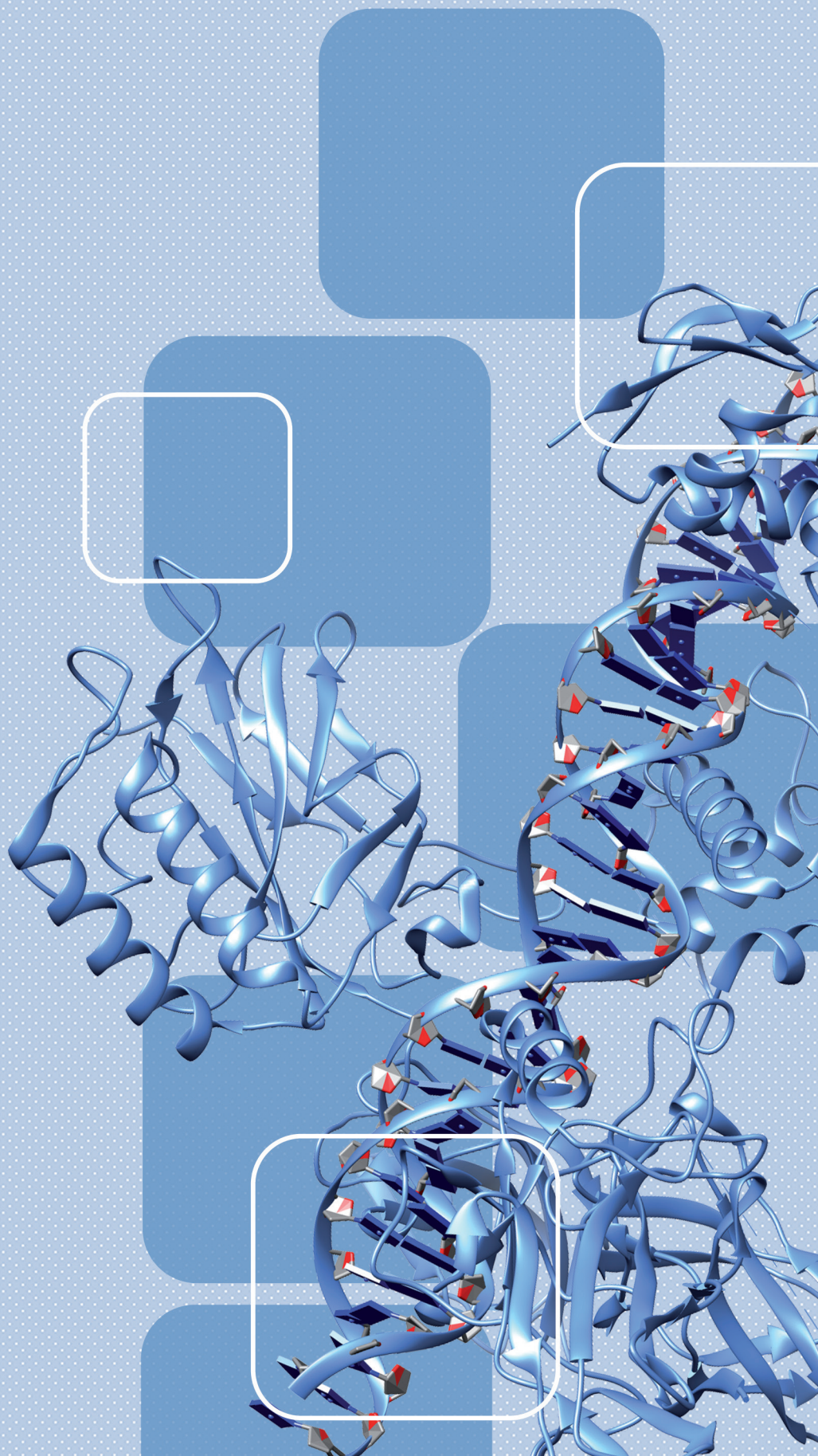
Bio

Ročník 29 • Číslo 1/2019

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

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



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and 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

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

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 vitally 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 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. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee 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 cooperation 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 Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás již ve 29. ročníku bulletinu Biotechnologické společnosti. Věříme, že jste si náš čtvrtletník oblíbili a nacházíte tam alespoň některé články, které Vás zajímají. Snažíme se, aby obsah jednotlivých čísel byl tematicky co nejpestřejší. Záleží, však především na přispěvatelích do jaké míry nám v této snaze pomohou. Obracíme se tedy na Vás, abyste neváhali a téma, která Vás oslovila, jste zpracovali do přehledného článku a podělili se s námi o Váš zážitek, případně doporučili námět k další vědecké práci či orientaci k novým biotechnologickým přístupům či k případné výrobě zajímavých produktů.

Tento rok také uplyne 20 let od navázání bližší spolupráce mezi českými a švýcarskými biotechnology, a to jak na úrovni akademické, spolkové i industriální. Základem bylo 1. Česko-švýcarské symposium, které se konalo v budově A VŠCHT v Praze ve dnech 4. – 7. 9. 1999. Společné česko-švýcarské akce jsou uvedeny v tabulce pod úvodníkem. Tato společná setkání pořádaná ve tříletých intervalech byla postupně transformována na mezinárodní setkání. Informace o posledním setkání konaném v Národní technické knihovně lze dosud nalézt na webové stránce www.biotech2017.cz. V podobném duchu připravujeme pro příští rok již 8. biotechnologické symposium, tentokrát opět na půdě VŠCHT a sice v budově B ve dnech 17. – 19. 6. 2020 s obvyklou exkurzí plánovanou na sobotu 20. 6. 2020. Webové stránky www.biotech2020.cz byly již otevřeny a postupně budou aktualizovány. Detailní program symposia, zejména zaměření sekcí, můžete ještě ovlivnit tak, aby Vám to konvenovalo, a proto Vás žádáme o spolupráci. Věříme, že využijete této příležitosti, zúčastníte se a pozvete do Prahy své zahraniční kolegy a přátele. Ubezpečujeme Vás, že nejen vědecký, ale i společenský program, včetně plánované exkurze, bude na vysoké úrovni a účastníci budou na tuto akci rádi vzpomínat. Zachováme i ostatní osvědčené aktivity jako např. vydání speciálního čísla nejvýznamnějšího biotechnologického časopisu *Biotechnology Advances* (Impact factor nyní cca 11) pod názvem „*Biotechnology Novelties*“. Vydání tohoto čísla již bylo

odsouhlaseno hlavním redaktorem a nakladatelstvím Elsevier. Těšíme se na Vaše náměty a aktivní spolupráci při organizaci, pokud projevíte zájem.

V každém našem úvodníku se vždy věnujeme některému významnému výročí. Tentokrát nemůžeme zapomenout na výročí, které zásadním způsobem ovlivnilo rozvoj chemie a všech disciplín na ni navazujících, a to jsou prakticky všechny přírodní vědy, včetně všech medicíny a farmacie. Byl to významný objev zejména s přihlédnutím k úrovni tehdejších znalostí. Před 150 lety (6. března 1869) Dmitrij Ivanovič Mendělejev publikoval v časopise Ruské chemické společnosti příspěvek „Vztah vlastností prvků k atomovým hmotnostem“. Mendělejev zde definoval známý periodický zákon, že vlastnosti chemických prvků jsou periodickou funkcí jejich atomových hmotností. V té době bylo známo pouze 64 chemických prvků. V roce 1870 Mendělejev tabulku doplnil o nově objevené prvky a publikoval práci s názvem „Přirozená soustava prvků a její použití k udání vlastností prvků dosud neobjevených“. Mendělejevovi se dostalo celosvětového uznání s výjimkou udělení Nobelovy ceny, přestože na ní byl nominován v roce 1906 (nebyl schválen údajně „díky“ jeho rivalovi Švédovi Arheniovi) a nestal se ani členem Ruské akademie věd (údajně proto, že se rozvedl a byl podruhé ženat). V roce 1889 se však stal členem American Academy of Arts and Sciences. K jeho dalším připomenutím resp. pozdějším oceněním patří po něm pojmenovaný kráter na měsíci, minerál mendelevit, či prvek č. 101 nazvaný mendelevium. Po celý svůj život byl Mendělejev člověk skromný a pokorný, jehož hlavním krédem byla pracovitost. Narodil se v sibiřském Tobolsku jako nejmladší ze 17 dětí, ale od studií byl jeho život spojen s Petrohradem. Přednášel také v Německu a ve Francii. Kamarádil se s českým chemikem Bohuslav Braunem, kterého navštívil v Praze v roce 1900.

Milí čtenáři Bioprospectu přejeme Vám hezké jaro a těšíme se na další spolupráci.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

Přehled česko-švýcarských symposií

- 1st Czech-Swiss symposium, Prague, 4. – 7. 9. 1999
- 2nd Czech-Swiss symposium, Prague, 7. – 8. 11. 2002
- 3rd Swiss-Czech Symposium **BioTech 2005** Advances in Yeast Biotechnology, Wädenswil, May 17 – 19, 2005
- 4th Swiss-Czech Symposium, **BioTech 2008** Biopharmaceuticals: why use yeast, Wädenswil, May 22 – 23, 2008
- 5th Czech-Swiss Symposium **BioTech 2011**, Prague, June 15 – 17, 2011 Post-symposium: Plant Biotechnology: **Green for Good** Olomouc, June 19 – 22, 2011 (Centrum regionu Haná). Toto post-symposium bylo transformováno na samostatnou akci ve spolupráci s EFB (European Federation of Biotechnology)
- 6th Czech-Swiss Symposium **Biotech 2014**, Prague, June 11 – 14, 2014
- 7th Czech-Swiss Symposium **BioTech 2017**, Prague, June 13 – 17, 2017
- **8th Czech-Swiss Symposium BioTech 2020, Prague, June 17 – 20, 2020 (v přípravě)**

MOŽNOST VYUŽITÍ VINAŘSKÉHO ODPADU JAKO ZDROJE POLYFENOLOVÝCH SLOUČENIN

Maria Vrublevskaya

VŠCHT Praha, Ústav biotechnologie; vrublevm@vscht.cz

Úvod

Pěstování hroznů je jedna z nejstarších výrobních činností ve světě a jejich velká část je určena k výrobě vína. Víno je tradičním výrobkem pro velký počet zemí, jako například jihozápadní evropské státy, obsahující vinařské regiony (Francie, Řecko, Španělsko, Itálie a Portugalsko)¹.

Produkce vína je spojena s nezanedbatelným množstvím vedlejších produktů, které se skládají převážně z organických odpadů, odpadních vod (včetně vody po sanitaci tanku a celých provozu) a anorganických zbytků². Odpad tvoří při výrobě vína skoro 22 hm. % celkového množství vstupních surovin. Mezi hlavní vedlejší produkty zpracování vinných hroznů patří matoliny (13 hm. %), třapiny (3 hm. %) a vinné kaly (6 hm. %)³. Třapiny jsou odpad, vznikající již na počátku zpracování hroznů při jejich odzrnutí⁴. Vinné matoliny jsou zbytky z lisování rmutu, obsahující semena, slupky a stopky, které nebyly řádně odseparovány. Matoliny jsou relativně často zpracovávány na matolinovou pálenku, která se vyrábí ze zkvašených matolin. Dalším vedlejším produktem jsou vinné kaly, sediment vzniklý po samotném kvašení a dokvašení hroznového moštu, obsahující především mikrobiální biomasu⁴. Po vylisování hroznů, se zbývající třapiny a nevyužití matoliny, které nejsou považovány za ekonomicky výnosné odpady spolu s listy a letorosty, přidávají do kompostu nebo se likvidují na otevřených plochách, což potenciálně zvyšuje ekologickou zátěž. To je dáno tím, že vinařské odpady obsahují velký podíl polyfenolových látek snižujících pH půdy⁵. Z toho důvodu se zvyšuje poptávka na rozvoj inovativních postupů recyklace a opětovnému použití odpadních produktů. Tak například, mezi odpadní produkty vinařství, které již našly opětované využití, patří vinný kamen (hydrogenvinan draselný), ze kterého se vyrábí vinná kyselina. Získané z jiných vinařských odpadů látky, jako polyfenolové sloučeniny by mohly pak najít uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu⁶⁻⁸. Druh produkovaných odpadů úzce závisí na specifických způsobech vinifikace, která je také ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi zbytkových látek. Tyto charakteristiky určují další využití získaných látek⁹.

Biologické aktivní látky z vinařských odpadů

Hlavní organické odpady vinařského průmyslu představují matoliny, obsahující semena, slupky, a částečně třapiny a listy⁹.

Biologicky aktivní látky přítomné ve vedlejších produktech vinařství většinou představují polyfenolové sloučeniny. Jsou to látky, které se strukturně skládají

z jednoho či více aromatických kruhů, na nichž jsou navázané různé funkční skupiny. Tudíž, jejich chemické struktury zahrnují jak jednoduché molekuly jako fenolové kyseliny, tak i komplexní struktury^{10,11}. Tyto sloučeniny se podílejí na senzorických vlastnostech vína (barva, vůně, chuť a hořkost), proto jsou zajímavé jako možné zdroje přídatných a pomocných látek¹².

Fenolové sloučeniny přítomné ve vedlejších produktech vinné révy jsou součástí různých metabolických drah zodpovědných za ochranu rostlinných buněk vůči biotickým i abiotickým stresovým účinkům a působení patogenů¹³.

Tyto sekundární metabolity patří k různým skupinám chemických látek, včetně fenolových kyselin, flavonoidů a stilbenů, které patří mezi biologicky aktivní látky, se širokým spektrem účinků¹⁴.

Fenolové kyseliny

Mezi fenolové kyseliny patří deriváty kyseliny benzoové a skořicové, přičemž větší podíl ve vedlejších produktech vinařského průmyslu tvoří hydroxyskořicové kyseliny. Tyto sloučeniny se často vyskytují ve formě glykosylovaných derivátů nebo esterů kyseliny chinové a šikimové.

Kyselina gallová je nejhojněji se vyskytující derivát hydroxybenzoové kyseliny obsažený ve stoncích, slupkách a semenech hroznů. Hydroxyskořicové kyseliny jako kaftarová kyselina se nachází ve všech částech bobule, přičemž jejich obsah klesá během procesu dozrávání^{15,16}.

Flavonoidy

Flavonoidy jsou nízkomolekulární sloučeniny, strukturně obsahující 15 uhlíkových atomů¹⁷. V odpadech z průmyslového zpracování hroznů byly popsány flavonoly, flavan-3-oly, flavony, antokyany a další, které se mezi sebou liší oxidačním stupněm v centrálním pyranovém kruhu¹⁸.

Flavonoly jsou charakterizované přítomností dvojně vazby, mezi C2 a C3 uhlíkem a hydroxylovou skupinou v poloze C3. Na tyto sloučeniny se mohou vázat i cukry, za vzniku glykosidů, glukuronidů a diglykosidů. Dané látky jsou také schopny reagovat s antokyany a tvořit stabilnější pigmenty^{7,19}. Nejčastějšími flavonoly, obsaženými ve stoncích červených hroznů, jsou deriváty kvercetinu, které jsou většinou ve formě kvercetin-3-O-glukuronidu^{8,20}.

Flavan-3-oly jsou flavonoidy, které mají na C3 uhlíku hydroxylovou skupinu a nemají karbonylovou skupinu na C4. Tato skupina flavonoidů je zodpovědná za barvu a organoleptické vlastnosti vína (hořkost, svíravost). Hlavní složkou ze skupiny flavanolů, která byla identifi-

kována ve vinařských odpadech, je katechin. Jeho koncentrace ve stoncích je vyšší než ve slupce a semenech a jeho obsah je u bílých a červených hroznů srovnatelný^{24,22}. Flavony jsou sloučeniny, které mají dvojnou vazbu mezi C2 a C3 uhlíkem ale na rozdíl od flavonolu postrádají hydroxylovou skupinu na uhlíku C3. Jejich množství v hroznech je nevýznamné, až na výjimku luteolinu²³.

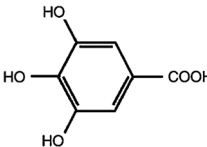
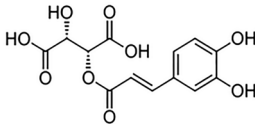
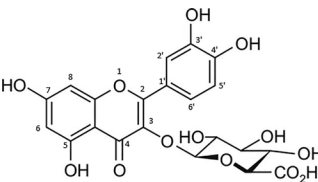
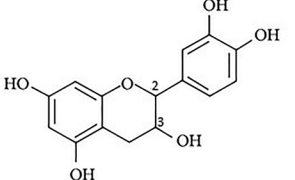
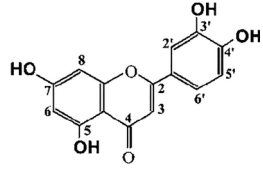
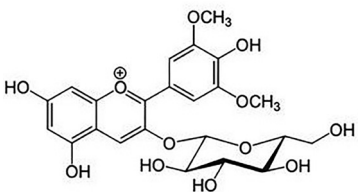
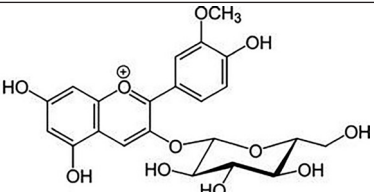
Antokyany jsou dobře ve vodě rozpustné flavonoidy, které jsou zodpovědné za barvu slupek modrých hroznů a červených vín. Tyto sloučeniny se skládají z aglykonu antokyanidinu, na který je navázána cukerná složka. Antokyany jsou relativně nestabilní a rychle oxidují. Jsou citlivé vůči různým faktorům, jako je pH, teplota a ultrafialové záření, které mohou ovlivňovat jejich stabilitu²⁴. Nejvíce antokyanů se nachází ve slupce bobulí, ze kterých pak barviva po nakvašení přecházejí do moštu²⁵. Nejhojnějšími zástupci antokyanů v bobu-

lích hroznů jsou malvidin-3-O-glykosid a peonidin-3-O-glykosid^{26–28}.

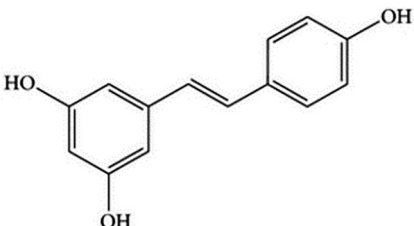
Stilbeny

Stilbeny jsou fenolové sloučeniny, které z chemického hlediska obsahují dvě aromatická jádra spojená ethylenovým můstkem²³. Ve vinařských odpadech jsou většinou obsaženy stilbeny v hroznových slupkách, ale také ve stoncích a semenech^{11,29}. Nejvýznamnějším zástupcem ze skupiny stilbenů je resveratrol, disponující antioxidační a antimikrobiální aktivitou. Tato látka je přítomna jak v různých organických zbytcích vinařského průmyslu, tak i ve vině^{30–32}. Resveratrol se vyskytuje ve formě dvou izomerů *cis* a *trans*, přičemž převažuje *trans* forma, která je více stabilní a má větší biodostupnost. Hrozny produkují stilbeny jako odpověď na řadu fyziologických stresových faktorů jako jsou například UV záření a mechanické poranění³³.

Tab. I. Přehled nejvýznamnějších polyfenolů obsažených v révě vinné a jejich fyziologické účinky.

Strukturní vzorec	Název	Fyziologické účinky	Reference
	Gallová kyselina	Antioxidační, protirakovinný, antimikrobiální	34,35,36
	Kaftarová kyselina	Antioxidační	35,37
	Kvercetin-3-O-glukuronid	Antioxidační, kardioprotektivní, antimikrobiální	38,35,39,40,41
	Katechin	Antioxidační, kardioprotektivní, protirakovinný, protizánětlivý, antimikrobiální	42,35,40,43,41,36,44
	Luteolin	Antioxidační, protirakovinný	45,35,46
	Malvidin-3-O-glykosid	Antioxidační, protirakovinný	47,35,48,49
	Peonidin-3-O-glykosid	Antioxidační, protirakovinný	47,35,49

Tab. I. Přehled nejvýznamnějších polyfenolů obsažených v révě vinné a jejich fyziologické účinky (pokračování).

Strukturní vzorec	Název	Fyziologické účinky	Reference
	<i>trans</i> -resveratrol	Antioxidační, kardioprotektivní, protirakovinný, antimikrobiální	50,35,40,41,51,52

Tab. II. Obsah vybraných fenolových látek ve vybraných částech révy vinné a víně.

(U červeného a bílého vína je obsah vyjádřen v mg/l, u částí révy vinné je obsah vyjádřen v mg/g).

Vybrané části révy vinné/ produkty	Celkový obsah polyfenolů	Gallová kyselina	Katechin	Malvidin-3-glukosid	<i>Trans</i> -resveratrol	Reference
Červené víno	812,01	33,9	7,88	87,33	3,11	53,54,55
Bílé víno	290 ± 70	1,24 ± 0,06	1,59 ± 0,01	–	0,19 ± 0,03	56,57
Letorosty	26,96	–	283,7	–	37,1	58
Slupky	–	–	1,1 ± 0,1	1,55	–	55
Semena	4,90 ± 0,08	–	30,4 ± 0,7	–	–	59,60,55

Biologická aktivita polyfenolových látek z vinařských odpadů

Jak již bylo zmíněno výše, odpady z vinařství obsahují vysoký podíl sekundárních metabolitů, včetně fenolových kyselin, flavan-3-olů, flavonolů, antokyanů a stilbenů⁶¹. V současné době jsou již tyto látky známy svými biologickými účinky – antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, protirakovinná aktivita a ochrana kardiovaskulárního systému. Tyto účinky polyfenolových látek nachází uplatnění ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu^{62,63}.

Jednou z nejvýznamnějších aktivit připisovaných fenolovým sloučeninám je založena na jejich antioxidačních schopnostech. Zabraňují oxidaci frakce cholesterolu označované jako LDL (z angl. „low density lipoproteins“), agregaci krevních destiček a poškození červených krvinek, prostřednictvím vychytávání volných radikálů⁶⁴. Navíc jsou fenolové látky chelátory kovů^{61,63,65}. Polyfenolové látky v odpadech z vinařských procesů působí proti oxidačnímu poškození biologických systémů a mohou zabránit rozvoji degenerativních onemocnění spojených s oxidačním stresem^{27,37}. Například, zabránění radikálové oxidace polynenasycených mastných kyselin frakce cholesterolu označované jako LDL má přímý důsledek na prevenci výskytu kardiovaskulárních onemocnění⁶⁷. Tato schopnost byla prokázána snížením výskytu onemocnění srdce u populace konzumující stravu bohatou na fenolové látky^{68–70} s antioxidačními schopnostmi.

Antokyan se podílejí na antioxidační aktivitě hroznů více než flavonoly, flavan-3-oly a fenolové kyseliny⁷¹. V této souvislosti je kladen velký důraz na slupky bobu-

lí, kvůli vysokému obsahu antokyanů a proantokyanidinů^{1,72}. Extrakty z hroznových semen mohou být použity třeba i ke snížení absorpce a akumulace tuků v potravě, kvůli schopnosti polyfenolových látek působit inhibičně na enzymy metabolizující tuky (pankreatickou lipasu a lipoprotein lipasu)⁷³.

Antokyan z hroznových matolin disponují inhibiční aktivitou vůči endoteliální NADPH oxidase, enzymu zodpovědnému za zvýšení produkce radikálů kyslíku (ROS). Působením antokyanů dochází ke snížené produkci ROS jak na extra – tak i na intracelulární úrovni⁷⁴.

Nicméně polyfenolové látky z vinařských odpadů mají další významnou aktivitu se zdravotním benefitem. Polyfenolové extrakty z hroznových semen a matolin vykazují efektivní antimikrobiální schopnosti. Jsou účinné proti gram pozitivním bakteriím jako *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus coagulans*. Vyšší antimikrobiální aktivitu vykazují polyfenolové látky vůči zástupcům gramnegativních bakterií, například *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁵. Také byla prokázána antifungální aktivita extraktů hroznových matolin vůči *Botrytis cinerea*. Navíc, bylo zjištěno, že kyselina kávová, kvercetin a kvercetin-3-O-rutinosid působí inhibičně na buňky *Listeria monocytogenes*⁷⁶. Jiné studie ukazují, že extrakty ze semen červených a modrých hroznů inhibují růst kvasinek *Candida albicans* a bakterií *E. coli*, *Salmonella typhimurium*^{75,77,78}.

Kromě zmíněné antioxidační a antimikrobiální aktivity, polyfenolové látky vykazují další zajímavé aktivity. Je to například jejich schopnost potlačovat cyklooxygenasovou aktivitu a schopnost uvolnění histaminu z buňek (mastocytů a bazofilů)¹⁷. Vzhledem ke zmíněným

vlastnostem, polyfenolové látky získané z vinařských odpadů, by mohly sloužit jako doplněk stravy účinný pro prevenci oxidativního stresu a chronických zánětlivých stavů^{80,81}.

Závěr

Velký podíl pěstovaných hroznů je produkován velkými vinařstvími. Výroba vína je spojená s produkcí velkého množství vinařských odpadů jako matoliny, třapiny a vinohradnických odpadů jako listy a letorosty. Tyto odpadní produkty jsou zdrojem široké škály polyfenolových látek jako jsou fenolové kyseliny, flavonoidy

a stilbeny, které disponují biologickou aktivitou. Rozvoj v recyklaci odpadních produktů z vinařství a vinohradnictví by mohl poskytnout cenný materiál, který by mohl být využit jako doplněk stravy nebo k výrobě potravin fortifikovaných o polyfenoly^{82,83}, což může přispět ke snížení nákladů a také dopadů na životní prostředí, spojených s likvidací vedlejších produktů ve výrobních oblastech.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem TH03030271 Technologické agentury Česká republika (TAČR).

Literatura

1. Poudel PR, Tamura H, et al.: *J. Food Compos. Anal.* 21, 622 (2008).
2. Musee N, Lorenzen L, Aldrich C: *J. Clean. Prod.* 15, 417 (2007).
3. Cviner P, Pádřová K, Kolouchová I: *Chem. listy* 111, 103-108 (2017).
4. Pavloušek P: *Výroba vína u malovínařů*. Grada, Praha 2010.
5. Sahpazidou D, Geromichalos GD, et al.: *Toxicol. Lett.* 230, 218 (2014).
6. Saura-Calixto F: *J. Agric. Food Chem.* 46, 4303 (1998).
7. Shrikhande AJ: *Food Res. Int.* 33, 469 (2000).
8. Negro C, Tommasi L, Miceli A: *Bioresour. Technol.* 87, 41 (2003).
9. Oliveira DA, Salvador AA, et al.: *J. Biotechnol.* 164, 423 (2013).
10. Kris-Etherton P, Hecker KD, et al.: *Am. J. Med.* 113, 71 (2002).
11. Katalinić V, Možina SS, et al.: *Food Chem.* 119, 715 (2010).
12. Shahidi F, Nacz M: *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Boca Racon 2003.
13. Nacz M, Shahidi F: *J. Chromatogr. A* 1054, 95 (2004).
14. Kähkönen MP, Hopia AI, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954 (1999).
15. Anastasiadi M, Pratsinis H, et al.: *LWT – Food Sci. Technol.* 48, 316 (2012).
16. Apostolou A, Stagos D, et al.: *Food Chem. Toxicol.* 61, 60 (2013).
17. Balasundram N, Sundram K, Samman S: *Food Chem.* 99, 191 (2006).
18. Baderschneider B, Winterhalter P: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2788 (2001).
19. Jeffery DW, Parker M, Smith PA: *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 153 (2008).
20. Souquet JM, Labarbe B, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1076 (2000).
21. Rodríguez Montealegre R, et al.: *J. Food Compos. Anal.* 19, 687 (2006).
22. Burdock GA, Fenaroli G: *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. CRC Press, Boca Racon 2005.
23. Garrido J, Borges F: *Food Res. Int.* 54, 1844 (2013).
24. de Pascual-Teresa S, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1679 (2010).
25. Di Lecce G, Arranz S, et al.: *Food Chem.* 145, 874 (2014).
26. Amico V, Chillemi R, et al.: *Bioresour. Technol.* 99, 5960 (2008).
27. Amico V, Napoli EM, et al.: *Food Chem.* 88, 599 (2004).
28. Ky I, Lorrain B, et al.: *Molecules* 19, 482 (2014).
29. Liu C, Wang L, et al.: *Food Chem.* 136, 643 (2013).
30. Ribeiro De Lima MT, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 2666 (1999).
31. Moreno-Labanda JF, Mallavia R, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 5396 (2004).
32. Püssa T, Floren J, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 7488 (2006).
33. Vannozzi A, Dry IB, Fasoli M, et al.: *BMC Plant Biol.* 12, 130 (2012).
34. Reckziegel P, Dias VT, Benvegnú DM, et al.: *Toxicol. Reports* 3, 351 (2016).
35. Xia E, He X, Li H, et al.: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.* 1, 47 (2013).
36. Fan P, Lou H: *Mol. Cell. Biochem.* 267, 67 (2004).
37. Chen H-J, Inbaraj BS, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 13, 260 (2011).
38. Park J-Y, Lim M-S, et al.: *Biomol. Ther. (Seoul)*. 24, 610 (2016).
39. Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM: *Food Control* 18, 93 (2007).
40. Auger C, Teissedre P-L, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 2015 (2005).
41. Auger C, Gérain P, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 5297 (2004).
42. Malaguti M, Angeloni C.: *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1 (2013).
43. Panico AM, Cardile V, et al.: *Phytomedicine* 13, 522 (2006).
44. Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 457 (2009).
45. Lemańska K, van der Woude H, et al.: *Free Radic. Res.* 38, 639 (2004).
46. Wenzel U, Kuntz S, al.: *Cancer Res.* 60, 3823 (2000).
47. Fornasaro S, Ziberna L, et al.: *Sci. Rep.* 6, 22815 (2016).
48. Kulisic-Bilusic T, Schnäbele K, et al.: *Eur. Food Res. Technol.* 228, 417 (2009).

Literatura (pokračování)

49. Shih P-H, Yeh C-T, Yen G-C: *J. Agric. Food Chem.* 55, 9427 (2007).
50. Gambini J, Inglés M, et al.: *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1 (2015).
51. Uysal B, Sozmen F, Buyuktas BS: *Nat. Prod. Commun.* 5, 111 (2010).
52. Lau KM, LaSpina et al.: *Cancer Res.* 60, 3175 (2000).
53. Dóka O, Bicanic D: *Anal. Chem.* 74, 2157 (2002).
54. Gambelli L, Santaroni G.: *J. Food Compos. Anal.* 17, 613 (2004).
55. De Freitas V, Proença S, et al.: *Cienc. y Tecnol. Aliment.* 3, 102 (2009).
56. Lukić I, Jedrejčić N, et al.: *Food Technol. Biotechnol.* 53, 407 (2015).
57. Jagatić Korenika A-M, Mihaljević Žulj M, et al.: *Mitteilungen Klosterneubg.* 64, 171 (2015).
58. Mikeš O, Vrchotová N, et al.: *Czech J. Food Sci.* 26, 182 (2008).
59. Mandić AI, Đilas SM, et al.: *Int. J. Food Prop.* 11, 713 (2008).
60. Shi J, Yu J, et al.: *J. Med. Food* 6, 291 (2004).
61. Corrales M, Toepfl S, et al.: *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 85 (2008).
62. Gonzalez-Centeno MR, Jourdes M, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 11850 (2012).
63. Yilmaz EE, Özvural EB, Vural H: *J. Supercrit. Fluids* 55, 924 (2011).
64. Cheynier V: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 223 (2005).
65. Boussetta N, Lanoisellé JL, et al.: *J. Food Eng.* 95, 192 (2008).
66. Ames BN: *Free Radic. Res. Commun.* 7, 121 (1989).
67. Rimm EB, Stampfer MJ, et al.: *N. Engl. J. Med.* 328, 1450 (1993).
68. Jialal I, Grundy SM: *J. Lipid Res.* 33, 899 (1992).
69. Kinsella J, Frankel E, et al.: *Food Technol.* 47, 85 (1993).
70. Esterbauer H, Gebicki J, et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341 (1992).
71. Jakobek L, Šeruga M, et al.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 860 (2009).
72. Rockenbach II, Gonzaga LV, et al.: *Food Res. Int.* 44, 897 (2011).
73. Moreno DA, Ilic N, et al.: *Nutrition* 19, 876 (2003).
74. Álvarez E, Rodiño-Janeiro BK, et al.: *J. Cell. Biochem.* 113, 1386 (2012).
75. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK: *Food Chemistry* 73(3), 285-290 (2001).
76. Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM: *Food Control* 18, 93 (2007).
77. Ahn J, Grün IU, Mustapha A: *J. Food Prot.* 67, 148 (2004).
78. Ahn J, Grün IU, Mustapha A: *Food Microbiol.* 24, 7 (2007).
79. Alexander RW: *Hypertens.* 25, 155 (1995).
80. Kritchevsky SB, Bush AJ, et al.: *Am. J. Epidemiol.* 152, 1065 (2000).
81. Brighenti F, Valtueña S, et al.: *Br. J. Nutr.* 93, 619 (2005).
82. Lavelli V, Sri Harsha PSC, et al.: *Food Chem.* 152, 162 (2014).
83. Chouchouli V, Kalogeropoulos N, et al.: *LWT – Food Sci. Technol.* 53, 522 (2013).

Souhrn

Vrublevskaya M.: Možnost využití vinařského odpadu jako zdroje polyfenolových sloučenin

Vitis vinifera, neboli réva vinná, je ekonomicky významná plodina. Během pěstování révy vinné dochází k produkci bioodpadů, které mohou být zdrojem mnoha prospěšných látek. Největší potenciál představuje využití polyfenolových látek obsažených v stoncích, listech, slupkách a semenech hroznů. Biologická aktivita těchto látek spočívá především v jejich antioxidačních, antimikrobiálních a protizánětlivých vlastnostech, které mohou být využity ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Klíčová slova: vinařský průmysl, odpad, polyfenolové látky, biologická aktivita

Summary

Vrublevskaya M.: Possibilities of reuse of winemaking industry waste as possible source of polyphenolic substances

Vitis vinifera, or grapevine, is economically significant crop. However, the winemaking industry is one of the major producers of bio-waste that can be a source of many valuable substances. The greatest potential is represented by polyphenolic substances which are contained in stems, leaves, peels and grape seeds. The biological activity of these substances is based on their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties, which can be used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Keywords: winemaking, waste, polyphenolic substances, biological activity

ULCERÓZNÍ KOLITIDA – SOUČASNÉ POZNÁNÍ

Martin Zavřel

Oddělení Biochemické farmakologie Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v. v. i.; zavrel@uochb.cas.cz

Úvod

Ulcerózní kolitida, nebo též idiopatická proktokolitida, je chronické onemocnění střevní sliznice tlustého střeva. V některých případech může být poškozena až hranice tlustého a tenkého střeva. Jedná se o výsledek deregulovaného imunitního systému ve střevní sliznici u lidí s genetickou predispozicí k tomuto onemocnění. Nemoc se projevuje zánětlivými změnami ve sliznici, často provázenými vředy. Imunitní systém v tomto případě nesprávně a přecitlivěle reaguje na přirozené antigeny přítomné v tlustém střevě.

Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida je chronickým zánětlivým onemocněním tlustého střeva a konečníku s typickým střídáním bezpříznakového období (remise) s akutními fázemi aktivní nemoci (ataka). Nemoc může propuknout v různých stupních intenzity. Je poněkud ve stínu známějšího onemocnění – Crohnovy choroby, postihující tenké střevo, přestože projevy a farmakologická léčba obou onemocnění jsou si velmi podobné. Na základě dat z populační studie ve Spojených Státech byla v roce 2008 četnost onemocnění zjištěna u 34 dětí a v dospělé populaci 263 osob z 100 000 s pomalu se zvyšující tendencí¹. Četnost onemocnění je vyšší v rozvinutých zemích, což je zřejmě spojeno s vlivem prostředí přímo souvisejícím s industrializací. Nemoc je také častější v severnějších zeměpisných šířkách². Zajímavostí je, že odstranění slepého střeva před 20. rokem věku působí jako částečná prevence před ulcerózní kolitidou, ačkoli je mechanismus neznámý³. Tento článek si bere za cíl představit současné poznání ve výzkumu příčin nemoci a mechanismů její léčby, nikoli suplovat popis průběhu nemoci či léčby z lékařského hlediska.

Průběh nemoci

Nemoc se projevuje zánětem a vředy v mukóze, řidčeji v submukóze tlustého střeva. Příznaky nemoci se nejčastěji objevují mezi 15 a 30 rokem života, přičemž muži i ženy jsou postiženi stejně často⁴. Nemoc může mít různou intenzitu od lehké, přes střední, až po těžkou formu. Zánětlivé procesy v tlustém střevě mohou způsobovat bolesti, častější vyprazdňování (až 15x za den) a průjem. Často jsou přidružené symptomy s různou intenzitou, jako je hlen a krev ve stolici, vedoucí v těžších případech až k anémii, ztráta chuti k jídlu, horečka a nevolnost. Toto onemocnění navíc zvyšuje i riziko karcinomu tlustého střeva, nemá ale jinak vliv na předpokládanou délku života. Zhruba pětina pacientů za svůj život potřebuje akutní hospitalizaci spojenou s aktivní fází nemoci (relaps)⁵. Dle americké studie⁶, až 15 % případů vede do 20 let od propuknutí nemoci k chirurgickému odstranění buď části, nebo celého tlustého střeva. Přesto se díky i novým léčivům a postupům četnost tohoto chirurgického zásahu postupně snižuje⁷.

Příčiny vzniku a rizikové faktory

Vznik ulcerózní kolitidy zřejmě souvisí s kombinací několika faktorů, jakými jsou vrozená dědičnost, vliv prostředí a složení střevního mikrobiomu.

Dosud bylo nalezeno 99 genových lokusů představujících rizikový faktor pro rozvoj zánětlivého onemocnění střev, z toho 47 je vázaných přímo na ulcerózní kolitidu. Ulcerózní kolitida a Crohnova choroba sdílí 28 z celkových 99 ve studii identifikovaných lokusů⁸. Většina genů podezřelých z podílu na etiopatogenezi ulcerózní kolitidy je spojena s vrozenou imunitou, regulací imunitního systému, imunitních signálních drah, eliminací bakteriální infekce a funkcí epitelu jakožto bariéry. Sekvencí a porovnáním genomů pacientů se zdravými lidmi byly identifikovány variace v genech pro interleukiny (*IL2*, *IL10*, *IL12B*, *IL19*, *IL21*, *IL26*), jejich receptory (*IL1R2*, *IL7R*, *IL8RA*, *IL8RB*, *IL17REL*, *IL23R*), interferon γ (*IFNG*), geny pro TNF a jejich receptory (*TNFRSF6B*, *TNFRSF8*, *TNFRSF9*, *TNFRSF14*, *TNFRSF15*) transkripční faktory (*JAK2*, *SMAD3*, *STAT3*, *ZFP90*, *IKZF3*, *PRDM1*, *IRF5*, *ZBTB46*, *ZGPAT*), geny ovlivňující integritu střevního epitelu (*GSDML*, *EXOC3*, *GNA12*, *HNF4A* a *LAMB1*), dále geny podílející se na aktivaci makrofágů (*MST1*) či mobilitě neutrofilů (*LSP1*), členy apoptotických drah (*DAP*, *CARD9*), receptor prostaglandinů (*PTGER4*) a další geny včetně členů signálních drah (*INPP5E*, *SDCCAG3*, *PIM3*) a geny podílející se na vrozené a adaptivní imunitě (*ICOSLG*)^{8,9}. Nezdá se, že by za onemocnění byl zodpovědný jen jeden gen, ale spíše jejich kombinace.

Jako další rizikový faktor pro rozvoj ulcerózní kolitidy byla popsána též nízká hladina vitaminu D, respektive abnormality v signální dráze či nízká exprese receptoru pro vitamin D (VDR; Vitamine D Receptor)¹⁰. Jeho efekt je nejspíše zapříčiněn přímým vlivem na integritu střevního epitelu, střevní imunitu (sekrece α a β defenzinů a cathelicidinů; snížení aktivace NF- κ B v epitelu při infekci) a následné druhové složení střevní mikrobioty¹¹.

Biologické modely a výzkum

Bylo vyvinuto několik myších modelů, užitečných jak pro studium vzniku ulcerózní kolitidy (většinou geneticky modifikované modely), tak pro hledání a charakterizaci nových potencionálních léčiv (většinou modely indukované chemicky). Experimentálním modelům ulcerózní kolitidy se podrobně věnuje přehledný článek¹².

Jedním z prvních myších modelů byla indukce kolitidy rektálním podáváním kyseliny dinitrobenzensulfonové (DNBS) nebo trinitrobenzensulfonové (TNBS) rozpuštěné v alkoholu. Tento model lze použít jak u myší, tak u potkanů. Tyto látky způsobují akutní poškození sliznice a lokální hypersenzitivitu imunitního systému. Nicméně toto poškození je vysoce lokalizované, akutní a krátkodobé. U myší se poškození střeva velmi rychle hojí, a bez podání látek způsobujících další poškoze-

ní, rychle mizí. Typické pro tento model je typ imunitní odpovědi T_H1 , zatímco u přirozené kolitidy se předpokládá spíše lehce dominantní T_H2 ¹². Tento jednoduchý model byl postupně nahrazen novějšími, s delším průběhem onemocnění, které se více blíží klinickému obrazu u lidí.

Často využívaným modelem chemicky indukované kolitidy u myši, případně potkanů, představují jedinci, kterým je v pití podáván dextranulfát sodný (DSS), látka toxická pro střevní epitel. Část epitelu je touto látkou poškozena, je narušena střevní bariéra a vzniká zánět¹³. Tento model je vhodný pro studium léčiv a faktorů, které se podílejí buď na léčbě nemoci, nebo její progresi.

Třetím chemicky indukovaným modelem je kolitida navozená rektálním podáváním oxazolonu (4-ethoxymetylen-2-fenyl-2-oxazolin-5-on)¹⁴. Projevy této kolitidy se liší od té vyvolané kyselinou trinitrobenzensulfonovou přítomností IL-13, produkovaného NK T-buňkami, což vede k poškození střevního epitelu. Tento model se svými projevy více blíží lidskému onemocnění než výše uvedené.

Defekty v signalizaci IL-10 u lidí vedou často k závažným onemocněním střev¹⁵. I u myši kmeny s defekty v produkci IL-10 či jeho receptoru mají tendenci k vývoji chronické kolitidy, i když se vyvíjí spíše vzácně. Proto pro vyšší pravděpodobnost vývoje nemoci jsou těmto myším kmenům podávány nesteroidní protizánětlivá léčiva k narušení syntézy protektivních metabolitů kyseliny arachidonové v mukóze¹⁶. Tento přístup je v souladu s poznatkem, že podávání některých druhů nesteroidních protizánětlivých léčiv kolitickým pacientům vede ke zhoršení příznaků ulcerózní kolitidy prostřednictvím inhibice obou izoform cyklooxygenasy COX-1 a COX-2¹⁷.

Dalším genetickým modelem je myš Rag (kmen s nefunkčními B – a T-lymfocyty) s transplantovanými T-buňkami z IL-10 defektní myši¹⁸. Po indukci nesteroidními protizánětlivými léčivy i tento model myši vyvine kolitidu. Obdobně funguje i model myši Rag s transplantovanými buňkami sleziny CD25 – nebo CD45^{low} z myši divokého kmene¹⁹. Kolitida se opět vyvine s vyšší pravděpodobností po podání nesteroidních protizánětlivých léčiv. Střevní mukóza v těchto modelech produkuje ve zvýšené míře IFN γ a IL-17, což je důležité, neboť se zdá, že se tyto faktory podílí i na rozvoji nemoci u lidí¹⁹. Tyto modely jsou vhodné pro studium příčin nemoci a vlivu imunitního systému.

Dalšími biologickými modely jsou kolitida u myši indukovaná patogenem *Citrobacter rodentium*²⁰, model myši s T-buňkami iresponzivními k TGF β ²¹, myši s negativně ovlivněnou funkcí adhezivní molekuly cadherinu E a s tím související narušení soudržnosti epitelu a pronikáním bakterií do stěny střeva²², myši s delecí *NOD1* a *NOD2*, receptorů bakteriálního peptidoglykanu (povrchový *NOD1*) a lipopolysacharidu (intracelulární *NOD2*), jež se podílejí na imunitní odpovědi²³, myši s defektem NLRP6, proteinu inflamazómu²⁴, modely myši s defekty v tvorbě mucinu²⁵, v genu *MDR1*²⁶, narušení NF- κ B dráhy v epitelu²⁷, defektu STAT3 v makrofázích a neutrofilech²⁸ či epitelu²⁹ a myši s nadprodukcí IL-7³⁰.

Imunologické projevy nemoci

Mnoho informací o ulcerózní kolitidě bylo získáno právě z myších modelů. Pro kolitidu je typická spíše imunitní odpověď typu T_H2 a zvýšená produkce IL-13 a IL-9 s infiltrací NK T-buněk (producenti IL-13) v lamina propria³¹.

Hlavní příčinou onemocnění je podle současného poznání diferenciací naivních T-buněk pod vlivem IL-23 v typ T_H17 , které následně produkují IL-17 (IL-17A a IL-17F) a další cytokiny jako IL-21, IL-22 a IL-23 – ty jsou příčinou dalšího rozvoje nemoci¹². Předpokládá se, že buňky T_H17 dají svou konverzí vzniknout subpopulaci buněk T_H1 , produkujícím IFN γ , který má též svůj podíl na rozvoji nemoci³². Tyto buňky typu T_H1 však vznikají vlivem IL-23 z T_H17 , na rozdíl od klasických T_H1 diferencovaných pod vlivem IL-12. Ve střevní tkáni přítomné buňky T_H17 původně vznikají vlivem IL-1 β , IL-6 a TGF β , zatímco IL-23 vstupuje do hry až později a účastní se další propagace této populace³³. Takto přes IL-23 stimulované T_H17 se zdají mít větší prozánětlivý účinek a nižší expresi IL-10³⁴. Všechny výše popsané děje vedou i k nárůstu GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)³⁵ a IL-5 ve tkáni¹². Další buněčná populace, NK T-buňky typu II, mohou být do místa zánětu přitahovány přítomností sulfatidovaných glykolipidů (sulfatide glycolipids) uvolněných z poškozeného epitelu³⁶. Přítomnost IL-3 v zánětu stimuluje lymfoidní buňky vrozené imunity, které dále tvoří IL-17, IL-22 a IFN γ a dále rozvíjí zánět³⁷.

Na zklidnění zánětu, jako antagonisté efektorových T-buněk ve střevě, jsou naopak důležité buňky Treg Foxp3⁺ s imunosupresivními účinky, produkující IL-10, TGF β a IL-35³⁸. Tyto buňky jsou v místě kolitidy dále stimulovány IL-33, který je produkován poškozeným epitelem³⁹. Opačný efekt na Treg v místě zánětu má již zmiňovaný IL-23⁴⁰. Treg jsou proto v místě zánětu inverzně regulovány hladinami IL-23 a IL-33. Další součástí zánětu, makrofágy, mají též pozitivní vliv na obnovu střevního epitelu po jejich stimulaci IL-10⁴¹.

Obecně je proto u ulcerózní kolitidy zájem na ovlivnění vazby IL-23 k jeho receptoru IL23R farmaky blokujícími podjednotky IL-12p40 a IL-23p19. U Crohnovy choroby se pozitivní účinek anti-IL-12p40 (ustekinumab) již prokázal⁴².

Klasická léčba chemoterapeutiky

Pro chemoterapeutika cílí na ulcerózní kolitidu je typické jejich využití i pro léčbu Crohnovy choroby a revmatoidní artritidy. První skupinou léčiv jsou aminosalicyláty. Nejběžnější léčbou tohoto chronického onemocnění je podávání kyseliny 5-aminosalicylové (mesalazin) či jejího derivátu, sulfasalazinu. Sulfasalazin patří mezi sulfonamidy a byl původně vyvinut jako léčivo pro revmatoidní artritidu. Část léčiva se vstřebává v tenkém střevě, ale většina ho doputuje do tlustého střeva, kde je střevní mikroflórou metabolizován na kyselinu 5-aminosalicylovou a antibakteriální sulfapyridin, který je zodpovědný i za většinu jeho nežádoucích účinků. Mesalazin a sulfasalazin jsou v účinku srovnatelné, přesto je mesalazin preferován díky absenci mnoha nežádoucích účinků přítomných u sulfasalazinu. Nevý-

hodou samotné kyseliny 5-aminosalicylové je její vstřebávání v tenkém střevě, proto jsou k dosažení tlustého střeva nutné její vhodné formulace. Ty jsou dobře popsány v přehledném článku⁴³. Léčba mesalazinem prokázala pozitivní účinek u 80 % pacientů, prodlužuje se doba remise⁴⁴. Obvyklá dávka je 2 – 4 g denně. U pacientů s častějšími relapsy a silnějšími projevy nemoci se zvyšuje účinnost s rostoucí dávkou⁴⁵. Dalším proléčivem mesalazinu je balsalazid, který podobně jako sulfasalazin, uvolňuje mesalazin až v tlustém střevě. Mechanismus účinku aminosalicylátů není dosud znám, ale jsou to obecně léčiva protizánětlivá. Tyto léky se kromě perorálního podání mohou též podávat jako čípky, či ve formě klyzmatu (klystýru).

Při relapsu onemocnění jsou používány kortikosteroidy jako metylprednizon, prednizon, hydrokortizon a kortizon, které se ale nepoužívají k prodloužení remise. Mechanismus jejich účinku není také přesně znám, ale předpokládá se vliv na inhibici dráhy NF- κ B v imunitních buňkách⁴³. Mohou se podávat orálně, intravenózně i topicky. Používají se často v nemocnicích pro zvládnutí akutních zánětů jako první léčba s úspěšností mezi 60 – 70 %. Při jejich selhání se dále nasazuje léčba infliximabem (protilátka proti TNF- α) nebo cyklosporinem⁴⁶, které se zdají být v účinku ekvivalentní⁴⁷.

Cyklosporin (Cyklosporin A) je imunosupresivum používající se ke zklidnění akutní fáze nemoci po neúčinné léčbě kortikosteroidy. Jeho účinnost je až v 80 % případů⁴⁸. Hrozí u něho ale nefrotoxicita a další vedlejší účinky. Často je pro následnou léčbu nahrazen tacrolimem či thiopuriny. Jedná se o cyklický peptid složený z 11 aminokyselin, působící jako inhibitor signální molekuly kalcineurinu. Následkem je snížení transkripce cytokinů jako IL-2 a TNF α ⁴⁹. Kromě cyklosporinu lze použít i se stejným účinkem i imunosupresivum tacrolimus (FK-506) se zhruba 50 % účinností⁵⁰. Stejně jako u cyklosporinu se jedná o inhibitor kalcineurinu.

Imunosupresivní thiopuriny 6-merkaptopurin a azathioprin (antimetabolit, purinový analog, v tkáni neenzymaticky konvertován na 6-merkaptopurin) jsou často nasazovány jako nástupci cyklosporinu a kortikosteroidů. 6-merkaptopurin je přes enzymy thiopurin-S-methyltransferasu a hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferasu konvertován přes 6-methylmerkaptopurin na aktivní 6-thioguanin. Xantinoxidasa může přeměnit 6-methylmerkaptopurin na neaktivní thiourát. Tato léčiva narušují syntézu DNA a RNA a tím proliferaci T – a B-lymfocytů. Přímý mechanismus jejich účinku na ulcerózní kolitidu také není znám. Obě léčiva se používají k udržení remise s účinností zhruba 60 – 70 %. Nepoužívají se ale u akutních projevů, protože mají pomalý nástup účinku trvající 3 – 6 měsíců⁴³. Navíc se při nasazení thiopurinů musí vzít v úvahu možnost dědičného defektu v thiopurin-S-methyltransferase, buď způsobené mutací genu nebo nižší expresí enzymu⁵¹. U takto postižených osob snížená aktivita tohoto enzymu vede ke zvýšené toxicitě thiopurinů pro kostní dřeň, a z toho plynoucí poruše krvetvorby, projevující se například anémií, zvýšenou krvácivostí, či vyšší náchylností k infekcím. U těchto pacientů jsou buďto thiopuriny z léčby zcela vynechány, nebo je výrazně snížena jejich dávka. Nižší aktivita enzymu se týká zhruba 10 % populace,

a u 1 z 300 jedinců je thiopurin-S-methyltransferasa zcela inaktivní.

Tofacitinib je nové léčivo procházející klinickými studiemi, v současné době je ve třetí fázi. Jedná se o inhibitor kinas JAK1 a JAK3. Podává se perorálně a jeho účinek se zvyšuje s dávkou⁵². Lék už je schválen pro léčbu revmatoidní artritidy.

Nedávno se prokázal i efekt antihistaminika fexofenadinu s nízkou gastrointestinální absorpcí⁵³. Zdá se vhodný spíše v kombinované terapii s ostatními léčivy.

Biologická léčba

Použití antagonistů TNF α (tumor necrosis factor α) přineslo řešení středních a vážnějších forem ulcerózní kolitidy. Mezi tyto antagonisty patří infliximab, adalimumab, golimumab a certolizumab pegol. Jsou vhodné pro indukci a udržení remise onemocnění. Infliximab je monoklonální protilátka většinou nasazovaná po selhání kortikosteroidů⁵⁴. Podáváním se zvyšuje riziko propuknutí tuberkulózy při latentní infekci či reaktivace hepatitidy B⁴³.

Další skupinou jsou anti-integriny vedolizumab (antagonista α 4 β 7) a etrolizumab (antagonista α 4 β 7 a α E β 7), natalizumab (antagonista α 4). Vedolizumab je humanizovaná monoklonální protilátka IgG1 vázající integrin α 4 β 7, a zabraňující vazbě leukocytů k tomuto proteinu přes povrchovou molekulu MADCAM-1 výhradně v gastrointestinálním traktu. Je podáván intravenózně. V klinických testech byla účinnost prokázána u 47 % pacientů⁵⁵. Zvýšila se četnost remise a obnova mukózy. Často je vedolizumab pro zvýšení účinku kombinován s kortikosteroidy⁵⁶. Etrolizumab je druhá humanizovaná protilátka cílící na β 7 podjednotku v integrinech α 4 β 7 a α E β 7, podává se subkutánně a současně prochází třetí fází klinických studií⁵⁷.

Dalším testovaným léčivem je ustekinumab, protilátka anti-IL-12p40 vhodná pro indukci remise onemocnění blokací tohoto prozánětlivého cytokinu⁵⁸.

Posledním přípravkem testovaným na ulcerózní kolitidu je alicaforsen, antisense oligonukleotid ke snížení exprese ICAM-1 – adhezivní molekuly a chemoatraktantu v zánětu, s asi 50 % účinností⁵⁹.

Často je biologická léčba kombinována s chemoterapeutiky pro zvýšení účinku^{56,60}. Mnoho dalších léčiv cílících na specifické signální dráhy imunitního systému je v současnosti zkoumáno a hodnoceno v klinických studiích.

Podpůrná léčba

Jedná se úpravu životního stylu či konzumaci potravinových doplňků u pacientů s chronickým onemocněním, kteří většinou mají starost ohledně vedlejších účinků konvenční léčby, či jiné důvody jako zdravý životní styl.

Jednou z látek používajících se k podpůrné léčbě ulcerózní kolitidy je kurkumin. Jedná se o přírodní látku nacházející se v oddencích různých druhů rostlin rodu kurkuma a z nich pocházejícího koření téhož názvu. Jeho účinnost se prokázala i odbornou studií v kombinaci s mesalazinem⁶¹. Mechanismus účinku není znám,

ale kurkumin je obecně považován za antiseptický a protizánětlivý. Podobné účinky má i konzumace od-
denku zázvoru či z něho připravených extraktů, což bylo
též doloženo studií na potkanech⁶². Obecně se zázvor
považuje za protizánětlivý.

Rybí olej je další z látek, u které bylo prokázáno zlep-
šení stavu⁶³. Příjem 4,2 g ω -3 mastných kyselin denně
vedl ke zlepšení stavu u 56 % pacientů a u některých
pacientů vedl až ke snížení medikace. Účinek se před-
pokládá na snížení syntézy prozánětlivého leukotrienu
B4 ve střevní mukóze, typicky zvýšeného u lidí trpících
ulcerózní kolitidou. Navíc rybí olej obsahuje i vitamin
D, který je u pacientů s ulcerózní kolitidou přítomen
v nižší hladině⁶⁴. Vitamin D se navíc podílí i na složení
střevní mikroflóry a imunitní odpovědi ve střevě¹¹.

Příjem vlákniny v potravě má rovněž pozitivní vliv⁶⁵.
Stejně tak se prokázal pozitivní vliv příjmu β -glukanu,
vedoucího ke snížení zánětlivých markerů a prozánětliv-
ých cytokinů u pacientů⁶⁶. Stejně pozitivní účinek má
i vláknina z jitrocele vejčitého (*Plantago ovata*), známé
také pod názvem Psyllium⁶⁷. Celkově byl vliv polysacha-
ridů na průběh zánětlivých onemocnění střev sumari-
zován jinde⁶⁸.

Další látkou ovlivňující průběh nemoci je nikotin.
Bylo vypořádováno, že ulcerózní kolitida se u kuřáků
vyskytuje v asi o 40 % nižší míře než u nekuřáků. Bylo
zjištěno, že podávání nikotinu v transdermálních ná-
plastech má pozitivní účinek u lehčích a středně váž-
ných forem nemoci asi u 40 % pacientů⁶⁹. Další studie
naopak ukázala, že nikotin není schopen prodloužit
remisi onemocnění⁷⁰. Nicméně do celkového efektu
mohou být zapojeny i jiné složky cigaretového kouře.
Navíc předchozí kouření zvyšuje riziko vzniku ulcerózní
kolitidy zhruba dvojnásobně a koreluje s množstvím vy-
kouřených cigaret⁷¹.

Vliv mikrobiomu

Při zánětlivých onemocněních střev – ulcerózní koli-
tidě a Crohnově chorobě, dochází k nesprávné či nad-
měrné stimulaci imunitního systému ve střevě přítom-
nou mikroflórou, která nemusí být sama o sobě pato-
genní. Následný zánět může být způsoben dědičnými
defekty či abnormalitami ve střevní sliznici, přirozenou
bariérou mezi vnitřkem trávicího traktu a zbytkem těla.
Rozdíly ve střevní mikroflóře mohou ovlivnit zvýšenou
stimulaci imunitního systému, správnou funkci epitelu
či jeho permeabilitu. Přestože se nezdá, že by ulcerózní
kolitida byla přímo vyvolána přítomností nějakého pa-
togenního organismu, bakteriální kmeny s vyšší adhe-
zivitou k epitelu, invazivitou a intracelulární perzistencí
vyvolávají silnější imunitní odpověď⁷². Naše genetická
variabilita, jakožto hostitele, poté u některých jedinců
může vést k nadměrné stimulaci imunitního systému
a chronickému poškození střevní sliznice. Vzhledem
k velikému počtu organismů a variabilitě složení mik-
robiomu u jednotlivých osob, je velice obtížné identifi-
kovat jednotlivé mikroorganismy či přímo jejich kmeny,
které jsou za rozvoj ulcerózní kolitidy zodpovědné. Ne-
zdá se, že by byl nějaký organismus způsobující koliti-
du. Spíše je to populace organismů, která při poškození
střevní sliznice začne pronikat do tkáně.

Na rozdíl od tenkého střeva s jednou vrstvou má tlus-
té střevo dvě vrstvy hlenu. Vnitřní sterilní denzní vrstvu
těsně přiléhající k epitelu, o tloušťce do 50 μ m, a vnější
rozvolněnější vrstvu variabilní tloušťky, obsahující proti-
látky typu IgA, která je prostředím pro komenzální bak-
terie⁷³. V důsledku přítomnosti hlenu je kontakt střevní
mikroflóry se střevním epitelem značně omezen, a to i
díky různým epitelem sekretovaným antimikrobiálním
peptidům, hlavně ze skupiny defenzinů.

Ve střevech zdravých lidí jsou čtyři hlavní taxonomické
kmeny mikroorganismů: *Bacteroidetes* (gramnegativní
bakterie tvořící většinu střevní mikroflóry), *Firmicutes*
(grampozitivní bakterie hlavních rodů *Bacillus* a *Clostri-
dium*), *Actinobacteria* a *Proteobacteria*⁷⁴.

Faecalibacterium prausnitzii je grampozitivní anaer-
obní bakterie a jeden z nejběžnějších střevních mik-
roorganismů s frekvencí výskytu obvykle 6 – 8 %. Je to
jeden z hlavních producentů kyseliny máselné a dalších
mastných kyselin s krátkým řetězcem ve střevě⁷⁵. Kyseli-
na máselná má protizánětlivé účinky na lokální imunit-
ní systém, stimuluje buněk Treg⁷⁶. U pacientů s ulcerózní
kolitidou je tato bakterie často zastoupena v menším
počtu⁷⁷ a její ubývající množství lze přímo korelovat se
zvyšující se intenzitou nemoci⁷⁸. Navíc se ukazují i sta-
tistické rozdíly dvou taxonomických podskupin tohoto
organismu u zdravých jedinců a lidí postižených ulce-
rózní kolitidou, ačkoli nejsou tyto podskupiny přímo
vázány k nemocným či zdravým jedincům⁷⁹. Zdá se,
že léčba mesalazinem a imunosupresivy nevede k zvý-
šení počtu *F. prausnitzii*⁸⁰, ale biologická léčba pomocí
anti-TNF α ano⁸¹.

Grampozitivní bakterie rodu *Clostridium* jsou další
skupinou vyskytující se ve střevě. Existují tři druhy spo-
jované s ulcerózní kolitidou a to *C. difficile*, *C. coccoides*
a *C. leptum*. *C. difficile* je častou příčinou průjemových
onemocnění po léčbě antibiotiky, negativně ovlivňující
ostatní komenzální mikrobiom⁸². Sekretované toxiny *C.
difficile* poškozuji střevní mukózu⁸³. Kvůli imunosupresi,
léčbě antibiotiky a změnám v mikroflóře jsou pacienti
se zánětlivými onemocněními střev zhruba 5x náchyl-
nější k infekcím způsobenými *C. difficile*⁸⁴. Zdá se, že in-
fekce *C. difficile* je spíše průvodce ulcerózní kolitidy než
její příčinou. Na rozdíl od *C. difficile* jsou další dva druhy
C. coccoides a *C. leptum* spojovány s průběhem nemo-
ci. Obě bakterie se podílejí na tvorbě kyseliny máselné
a jejich zastoupení u pacientů s ulcerózní kolitidou je
nižší jako v případě *F. prausnitzii*^{85,86}.

Bacteroides je další rod gramnegativních obligátně
anaerobních bakterií běžných ve střevech savců. *B.
fragilis* byla popsána jako jedna z bakterií, která může
mít pozitivní efekt na průběh ulcerózní kolitidy sekrecí
imunomodulačního polysacharidu A⁸⁷. Vliv této bakte-
rie nemusí být jen pozitivní, v některých případech byla
u této bakterie prokázána invazivita do střeva, způso-
bující jeho poškození⁸⁸. U dalších druhů *B. vulgatus*
a *B. ovatus* byla též prokázána spojitost s průběhem
ulcerózní kolitidy, u *B. vulgatus* negativní⁸⁹ a *C. ovatus*
pozitivní⁹⁰.

Escherichia coli je komenzální gramnegativní bakte-
rie nacházející se v dolní části trávicího traktu teplokrev-
ných živočichů. U pacientů trpících ulcerózní kolitidou

byl zjištěn její vyšší podíl⁹¹. Neví se ale, jestli se nejedná jen o průvodní jev nemoci. Byla ovšem prokázána větší biodiverzita kmenů *E. coli* u zdravých lidí než u pacientů trpících ulcerózní kolitidou⁹². Přestože jsou kmeny *E. coli* s vyšší adhezivitou a invazivitou častěji nacházeny u pacientů s Crohnovou chorobou, u ulcerózní kolitidy to prokázáno nebylo⁹³.

Dalším významným rodem anaerobních gramnegativních bakterií ve střevě je *Bifidobacterium*. Bakterie tohoto rodu jsou hojně využívány jako probiotika, a i v léčbě ulcerózní kolitidy mají svůj význam. U myšského modelu byl prokázán jejich pozitivní protizánětlivý účinek⁹⁴, stejně tak i na lidských imunitních buňkách⁹⁵, podrobnější studie na lidech ale chybí.

Některé druhy anaerobního gramnegativního rodu *Fusobacterium* jako *F. varium* a *F. nucleatum* byly též nalezeny u pacientů s ulcerózní kolitidou⁹⁶. Jednalo se většinou o kmeny se zvýšenou adhezivitou, invazivitou a prozánětlivými účinky. Většinou jsou to bakterie vyskytující se normálně v ústech a v trávicím traktu.

Dalšími druhy mikroorganismů lišící se v počtu u pacientů s ulcerózní kolitidou jsou *Roseburia hominis*⁷⁸, *Eubacterium rectale*⁸⁶, *Listeria monocytogenes*⁹⁷ a *Candida albicans*⁹⁸. *R. hominis* je bakterií ze skupiny *Firmicutes*, která produkuje kyselinu máselnou a u pacientů s ulcerózní kolitidou se vyskytuje v nižších počtech. Stejně tak je u pacientů zastoupena méně i *E. rectale*. Grampozitivní bakterie *L. monocytogenes* je intracelulární patogen, který může zhoršit průběh nemoci, ale je spíše průvodním jevem než příčinou. Stejně tak *C. albicans* představuje komplikaci v léčbě.

Je obecně přijímáno, že střevní mikroflóra má svoji roli v patogenezi a postupu ulcerózní kolitidy. Bylo popsáno, že jednotlivé mikrobiální druhy či jejich kombinace se podílí jako jedna z příčin na vzniku a průběhu ulcerózní kolitidy. Nicméně, naše poznání je stále omezené. Dosud se nepodařilo prokázat, že by nějaký z výše popsaných mikroorganismů byl přímou příčinou tohoto onemocnění. I naše vědomosti o vlivu jednotlivých mikroorganismů na imunitu či průběh nemoci je značně limitované. Je nesporné, že obnovení střevní mikroflóry do určité rovnováhy s hostitelem má svůj terapeutický účinek. Podávání probiotické *E. coli* anebo směsi probiotických organismů spolu s konvenční léčbou má také pozitivní účinek⁹⁹. Rovněž podávání antibiotik (ciprofloxacin) k omezení střevní mikroflóry může mít pozitivní účinek ve spojení s klasickou léčbou¹⁰⁰, což je nejspíš spjato s redukcí patogenních mikroorganismů komplikujících léčbu. Obecně dieta zvyšující pravděpodobnost rozvinutí choroby či relapsu zahrnuje velký příjem nenasycených tuků, vitamínu B6, masa, alkoholu¹⁰¹.

Jednou z dalších možností léčby, poukazující na bakteriální původ nemoci, je výměna bakteriální populace ve střevě za populaci z jiného jedince přes klyzma (klystýr), tzv. léčba transplantovanou stolicí. Pro tuto léčbu v současné době existuje jen jediná oficiální indikace, kterou jsou obtížně zvládnutelné infekce způsobené bakterií *C. difficile*. Výzkumy ale naznačují potenciální přínos i pro pacienty s ulcerózní kolitidou, přestože je

zřejmě nutné transplantaci provést opakovaně. U této metody byl popsán pozitivní výsledek u 92 % pacientů a kompletní remise až u 67 % pacientů¹⁰².

Helminti

Jedním z vysvětlení vyššího výskytu nemoci v rozvinutých zemích může být i vyšší sterilita industrializovaného prostředí a nepřítomnost parazitů, kteří regulovali náš imunitní systém po celou dobu evoluce. Chronická infekce helminty (často parazité patřící do kmenů ploštěnců, hlístice a vrtejši) vede k trvalé aktivaci imunitního systému a zvýšení hladiny stimulů k jeho aktivaci (desenzitizaci)¹⁰³. Takto snížená citlivost imunitního systému může snížit predispozice k rozvoji ulcerózní kolitidy. Helminti vyvolávají imunitní odpověď typu T_H2, přesto další alergické autoimunní odpovědi tohoto typu u infestovaného člověka mírní. Helminti jsou známí sekrecí mnoha látek ovlivňující imunitní systém, což je předmětem mnoha studií. Zdá se, že protektivní účinek helmintů je závislý na stimulaci produkce IL-10 a TGFβ a inhibici IL-17¹⁰⁴. Navíc přítomnost helmintů může ovlivnit i střevní mikrobiom, což bylo prokázáno u myši¹⁰⁵.

Jedním z parazitů, u kterých se zkoumá vliv na průběh ulcerózní kolitidy je tenkohlavec prasečí (*Trichuris suis*). Člověk je k infekci tenkohlavcem prasečím vnímavý, ale parazit v nás přežívá jen krátce, nedospívá, nemigruje tkáněmi a infekce se neprojevuje žádnými klinickými příznaky. U 43 % pacientů vedlo požití vajíček tohoto parazita k zlepšení stavu¹⁰⁶. Mnoho podobných studií bylo provedeno na myších, což je shrnuto v přehledném článku včetně imunitních mechanismů¹⁰⁴.

Závěr

Ulcerózní kolitida je jednou z civilizačních nemocí, která se projevuje zánětlivými změnami ve stěně tlustého střeva. Dle současného poznání je způsobena genetickými vlivy ovlivňujícími integritu střevního epitelu či odchylkami ve fungování imunitního systému ve střevě. Při nadměrné či nesprávné imunitní odpovědi na přirozenou střevní mikroflóru ve střevě vzniká zánět, který není imunitní systém schopen utlumit. Častější výskyt této nemoci v rozvinutých zemích je spojován s vyšší sterilitou prostředí a absencí parazitů, kteří nás provázeli evolucí, a tlumili nadměrné imunitní odpovědi. Vedle klasické léčby protizánětlivými látkami a nescifickými imunosupresivy, známé několik desetiletí, se nyní začínají objevovat biologická léčiva založená na protilátkách specificky tlumící jednotlivé oblasti imunitní odpovědi spojenou se zánětem ve střevní sliznici. Kromě klasické léčby se zdá účinná i podpůrná léčba ve formě úpravy jídelníčku a používání probiotik a prebiotik. Jednou z nadějných a ekonomicky nenáročných terapií může být „výměna“ střevní mikroflóry, ačkoli je k této oblasti léčby zatím málo klinických dat.

Poděkování

Tento článek vznikl za podpory projektu MŠMT NPU LO1302.

Literatura

1. Kappelman MD, Moore KR, et al.: *Dig Dis Sci* 58(2), 519 (2012).
2. Shivananda S, Lennard-Jones J, et al.: *Gut* 39(5), 690 (1996).
3. Andersson RE, Olaison G, et al.: *N Engl J Med* 344(11), 808 (2001).
4. Ford AC, Moayyedi P, et al.: *BMJ* 346(f432) (2013).
5. Dulai PS and Jairath V: *Ther Adv Chronic Dis* 9(2), 65 (2018).
6. Targownik LE, Singh H, et al.: *Am J Gastroenterol* 107(8), 1228 (2012).
7. Frolkis AD, Dykeman J, et al.: *Gastroenterology* 145(5), 996 (2013).
8. Anderson CA, Boucher G, et al.: *Nat Genet* 43(3), 246 (2011).
9. Van Limbergen J, Philpott D, et al.: *Gastroenterology* 141(5), 1566 (2011).
Cho JH and Brant SR: *Gastroenterology* 140(6), 1704 (2011).
10. Pappa HM, Grand RJ, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 12(12), 1162 (2006).
11. Gombart AF, Borregaard N, et al.: *FASEB J* 19(9), 1067 (2005).
Kong J, Zhang Z, et al.: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(1), G208 (2008).
Wu S, Liao AP, et al.: *Am J Pathol* 177(2), 686 (2010).
Ooi JH, Li Y, et al.: *J Nutr* 143(10), 1679 (2013).
12. Kiesler P, Fuss IJ, et al.: *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1(2), 154 (2015).
13. Okayasu I, Hatakeyama S, et al.: *Gastroenterology* 98(3), 694 (1990).
14. Heller F, Fuss IJ, et al.: *Immunity* 17(5), 629 (2002).
15. Glocker EO, Kotlarz D, et al.: *Ann N Y Acad Sci* 1246(102) (2011).
16. Berg DJ, Zhang J, et al.: *Gastroenterology* 123(5), 1527 (2002).
17. Takeuchi K, Smale S, et al.: *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(2), 196 (2006).
18. Davidson NJ, Leach MW, et al.: *J Exp Med* 184(1), 241 (1996).
19. Maloy KJ and Powrie F: *Nature* 474(7351), 298 (2011).
20. Koroleva EP, Halperin S, et al.: *J Immunol Methods* 421(61) (2015).
21. Ince MN, Elliott DE, et al.: *Eur J Immunol* 39(7), 1870 (2009).
22. Hermiston ML and Gordon JI: *Science* 270(5239), 1203 (1995).
23. Natividad JM, Petit V, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 18(8), 1434 (2012).
24. Elinav E, Strowig T, et al.: *Cell* 145(5), 745 (2011).
25. Van Der Sluis M, De Koning BA, et al.: *Gastroenterology* 131(1), 117 (2006).
26. Panwala CM, Jones JC, et al.: *J Immunol* 161(10), 5733 (1998).
27. Nenci A, Becker C, et al.: *Nature* 446(7135), 557 (2007).
28. Takeda K, Clausen BE, et al.: *Immunity* 10(1), 39 (1999).
29. Pickert G, Neufert C, et al.: *J Exp Med* 206(7), 1465 (2009).
30. Watanabe M, Ueno Y, et al.: *J Exp Med* 187(3), 389 (1998).
31. Fuss IJ, Heller F, et al.: *J Clin Invest* 113(10), 1490 (2004).
32. Sujino T, Kanai T, et al.: *Gastroenterology* 141(3), 1014 (2011).
33. Veldhoen M, Hocking RJ, et al.: *Immunity* 24(2), 179 (2006).
34. Lee Y, Awasthi A, et al.: *Nat Immunol* 13(10), 991 (2012).
35. Griseri T, McKenzie BS, et al.: *Immunity* 37(6), 1116 (2012).
36. Fuss IJ, Joshi B, et al.: *Gut* 63(11), 1728 (2014).
37. Buonocore S, Ahern PP, et al.: *Nature* 464 (7293), 1371 (2010).
38. Shevach EM: *Immunity* 30(5), 636 (2009).
39. Schiering C, Krausgruber T, et al.: *Nature* 513 (7519), 564 (2014).
40. Izcue A, Hue S, et al.: *Immunity* 28(4), 559 (2008).
41. Pull SL, Doherty JM, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1), 99 (2005).
42. Sandborn WJ, Feagan BG, et al.: *Gastroenterology* 135(4), 1130 (2008).
43. Garud S and Peppercorn MA: *Therap Adv Gastroenterol* 2(2), 99 (2009).
44. Gordon GL, Zakko S, et al.: *J Clin Gastroenterol* 50(4), 318 (2015).
45. Wang Y, Parker CE, et al.: *Cochrane Database Syst Rev* 5, CD000544 (2016).
46. Narula N, Marshall JK, et al.: *Am J Gastroenterol* 111(4), 477 (2016).
47. Ribaldone DG, Dileo I, et al.: *Ir J Med Sci* (2017).
48. Van Assche G, D'haens G, et al.: *Gastroenterology* 125(4), 1025 (2003).
49. Wiederrecht G, Lam E, et al.: *Ann N Y Acad Sci* 696, 9 (1993).
50. Ogata H, Kato J, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 18(5), 803 (2012).
51. Ford LT and Berg JD: *J Clin Pathol* 63(4), 288 (2010).
52. Sandborn WJ, Ghosh S, et al.: *N Engl J Med* 367(7), 616 (2012).
53. Dhaneshwar S and Gautam H: *J Physiol Pharmacol* 63(4), 327 (2012).
Raithel M, Winterkamp S, et al.: *Int J Colorectal Dis* 22(7), 833 (2007).
54. Jarnerot G, Hertvig E, et al.: *Gastroenterology* 128(7), 1805 (2005).
55. Feagan BG, Rutgeerts P, et al.: *N Engl J Med* 369(8), 699 (2013).
56. Vanga R and Long MD: *Curr Gastroenterol Rep* 20(3), 12 (2018).
57. Vermeire S, O'byrne S, et al.: *Lancet* 384(9940), 309 (2014).
58. Ochsenkühn T, Janelidze S, et al.: *Journal of Crohn's and Colitis* 12(Supplement 1), S495 (2018).
59. Van Deventer SJ, Wedel MK, et al.: *Aliment Pharmacol Ther* 23(10), 1415 (2006).

Literatura (pokračování)

60. Panaccione R, Ghosh S, et al.: *Gastroenterology* 146(2), 392 (2014).
61. Lang A, Salomon N, et al.: *Clin Gastroenterol Hepatol* 13(8), 1444 (2015).
62. El-Abhar HS, Hammad LN, et al.: *J Ethnopharmacol* 118(3), 367 (2008).
63. Aslan A and Triadafilopoulos G: *Am J Gastroenterol* 87(4), 432 (1992).
64. Del Pinto R, Pietropaoli D, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 21(11), 2708 (2015).
65. Akhtar MS and Munir M: *J Ethnopharmacol* 27 (1-2), 163 (1989).
66. Forland DT, Johnson E, et al.: *Scand J Immunol* 73(1), 66 (2010).
67. Fernandez-Banares F, Hinojosa J, et al.: *Am J Gastroenterol* 94(2), 427 (1999).
68. Nie Y, Lin Q, et al.: *Int J Mol Sci* 18(7), (2017).
69. Sandborn WJ, Tremaine WJ, et al.: *Ann Intern Med* 126(5), 364 (1997).
70. Pullan RD, Rhodes J, et al.: *N Engl J Med* 330(12), 811 (1994).
71. Thomas GA, Rhodes J, et al.: *N Engl J Med* 332(15), 988 (1995).
72. Boyko EJ, Koepsell TD, et al.: *N Engl J Med* 316(12), 707 (1987).
73. Sartor RB: *Gastroenterology* 134(2), 577 (2008).
74. Johansson ME, Larsson JM, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4659 (2010).
75. Frank DN, St Amand AL, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(34), 13780 (2007).
76. Arumugam M, Raes J, et al.: *Nature* 473(7346), 174 (2011).
77. Barcenilla A, Pryde SE, et al.: *Appl Environ Microbiol* 66(4), 1654 (2000).
78. Qiu X, Zhang M, et al.: *J Crohns Colitis* 7(11), e558 (2013).
79. Sokol H, Seksik P, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 15(8), 1183 (2009).
80. Machiels K, Joossens M, et al.: *Gut* 63(8), 1275 (2013).
81. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, et al.: *Appl Environ Microbiol* 81(21), 7582 (2015).
82. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 22(1), 28 (2016).
83. Magnusson MK, Strid H, et al.: *J Crohns Colitis* 10(8), 943 (2016).
84. Bien J, Palagani V, et al.: *Therap Adv Gastroenterol* 6(1), 53 (2013).
85. Young VB and Hanna PC: *J Infect Dis* 209(1), 9 (2014).
86. Singh H, Nugent Z, et al.: *Gastroenterology* 153(2), 430 (2017).
87. Kabeerdoss J, Sankaran V, et al.: *BMC Gastroenterol* 13, 20 (2013).
88. Vermeiren J, Van Den Abbeele P, et al.: *FEMS Microbiol Ecol* 79(3), 685 (2012).
89. Mazmanian SK, Liu CH, et al.: *Cell* 122(1), 107 (2005).
90. Kuwahara T, Yamashita A, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(41), 14919 (2004).
91. Bamba T, Matsuda H, et al.: *J Gastroenterol* 30 Suppl 8, 45 (1995).
92. Hudcovic T, Kozakova H, et al.: *Physiol Res* 58(1), 101 (2009).
93. Lupp C, Robertson ML, et al.: *Cell Host Microbe* 2(3), 204 (2007).
94. Pilarczyk-Zurek M, Chmielarczyk A, et al.: *BMC Gastroenterol* 13(61) (2013).
95. Sokol H, Lepage P, et al.: *J Clin Microbiol* 44(9), 3172 (2006).
96. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, et al.: *Gastroenterology* 127(2), 412 (2004).
97. Jeon SG, Kayama H, et al.: *PLoS Pathog* 8(5), e1002714 (2012).
98. Imaoka A, Shima T, et al.: *World J Gastroenterol* 14(16), 2511 (2008).
99. Ohkusa T, Yoshida T, et al.: *J Med Microbiol* 58 (Pt 5), 535 (2009).
100. Ohkusa T, Sato N, et al.: *J Gastroenterol Hepatol* 17(8), 849 (2002).
101. Strauss J, Kaplan GG, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 17(9), 1971 (2011).
102. Lidar M, Langevitz P, et al.: *Isr Med Assoc J* 11(9), 558 (2009).
103. Zwolinska-Wcislo M, Brzozowski T, et al.: *J Physiol Pharmacol* 60(1), 107 (2009).
104. Tursi A: *J Clin Gastroenterol* 42 Suppl 3 Pt 1, S119 (2008).
105. Zocco MA, Dal Verme LZ, et al.: *Aliment Pharmacol Ther* 23(11), 1567 (2006).
106. Turunen UM, Farkkila MA, et al.: *Gastroenterology* 115(5), 1072 (1998).
107. Geerling BJ, Dagnelie PC, et al.: *Am J Gastroenterol* 95(4), 1008 (2000).
108. Jowett SL, Seal CJ, et al.: *Gut* 53(10), 1479 (2004).
109. Borody TJ, Brandt LJ, et al.: *Curr Opin Gastroenterol* 30(1), 97 (2013).
110. Borkow G, Leng Q, et al.: *J Clin Invest* 106(8), 1053 (2000).
111. Weinstock JV and Elliott DE: *Int J Parasitol* 43(3-4), 245 (2013).
112. Walk ST, Blum AM, et al.: *Inflamm Bowel Dis* 16(11), 1841 (2010).
113. Summers RW, Elliott DE, et al.: *Gastroenterology* 128(4), 825 (2005).

Souhrn

Zavřel M.: Ulcerózní kolitida – současné poznání

Ulcerózní kolitida je chronické onemocnění střevní sliznice tlustého střeva. Nemoc se projevuje zánětlivými změnami ve sliznici, často provázenými vředy. Jedná se o výsledek deregulovaného imunitního systému ve střevní sliznici u lidí s genetickou predispozicí k tomuto onemocnění. Imunitní systém v tomto případě nesprávně a přecitlivěle reaguje na přirozené antigeny přítomné v tlustém střevě. Tento referátový článek shrnuje současné poznání týkající se příčin onemocnění, jeho průběhu a případné léčby.

Klíčová slova: Ulcerózní kolitida, střevní sliznice, zánět, mesalazin, sulfasalazin

Summary

Zavřel M.: Ulcerative colitis – current understanding

The disease known as ulcerative colitis represents chronic inflammation of the mucosa in colon and rectum. The inflammation in mucosa often results in ulcers. According to the current understanding it is the result of dysregulated immune system in people with genetic predispositions to this illness. As it is generally understood, the immune system in this case improperly overreacts to the stimuli naturally occurring in large intestine. This review article summarizes the current understanding about its cause, manifestation and treatment.

Key Words: Ulcerative colitis, gut mucosa, inflammation, mesalazine, sulfasalazine

OPRAVA POŠKOZENÉ DNA POMOCÍ NEIL3 GLYKOSYLASY

Barbora Landová, Evžen Bouřa

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; barbora.landova@uochb.cas.cz

Úvod

Poškození DNA vzniká působením chemických vlivů, chybami při replikaci nebo běžným působením celulárního metabolismu. Je důležité je odstranit a zachovat originální genetickou informaci, protože nedokonalosti při opravě vedou ke genomové nestabilitě, rakovině nebo smrti buňky¹.

Eukaryotická DNA polymerasa, jejíž chybovost je 1 chyba na 10^7 syntetizovaných bází, je schopna opravit chyby vzniklé při replikaci z 99 %².

DNA je ve vodném prostředí relativně nestabilní molekula, ve které neustále dochází ke vzniku různých chyb a poškození a to jak spontánně, tak vlivem působení různých faktorů. Za výzkum spontánních jevů se zasloužil laureát Nobelovy ceny z roku 2015 prof. T. R. Lindahl. Z jeho práce vyplývá, že spontánní odstranění purinových bází nezávisí na sekvenci DNA³.

V molekule DNA dochází ke spontánní deaminaci cytosylu, vzniklý uracil je mutagenní, jelikož není zachována originální genetická informace. Reakcemi DNA s hydroxylovými radikály vznikají vedlejší produkty normálního oxidačního metabolismu, které mohou mít za následek intramolekulární kovalentní prokřížení DNA ICL (z angl. Interstrand cross-link). Působením malých metabolitů a koenzymů mohou však vznikat rozmanitá poškození DNA⁴.

Mechanismus opravy DNA je důležitý pro odstranění poškozených bází, způsobených např. buněčným metabolismem¹. DNA v případě poškozené báze je opravována dráhou BER (z angl. Base excision repair), která probíhá ve třech krocích. V prvním kroku je rozpoznáno poškození a rozštěpena glykosidová vazba pomocí specifického enzymu v závislosti na typu poškození za vzniku mezery nazývané se abazické místo Ap (z angl. Apurinic/aprimidinic site). Ve druhém kroku je Ap místo opraveno pomocí DNA polymerasy. Ve třetím kroku je řetězec spojen DNA ligasou⁵.

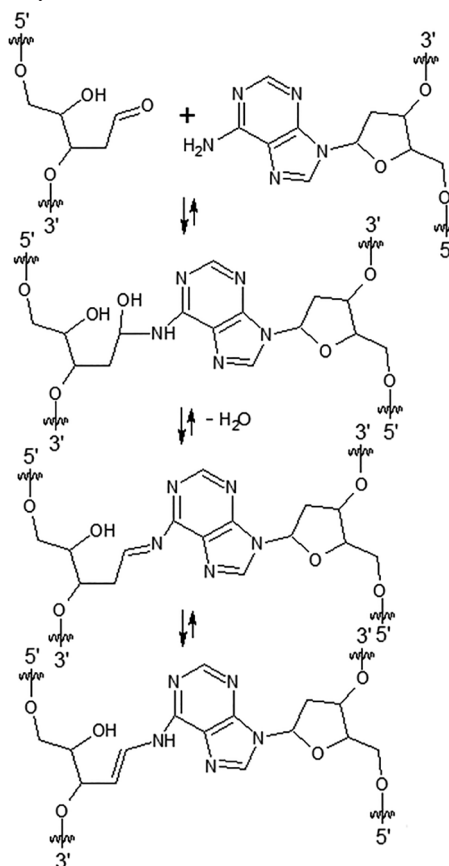
Intermolekulární kovalentní prokřížení DNA

ICL je vysoce cytotoxické poškození DNA. Vzniká působením různých exogenních činidel zahrnující dusíkatý hořčičný plyn yperit, cis-platinu, mitomycin C a psolaren⁶. Tento typ poškození vzniká také vlivem endogenních činidel, mezi která patří např. formaldehyd, acetaldehyd a malondialdehyd⁷.

Působením exogenních činidel se výrazně zvyšuje četnost vzniku ICL, což vede ke zvyšujícímu se počtu

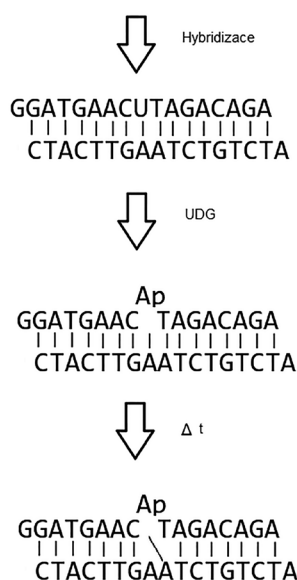
buněk podstupujících apoptózu⁸. Po 4 hodinách inkubace ovariálních buněk s cis-platinou (Cis-Pt) bylo dosaženo IC_{50} , kdy koncentrace potřebná k usmrcení 50% těchto buněk je 2,5 pg Cis-Pt/ 1 μ g buněčné DNA⁹. Tohoto faktu je využíváno při chemoterapii, kdy uvedené činidlo působí na buňky a způsobuje jejich odumírání¹⁰.

Apurinace/aprimidinace jsou pravděpodobně nejčastější endogenní poškození buněčné DNA. Vznikají spontánním odstraněním purinových a pyrimidinových bází, a rovněž jako důsledek opravné dráhy BER¹¹. Odhaduje se, že každá savčí buňka v ustáleném stavu obsahuje okolo 100 000 Ap míst¹². Nedávno bylo objeveno, že jedna z forem ICL je tvořena mezi Ap místem a bází na protilehlém řetězci, viz obr. 1. Kovalentní spojení protilehlých řetězců DNA mezi Ap místem a adeninem vzniká spontánně¹³. *In vitro* je využíváno vzniku Ap místa působením BER, konkrétně Uracil-DNA glykosylasy (obráz. 2).



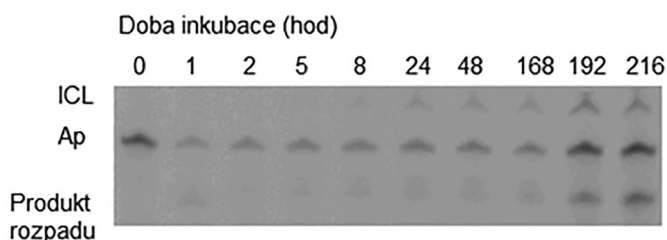
Obr. 1: Tvorba ICL mezi Ap a adeninem (dA). Strukturální schéma navázání dA na Ap místo přes 2 intermediáty za vzniku konečného produktu – Ap-ICL. Zobrazeno je pouze Ap místo a nukleotid, které jsou součástí řetězců DNA.

GGATGAACUTAGACAGA + CTACTTGAATCTGTCTA



Obr. 2: Schéma tvorby Ap-ICL *in vitro*. V prvním kroku komplementární úseky DNA hybridizují. Následně je vyštěpena báze – uracil pomocí uracil-DNA glykosylasy (UDG) za vzniku Ap místa. Kovalentní spojení mezi opačným řetězcem vzniká spontánně v průběhu inkubace při 37 °C.

Optimalizace výtěžku reakce tvorby ICL byla provedena *in vitro* podle schématu na obr. 2, kdy hybridizované úseky DNA byly inkubovány s UDG a po časových intervalech byly odebírány vzorky reakce. Pro ukončení reakce byl využit formamid a jednotlivé vzorky byly vizualizovány na denaturujícím gelu (obr. 3). Maximální výtěžek byl zjištěn po sedmi dnech probíhající reakce (obr. 4).

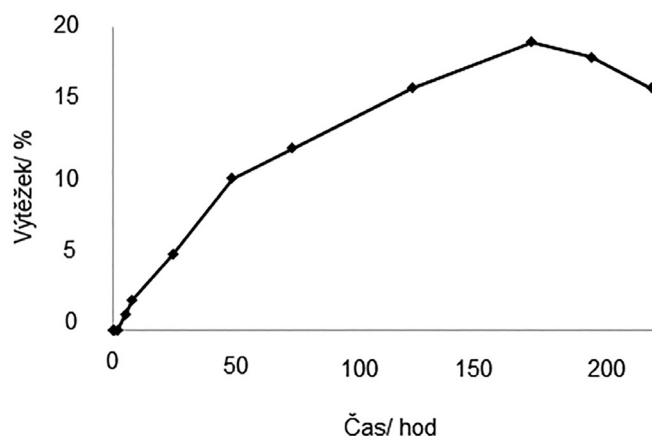


Obr. 3: Odebírané vzorky probíhající reakce vzniku ICL v časových intervalech vizualizované na 20 % denaturujícím akrylamidovém gelu. Po odebrání vzorku byla reakce zastavena formamidem a zamražena. Pozorujeme nestabilitu vznikajícího ICL. Maximálního výtěžku je dosaženo po 7 dnech. Při delší inkubaci se výtěžek ICL snižuje, naopak množství produktu rozpadu se zvyšuje.

Oprava intermolekulárního prokřížení DNA

Oprava ICL probíhá v S-fázi buněčného cyklu a u některých typů jako je např. Ap-ICL je mechanismus neznámý¹⁴. Za rozštěpení N-glykosidové vazby je zodpovědná DNA glykosylasa NEIL3. Mechanismus opravy pomocí NEIL3 je neznámý. Předpokládá se, že existují dvě nezávislé možnosti této opravy. První

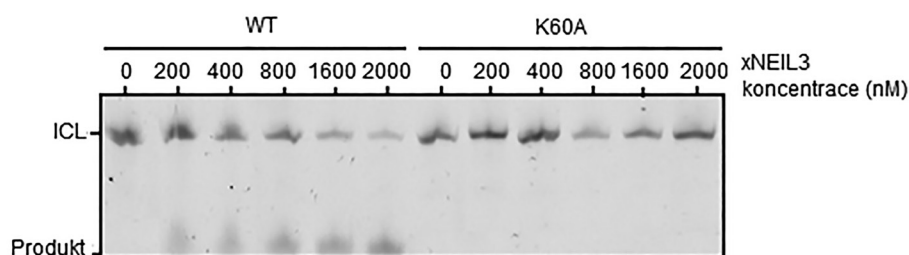
je rozštěpení nativní N-glykosidové vazby adenosinu za vzniku abazického místa. Uvolněný adenosyl zůstává vázán nepřirozenou N-glykosidovou vazbou na původní abazické místo. Druhá možnost opravy je rozštěpení N-glykosidové vazby ICL za vzniku nepoškozeného původního adenosinu i původního abazického místa. Abazické místo je opravováno pomocí specifických enzymů, které jej vyštěpí, avšak vyštěpený zbytek zůstává spojen kovalentní vazbou na komplementární řetězcí. Poté dochází k syntéze nového opraveného vlákna homologní rekombinací. Zbytek abazického místa na komplementární řetězcí je odstraněn pomocí BER¹⁵.



Obr. 4: Závislost výtěžku ICL na čase byla zjištěna přerušovanou metodou studia stacionární kinetiky. Analýza gelu obr. 3 v programu GelAnalyzer.

NEIL3 glykosylasa

Relativní molekulová hmotnost NEIL3 (Endonukleasa VIII-like III) je 68 kDa. Gen pro lidský NEIL3 se nachází v lokusu 4q34.3 a sestává se z 10 exonů obsahujících 1818 párů bází v kódující sekvenci, skládá se z 605 aminokyselin. NEIL3 se vyskytuje především v jádru buněk¹⁵. Obsahuje celkově čtyři zinkové prsty, což jsou domény vázající DNA, které se často vyskytují u DNA vazebných proteinů. Jeden zinkový prst, specifický pro Fpg/Nei rodinu, obsahuje zinečnatý ion ukotven čtyřmi cysteinovými zbytky. C-terminální doména se skládá z RanBP zinkového prstu a dvou GRF zinkových prstů. Oproti dalším členům Fpg/Nei rodiny je prodloužená. Význam tohoto prodloužení není znám. Na N-terminálním konci v pozici 2 se nachází valinový zbytek na místo prolinového, který je typický pro ostatní členy



Obr. 5: *In vitro* reakce nativní a mutantní varianty xNEIL3 s ICL. Separace reakce na 20% denaturujícím gelu po zastavení reakce pomocí formamidu. Absence produktu v případě mutantní varianty potvrzuje její neaktivitu.

Fpg/Nei rodiny. Tento aminokyselinový zbytek je využívan k tvorbě Schiffovy báze.

Interakce xNEIL3 glykosylasy s ICL

xNEIL3 je jedna z 11 anotovaných glykosylas v genomu Drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Lysinový zbytek v pozici 60 představuje jeden z aminokyselinových zbytků aktivního centra. Nativní i mutantní varianta K60A xNEIL3 glykosylasy je schopna vázat poškozenou DNA – ICL. Nativní xNEIL3 štěpí ICL za vzniku neznámého produktu (Obr. 5).

Závěr

Ap-ICL je časté poškození DNA vznikající spontánně *in vivo*, které brání replikaci a je vysoce cytotoxické.

Literatura

1. Zietlow LR: *The Role of A-family DNA Polymerases in DNA Interstrand Cross-link Repair*. Proquest, Umi Dissertation Publishing 2011.
2. McCulloch SD, Kunkel TA: *Cell Res.* 18, 148 (2008).
3. Lindahl T, Nyberg, B: *Biochemistry* 11, 3610 (1972).
4. Lindahl T, Karran, P, Wood RD: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 158 (1997).
5. Iyama T, Wilson DM: *DNA Repair* 12, 620 (2013).
6. Raschle M, Knipsheer P, et al.: *Cell* 134, 969 (2008).
7. Deans AJ, West SC: *Mol. Cell* 36, 943 (2009).
8. Duxin JP, Walter JC: *Curr. Opin. Cell Biol.* 37, 49 (2015).

Souhrn

Landová B., Bouřa E.: Oprava poškozené DNA pomocí NEIL3 glykosylasy

DNA glykosylasy jsou důležité enzymy sloužící k rozpoznání a odstranění poškození DNA, vzniklého samovolně nebo působením environmentálních činidel. Do Fpg/Nei rodiny patří proteiny schopny rozpoznávat a přispět k opravě oxidované báze, abazického místa nebo kovalentního příčného spojení řetězců DNA pomocí zatím neobjasněné opravné dráhy. Bez opravy tohoto poškození nemůže docházet k replikaci a může vést k mutacím a rakovině. Tato práce se snaží přispět k objasnění molekulárních mechanismů interakce NEIL3 (Endonukleasa VIII – like 3) z rodiny proteinů Fpg/Nei se substrátem – kovalentní spojení opačných řetězců DNA.

Klíčová slova: poškozená DNA, oprava DNA, Nei glykosylasa

Summary

Landová B., Bouřa E.: DNA damage repair by NEIL3 glycosylase

DNA glycosylases are important enzymes responsible for the recognition and removal of base DNA damage. These DNA lesions are formed spontaneously or as an effect of environmental agents. NEIL3 (Endonukleasa VIII – like 3) enzyme belongs to a Fpg/Nei family of glycosylases implicated in the DNA repair of oxidative bases, abasic sites. Recently, it has been shown that these enzymes are capable of removal of one type of interstrand crosslink by so unknown repair pathway. Unrepaired DNA crosslinks block DNA replication and may lead to cell death or severe chromosomal damage and later even cancer. This thesis is focused on revealing molecular mechanisms of the interstrand DNA-DNA cross-link repair by NEIL3 glycosylase.

Keywords: spontaneous DNA damage, DNA repair, excision repair

In vitro pozorujeme nárůst vznikajícího poškození s časem a jeho následné klesání v závislosti na množství vznikajícího produktu degradace. Produkt degradace poukazuje na nestabilitu a samovolný rozpad Ap-ICL, degradační produkt je neznámý. Další charakterizace Ap-ICL by napomohla zjištění potenciální sekvenční specifity vzniku tohoto poškození. NEIL3 glykosylasa je enzym schopný opravy Ap-ICL. Valinový zbytek v pozici 2 a lysinový zbytek v pozici 60 se nachází v aktivním centru proteinu xNEIL3 glykosylasy a pro opravu jsou nezbytné.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

9. Fishel ML, Delaney SM, et al.: *Mol. Cancer Ther.* 2, 633 (2003).
10. Johnson SW, Swiggard PA, et al.: *Cancer Res.* 54, 5911 (1994).
11. Price NE, Johnson KM: *J. Am. Chem. Soc.* 136, 3483 (2014).
12. Sun GH, Zhao LJ, Zhong RG: *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 16, 221 (2016).
13. Nakamura J, Swenberg JA: *Cancer Res.* 59, 2522 (1999).
14. Gilboa R, Zharkov DO: *J. Biol. Chem.* 277, 19811 (2002).
15. Semlow DR, Zhang J, et al.: *Cell* 167, 498 (2016).

BIOSENZORY PRO MONITOROVÁNÍ BUNĚČNÉHO CYKLU V ŽIVÝCH BUŇKÁCH

Lucie Knoblochová, Petr Šolc

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Laboratoř integrity DNA, Centrum PIGMOD, Liběchov; knoblochova@iapg.cas.cz

Úvod

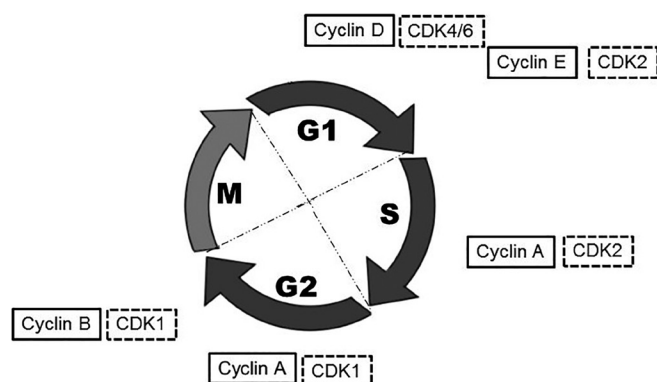
Posloupnost událostí vedoucí k buněčnému dělení se označuje jako buněčný cyklus. Obvyklou metodu používanou k charakterizaci a lokalizaci specifických komponent buněčného cyklu představuje u fixovaných buněk nepřímá imunofluorescence. Rozvoj mikrosko-

pického snímání živých buněk v reálném čase přinesl až objev a rozvoj technologie spojené s využitím GFP („green fluorescent protein“, zelený fluorescenční protein) a dalších fluorescenčních proteinů, které je možno geneticky kódovat a díky tomu fúzovat s téměř jakýmkoliv buněčným proteinem. Díky rozvoji mikroskopie

a designu nových fluorescenčních proteinů se neustále zlepšují možnosti snímání pochodů buněčného cyklu v reálném čase v živých buňkách.

Buněčný cyklus

Buněčný cyklus se skládá ze čtyř odlišných fází: G1, S, G2 a mitózy. Během S-fáze dochází k replikaci DNA (S z angl. *DNA synthesis* – syntéza DNA), během M-fáze (M z angl. *mitosis* – mitóza) nastává vlastní buněčné dělení. G1-fáze (G z angl. *gap* – mezer) je přípravou na S-fázi a G2-fáze je přípravou na mitózu. Fáze G1, S a G2 se společně označují jako interfáze. Pátou fází lze nazvat fázi G0, ve které buňka tzv. vystoupí z buněčného cyklu a nedělí se. Tato fáze je typická např. pro plně diferencované buňky. Cyklin-dependentní kiny (CDK) představují hlavní regulátory průchodu buněčným cyklem. CDK jsou regulovány inhibiční fosforylací kinasami Wee1 a Myt1, proti které působí aktivační defosforylace fosfatasami z rodiny CDC25¹. CDK musí být také fosforylovány kinasou aktivující kinasy CDK (*CDK-activating kinase*, CAK) a dále je nezbytná přítomnost cyklinu jakožto aktivačního kofaktoru. Vazba cyklinu na kiny CDK je regulována nejen vzájemnou afinitou ke konkrétní kinase, ale také expresí a degradací cyklinu v určitý čas na určitém místě. CDK mohou být také inhibovány vazbou malých proteinů označovaných jako inhibitory cyklin dependentních kinas. Průchod buněčným cyklem je převážně zajištěn kinasami CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6 v kombinaci s cykliny A, B a D a jejich variantami (obr. 1). Kromě výše zmíněných regulačních mechanismů jsou CDK regulovány změnou své lokalizace (převážně translokace mezi jádrem a cytoplazmou), což vede k prostorovému a časovému oddělení nebo přiblížení reakčním partnerů². Právě translokace proteinů v průběhu buněčného cyklu je často využívána při konstrukci fluorescenčních biosenzorů monitorujících průchod buněčným cyklem.



Obr. 1: Schématické znázornění regulace průběhu buněčného cyklu u eukaryot. Aktivní kiny CDK s podjelenotkami cykliny umožňují buňce přechody mezi jednotlivými buněčnými fázemi. Upraveno z³.

Monitorování buněčného cyklu v živých buňkách

Přelomovým nástrojem pro monitorování buněčného cyklu v živých buňkách je již zmiňovaný objev fluorescenčních proteinů a jejich využití pro konstrukci gene-

ticky kódovaných reportérových systémů⁴. Při konstrukci fluorescenčních biosenzorů jsou vytvořeny kódující sekvence obsahující buněčný protein nebo jeho funkční element. K sekvenci tohoto proteinu je připojena sekvence kódující fluorescenční protein. Výsledkem je exprese navrženého proteinu – biosenzoru. Pro konstrukci fluorescenčních biosenzorů pro monitorování buněčného cyklu v živých buňkách jsou vybírány také buněčné proteiny, které hrají roli v průchodu buněčným cyklem a zároveň vykazují definované charakteristické chování v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Biosenzor založený na detekci replikace

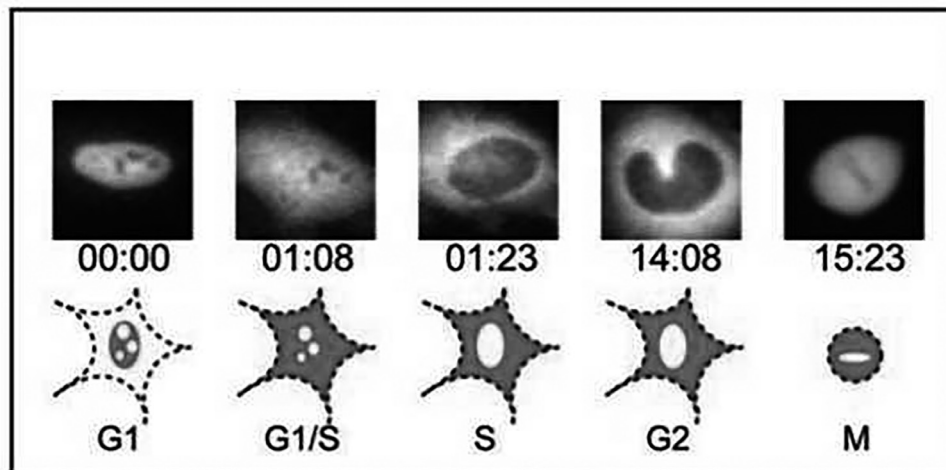
Prvním příkladem geneticky kódovaného fluorescenčního biosenzoru je dobře prozkoumaný replikační protein PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*, proliferující buněčný jaderný antigen) fúzovaný s proteinem GFP (PCNA-GFP). PCNA je kofaktorem DNA polymerázy delta a při replikaci tvoří zřetelné replikační fokusy⁵, díky čemuž je možné odlišit všechny čtyři fáze buněčného cyklu. Ve fázi G1 je senzor rovnoměrně difundovaný v jádře, i když nevstupuje do jadérek. Během fáze S je senzor díky PCNA rekrutován k ohniskům replikace, kde tvoří viditelné body (obr. 3a). Tyto fokusy se pohybují a mění svoji velikost během replikace. Zmizení fokusu a homogenizace signálu PCNA-GFP na konci fáze S je znakem počínající fáze G2⁵. Na začátku mitózy při rozpadu jaderné membrány se signál stává homogenní v rámci celé buňky⁶. PCNA-GFP byla použita k rozlišení jednotlivých fází buněčného cyklu nejen v lidských a myších živých buňkách⁷⁻⁹, ale i u embryí ježovky a *C. elegans*¹⁰.

Biosenzor založený na translokaci mezi buněčnými kompartmenty

Další geneticky kódovaný fluorescenční biosenzor představuje lidská DNA helikasa B (DHB) fúzovaná s proteinem GFP (DHB-GFP). Senzor DHB-GFP translokuje při přechodu z fáze G1 do S z jádra do cytoplazmy, kde zůstává během fází S a G2¹¹. DHB-GFP umožňuje rozlišit fáze G1 (jaderný signál), S a G2 (cytoplazmatický signál) a fázi M, protože při rozpadu jaderné membrány senzor difunduje skrze celou buňku (obr. 3b)⁶.

Hahn a kol. použili k zobrazení buněčného cyklu kombinaci upraveného fragmentu DHB fúzovaného s červeným fluorescenčním proteinem (*red fluorescent protein*, RFP) (DHB-RFP) a PCNA se zesíleným žlutým fluorescenčním proteinem (*enhanced yellow fluorescent protein*, EYFP) (PCNA-EYFP) v živých buňkách (obr. 3c). Autoři použili fragment z C-konce DHB proteinu, který byl postačující k úspěšné translokaci mezi kompartmenty (obr. 2). Nevýhodou DHB-GFP senzoru představuje neschopnost rozlišit ze signálu v cytoplazmě fázi S a G2 a zároveň difuzní signál v jádře u PCNA-GFP senzoru může představovat G1 i G2 fázi. Kombinace DHB-RFP a PCNA-EYFP biosenzorů umožňuje určit fázi buněčného cyklu přesně ve kterémkoliv okamžiku, a je tedy vhodná pro použití ve fixovaných i živých buňkách⁶. Při dlouhodobém sledování živých buněk v reálném čase ovšem stačí využít samotný PCNA-GFP senzor vzhledem k přidané časové informaci, kdy

je zřejmé, že po proběhlé S-fázi musí nastat G2-fáze a po proběhlé M-fázi musí nastat G1-fáze.



Obr. 2: Zobrazení průchodu buněčným cyklem pomocí fluorescenčního biosenzoru DHB-RFP založeném na translokaci mezi buněčnými kompartmenty. Upraveno z⁶.

Spencer et al. upravili fragment DHB, aby kvantitativně reagoval na aktivitu kinasy CDK2. Tento upravený fragment obsahuje čtyři fosforylační místa pro kinasu CDK2, jaderný lokalizační signál (*nuclear localisation sequence*, NLS), jaderný exportní signál (*nuclear export signal*, NES) a je navíc fúzovaný se žlutým fluorescenčním proteinem mVenus (DHB-Ven) derivovaným z GFP. Aktivovaný signál NLS umožňuje vstup proteinů do jádra, aktivovaný signál NES umožňuje výstup proteinů z jádra. Po fosforylaci senzoru DHB-Ven kinasou CDK2 se aktivuje signál NES a deaktivuje signál NLS¹². Následně je senzor DHB-Ven translokován do cytoplazmy. Právě na základě translokace z jádra do cytoplazmy dokáže DHB-Ven rozlišit G1, S a G2 fázi. Fázi M lze určit podle difuzního signálu, obarvení DNA, případně buněčné morfologie. Při vzrůstání aktivity kinasy CDK2 na počátku fáze S vzrůstá i poměr signálu v cytoplazmě v porovnání s jádrem. Ve fázi G1 je senzor převážně v jádře (poměr signálu je cca 0,5 – 0,8), ve fázi S je senzor v jádře i cytoplazmě (poměr signálu je cca 0,8 – 1,2) a v G2-fázi je senzor převážně v cytoplazmě (poměr signálu je cca 1,2 a vyšší)¹³. Senzor DHB-Ven byl použit pro zjištění průběhu buněčného cyklu a aktivity kinázy CDK2 v lidských buněčných liniích^{14–18}. V jiné studii byl fragment DHB fúzován s EGFP pro monitorování průchodu buněčným cyklem u *C. elegans*¹⁹.

Systém biosenzorů založený na řízené destrukci proteinů v rámci buněčného cyklu

Dalším zajímavým systémem rozlišujícím jednotlivé fáze buněčného cyklu je tzv. FUCCI systém (*fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator*, fluorescenční indikátor buněčného cyklu založený na ubikvitinaci). Tento systém je založený na expresi a následné proteolytické degradaci proteinů Cdt1 a gemininu v různých fázích buněčného cyklu. Cdt1 působí jako licenční faktor pro DNA replikaci a je aktivní v G1. Geminin je

inhibitor Cdt1 a je exprimován ve fázích S a G2. Cdt1 a geminin tak dohromady zajišťují, že k licencování replikačních počátků (tj. k jedinečnému označení replikačních počátků, aby buňka zabránila opakovanému začátku replikace ze stejného počátku během S-fáze) dojde pouze jednou za buněčný cyklus, a to v G1-fázi²⁰. Polyubikvitinaci Cdt1, jež je nezbytná pro následnou proteolytickou degradaci Cdt1, zajišťují E3 ubikvitin ligasy CUL4^{Ddb1} a SCF^{Skp2}. Polyubikvitinaci gemininu zajišťuje E3 ubikvitin ligasa APC/C. Aktivity těchto E3 ubikvitin ligas oscilují během buněčného cyklu²¹. CUL4^{Ddb1} je aktivní pouze v S-fázi, SCF^{Skp2} je aktivní ve fázích S, G2 a M, avšak v G1 fázi je vypnut. APC/C je aktivní v mitóze a v G1. Geminin je exprimován a je aktivní během

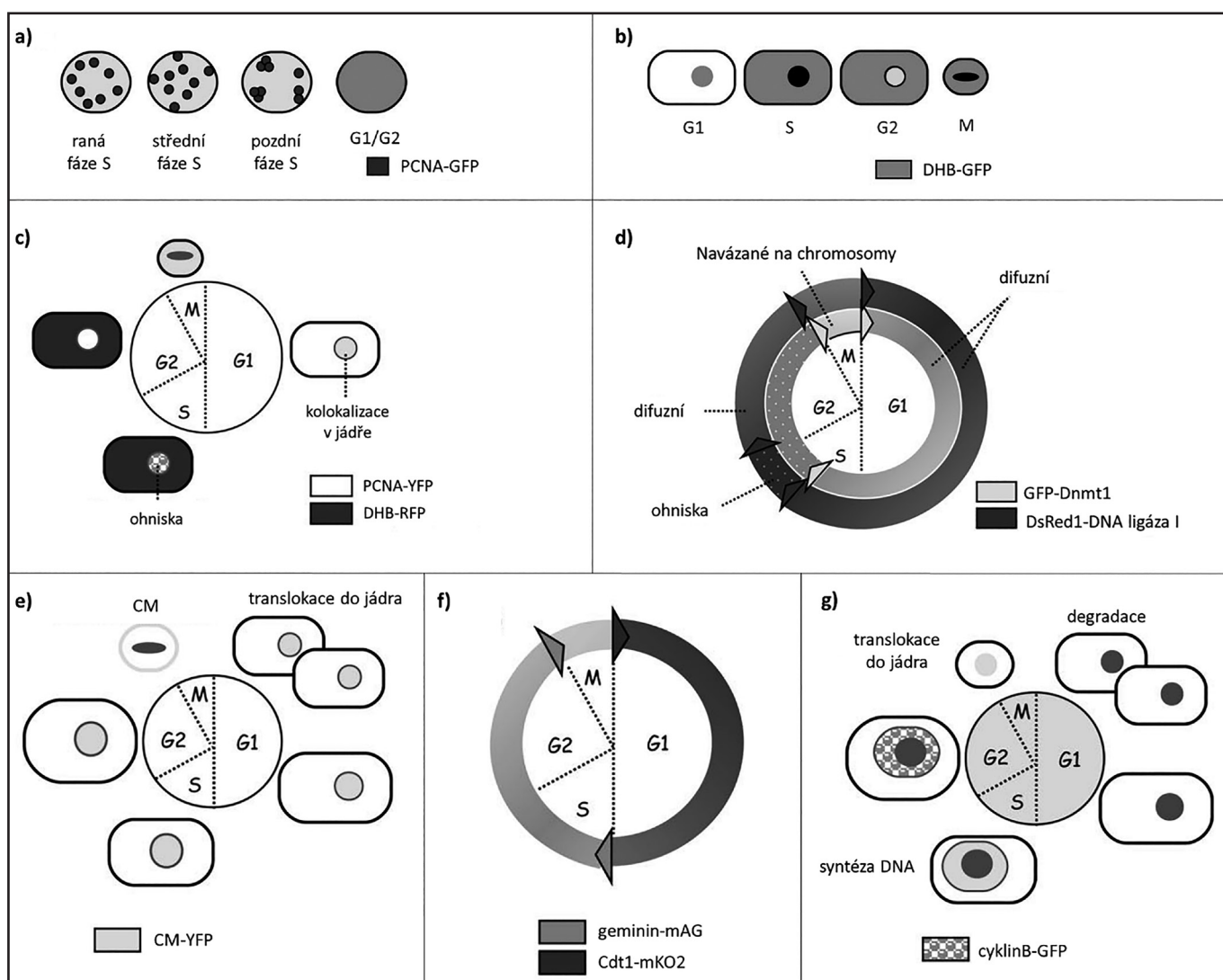
fází S a G2, kdy inhibuje faktor Cdt1. Avšak na konci mitózy (od anafáze) a v G1-fázi je poslán do degradace APC/C komplexem. Cdt1 je tak aktivní během fáze G1, kdy zajišťuje licencování DNA pro následnou replikaci. Během S-fáze je však inhibován vazbou gemininu a navíc poslán do degradace pomocí CUL4^{Ddb1} a SCF^{Skp2}. Během G2 fáze a mitózy je pak jeho destrukce indukována již jen pomocí SCF^{Skp2}.

Sakaue-Sawano et al. využili oscilace hladin Cdt1 a gemininu k rozlišení jednotlivých fází buněčného cyklu. k V tzv. FUCCI(SA) systému využili monitorování průběhu buněčným cyklem změny v aktivitách SCF^{Skp2} a APC/C. Fragment proteinu Cdt1, který obsahuje sekvenci pouze pro SCF^{Skp2} závislou polyubikvitinaci, fúzovali s červeným proteinem mKO2 (Cdt1-mKO2) a fragment gemininu, který je polyubikvitinován pomocí APC/C fúzovali se zeleným proteinem mAG (geminin-mAG). Ve fázi G1 je zřetelný pouze signál Cdt1-mKO2, na přechodu fází G1 a S je patrný signál Cdt1-mKO2 i geminin-mAG a během fází S, G2 a M je viditelný pouze signál geminin-mAG (obr. 3f). Během fáze M vykazuje geminin-mAG difuzní signál v celé buňce a od anafáze dochází k jeho poklesu²⁰. Výhodou FUCCI(SA) systému je, že dokáže rozlišit přechod mezi fázemi G1 a S s vysokou přesností. Nevýhodou této verze FUCCI systému je, že nedokáže rozlišit mezi fázemi S a G2. Recentně publikovaná varianta systému FUCCI(CA) tuto nevýhodu odstraňuje. U FUCCI(CA) je využit mutovaný fragment Cdt1, který je polyubikvitinován výhradně pomocí CUL4^{Ddb1}, který je však aktivní pouze v S-fázi. To vede k tomu, že fragment Cdt1 je destruován na přechodu G1/S a začíná se opětovně akumulovat od začátku G2²². FUCCI systém s jinými fluorescenčními proteiny (Cdt1-mCherry, geminin-mVenus) byl využit pro sledování buněčného cyklu u buněčných linií^{23,24}. Nezanedbatelnou předností FUCCI systému je i fakt, že autoři vytvořili i myši transgenní linii, u které je možné sledování buněčného cyklu u embryí²⁵, u buněk v orgánových explantátech²⁶ nebo u buněčných kultur^{27–29}.

Chromobodies

Jakožto slibná technologie vypadá použití tzv. „nanobodies“ pro sledování nejrůznějších buněčných pochodů v reálném čase. Nanobodies jsou protilátky o velikosti jednotek nanometrů. Běžné protilátky se skládají z dvou těžkých (*heavy*, H) a dvou lehkých (*light*, L) řetězců. Oba řetězce mají na N-konci variabilní doménu (V_H nebo V_L), která obsahuje vazebné místo pro antigen^{5,30}. Konvenční protilátky vykazují výborné vlastnosti při studiu fixovaných buněk, avšak nelze je použít pro snímání buněčných pochodů v reálném čase. Důvodem je jejich malá prostupnost dovnitř buňky a také redukční prostředí v cytoplazmě, které zredukuje disulfidické můstky a změní jejich konformaci³¹. Alternativou je použití protilátek produkovaných zvířaty z čeledi velbloudovitých (rod velbloudů a lam). Tato zvířata produkují protilátky rozpoznávající epitop pouze variabilní doménou na těžkém řetězci („variable heavy chain of a heavy chain antibody“, V_{HH}). Díky velikosti V_{HH} o roz-

měrech 2 nm x 4 nm (13 kDa) se pro tyto fragmenty vžil název nanobodies³². Jejich výhodou je relativně jednoduchá příprava, stabilita, malá velikost a silná afinita k cílovému antigenu³⁰. Nezanedbatelnou výhodou nanobodies je díky jejich malé velikosti možnost použití při superrozlišovací mikroskopii. Nanobodies fúzané s fluorescenčním proteinem (chromobodies) kombinují výhody klasických protilátek (rozpoznávání endogenních proteinů, možnost rozpoznání posttranslačních modifikací) s výhodami geneticky kódovaných biosenzorů (možnost aplikace v živých buňkách)³⁰. V porovnání s klasickými geneticky kódovanými biosenzory je významnou výhodou použití chromobodies detekce endogenního proteinu. První chromobodies byly popsány pro detekci chromatinu (histon H2B-chromobody), cytoskeletu (β -aktin – chromobody), jaderné obálky (lamin B1-chromobody) a replikace a průběhu buněčného cyklu (PCNA-chromobody). Pro určení buněčné fáze bylo PCNA-chromobody použito v liskách buněčných liniích^{33–35}.



Obr. 3: Přehled geneticky kódovaných biosenzorů pro zobrazení buněčného cyklu v živých buňkách. a) PCNA-GFP tvoří jaderné fokusy ve fázi S^{5, 7, 10}. b) Fragment lidské DNA helikasy B fúzaný s proteinem GFP (DHB-GFP) translokuje při přechodu z G1 do S fáze z jádra do cytoplazmy, kde zůstává během S a G2 fáze¹¹. c) Kombinace fragmentu DHB fúzaného s RFP a PCNA fúzaného s YFP byla uplatněna k zobrazení všech fází buněčného cyklu⁶. d) DNA ligasa I fúzaná s DsRed1 (DsRed1-DNA ligáza I) v kombinaci s DNA methyltransferasou Dnmt1 fúzanou s GFP (Dnmt1-GFP) byly použity k rozlišení všech fází buněčného cyklu³⁶. e) Protein YFP fúzaný s doménou vázající se na cytoplazmatickou membránu (CM) CM-YFP byl využit k pozorování rozpadu jaderné membrány a jejího složení během mitózy³⁷. f) FUCCI systém je založen na kombinaci exprese a degradace gemininu-mAG (akumuluje se během fází S, G2 a M a je degradován ve fázi G1) a Cdt1-mKO2 (akumuluje se ve fázi G1 a poté je degradován)²⁰. g) Fragment cyklinu B fúzaný s GFP je exprimován v průběhu fáze S, translokován do jádra a degradován během mitózy³⁸. Upraveno z³⁹.

Další fluorescenční biosenzory

Dalším systémem vhodným pro rozlišení jednotlivých fází buněčného cyklu ve fixovaných i živých buňkách je použití DNA ligasy I fúzané s DsRed1 (DsRed1-DNA ligasa I) v kombinaci s DNA methyltransferasou Dnmt I fúzanou s GFP (Dnmt-GFP) (obr. 3d). DsRed1-DNA ligasa I vykazuje ve fázi G1 difuzní signál v jádře, během fáze S tvoří výrazné fokusy a během G2 fáze se projevuje opět difuzním signálem. Průběh fáze M lze odvodit z typické buněčné morfologie. Dnmt-GFP se v průběhu G1 i S fáze projevuje obdobně jako DsRed1-DNA ligasa I, avšak během fáze G2 tvoří výrazné fokusy³⁶. Kombinací obou senzorů je možné zjistit jakoukoliv fázi buněčného cyklu během kteréhokoliv okamžiku.

Geneticky kódovaný YFP fúzaný s doménou vázající se na cytoplazmatickou membránu (CM-YFP) a jadernou lokalizační sekvencí NLS byl použit k pozorování rozpadu jaderné membrány a jejího složení během mitózy (obr. 3e). Senzor CM-YFP zůstává v průběhu interfáze v jádře, avšak během mitózy po rozpadu jaderné membrány difunduje do cytoplazmy a přednostně se váže na cytoplazmatickou membránu. Po obnovení jaderné membrány je senzor opět transportován do cytoplazmy³⁷.

Thomas a kol. použili k rozlišení fáze S, přechodu mezi fázemi G2/M a mitózou fragment cyklinu B s cytoplazmatickým retenčním signálem (CRS) a destrukčním boxem, fúzaný s GFP (obr. 3g). Cyklin B je totiž exprimován v průběhu S-fáze, po fosforylaci CRS elementu následně translokován do jádra a na konci mitózy je degradován³⁸.

Závěr

Přestože naše porozumění pochodů zajišťujících průběh buněčného cyklu již velmi pokročilo, pořád zde ješ-

tě není dostatek nástrojů, které bychom mohli použít v živých buňkách. Milníkem bylo zavedení technologie spojené s proteinem GFP a dalšími fluorescenčními proteiny, které jako první umožnilo sledování konkrétních molekul v živých buňkách v reálním čase. Dalším zlepšení podmínek pro přežití buněk představuje využití fluorescenčních proteinů s excitačním a emisním spektrem v infračervené nebo blízce infračervené oblasti. Nevýhodou geneticky kódovaných fluorescenčních biosenzorů jsou ovšem možné artefakty spojené s jejich nepřírodně vysokou expresí a také změna konformace původní molekuly po fúzi s GFP. Při použití každého biosenzoru by mělo být pečlivě zkoumáno, zda daný biosenzor sám o sobě neovlivňuje parametry a průběh průchodu buněčným cyklem. V neposlední řadě je třeba dbát na velikost značeného proteinu, protože pokud je značený protein malý, může fúze s fluorescenčním proteinem zcela změnit chování původního proteinu v buňce. Zároveň bychom měli mít na paměti, že geneticky kódované fluorescenční biosenzory neukazují chování endogenních molekul, nýbrž vytvořených konstruktů. Možnost sledovat chování endogenních molekul přináší technologie chromobodies, jejichž výhodou je i možnost aplikace v živých buňkách a také případné sledování posttranslačních modifikací. Nevýhodou této technologie ovšem zatím zůstává vysoká výrobní cena nových chromobodies a komerční dostupnost pouze omezeného množství. I přes své některé nevýhody představují fluorescenční biosenzory vynikající nástroj pro sledování buněčného cyklu v živých buňkách.

Poděkování:

Tento referátový článek byl podpořen MŠMT programem národní udržitelnosti (NPU) reg.č. LO1609.

Literatura

1. Nilsson I, Hoffmann I: *Prog. Cell Cycle Res.* 4, 107 (2000).
2. Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B: *Biosci. Rep.* 30, 243 (2010).
3. Lombardi D, Lasagni L (2016): Cell-cycle Alterations in Post-mitotic Cells and Cell Death by Mitotic Catastrophe. In: *Cell Biology – New Insights* (Najman S. ed), InTechOpen, London, 2016.
4. Wouters FS, Verveer PJ, Bastiaens PI: *Trends Cell Biol.* 11, 203 (2001).
5. Leonhardt H, Rahn HP, et al.: *J Cell Biol* 149, 271 (2000).
6. Hahn AT, Jones JT, Meyer T: *Cell Cycle* 8, 1044 (2009).
7. Essers J, Theil AF, et al.: *Mol. Cell. Biol.* 25, 9350 (2005).
8. Rothbauer U, Zolghadr K, et al.: *Nat. Methods* 3, 887 (2006).
9. Somanathan S, Suchyna TM, et al.: *J. Cell. Biochem.* 81, 56 (2001).
10. Kisielewska J, Lu P, Whitaker M: *Biol. Cell* 97, 221 (2005).
11. Gu J, Xia X, et al.: *Mol. Biol. Cell* 15, 3320 (2004).
12. Regot S, Hughey JJ, et al.: *Cell* 157, 1724 (2014).
13. Spencer SL, Cappell SD, et al.: *Cell* 155, 369 (2013).
14. Barr AR, Heldt FS, et al.: *Cell Syst.* 2, 27 (2016).
15. Gookin S, Min M, et al.: *PLOS Biol.* 15, e2003268 (2017).
16. Overton KW, Spencer SL, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4386 (2014).
17. Arora M, Moser J, Phadke H, et al.: *Cell Rep.* 19, 1351 (2017).
18. Cappell SD, Chung M, et al.: *Cell* 166, 167 (2016).
19. van Rijnberk LM, van der Horst SEM, et al.: *PLoS One* 12, e0171600 (2017).
20. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, et al.: *Cell* 132, 487 (2008).
21. Nakayama KI, Nakayama K: *Nat. Rev. Cancer* 6, 369 (2006).
22. Sakaue-Sawano A, Yo M, et al.: *Mol. Cell* 68, 626 (2017).
23. Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, et al.: *BMC Cell Biol.* 12, 2 (2011).
24. Sasaki T, Sato Y, et al.: *Sci. Rep.* 7, 11257 (2017).
25. Abe T, Sakaue-Sawano A, et al.: *Development* 140, 237 (2013).

Literatura (pokračování)

26. Mort RL, Ford MJ, Sakaue-sawano A, et al.: *Cell Cycle* 13, 2681 (2014).
27. Tomura M, Sakaue-Sawano A, et al.: *PLoS One* 8: 1 (2013).
28. Bertero A, Vallier L: *Cell Cycle* 14, 948 (2015).
29. Kinjo I, Qin J, et al.: *Nat. Commun.* 6, 6301 (2015).
30. Schmidthals K, Helma J, et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3203 (2010).
31. Cattaneo A, Biocca S: *Trends Biotechnol.* 17, 115 (1999).
32. Muyldermans S: *Annu. Rev. Biochem.* 82, 775 (2013).
33. Burgess A, Lorca T, Castro A: *PLoS One* 7, 1 (2012).
34. Schorpp K, Rothenaigner I, et al.: *J. Biomol. Screen.* 21, 965–977 (2016).
35. Charrasse S, Gharbi-Ayachi A, et al.: *Nat. Commun.* 8, 206 (2017).
36. Easwaran HP, Leonhardt H, Cardoso MC: *Cell Cycle* 4, 453 (2005).
37. Jones JT, Myers JW, et al.: *Nat. Biotechnol.* 22, 306 (2004).
38. Thomas N: *Cell Cycle* 2, 545 (2003).
39. Kurzawa L, Morris MC: *Chembiochem* 11, 1037 (2010).

Souhrn

Knoblochová L., Šolc P.: Biosenzory pro monitorování buněčného cyklu v živých buňkách

Sledování buněčného cyklu v živých buňkách je klíčové pro lepší pochopení molekulárních mechanismů regulujících buněčné dělení. Významným milníkem v monitorování buněčného cyklu v živých buňkách představuje objev fluorescenčních proteinů. Připojením sekvence kódující fluorescenční protein k vybranému buněčnému proteinu se vytvoří tzv. fluorescenční biosenzor. Mezi nejvýznamnější senzory v této oblasti patří senzor PCNA-GFP (proliferating-cell nuclear antigen, proliferační buněčný jaderný antigen) nebo DHB-mVenus (DNA helikasa B) a FUCCI systém (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator, fluorescenční indikátor buněčného cyklu založený na ubikvitinaci). PCNA je replikační faktor, který při DNA replikaci tvoří v jádře zřetelná replikační ohniska. DHB-GFP nebo -mVenus byl použit na rozlišení fáze buněčného cyklu díky translokaci z jádra do cytoplazmy. FUCCI systém je založený na detekci exprese a následné degradace proteinů Cdt1 a gemininu, které hrají roli v licencování replikačních počátků. Zmíněné biosenzory jsou schopné rozlišit všechny fáze buněčného cyklu. Vhodným nástrojem k sledování buněčného cyklu v živých buňkách jsou také tzv. chromobodies, což jsou malé fragmenty protilátek spojených s chromoforem. Využit lze například PCNA-chromobody. Přestože fluorescenční biosenzory vykazují i jisté nevýhody, jsou zatím nejlepším nástrojem pro monitorování buněčného cyklu v živých buňkách.

Klíčová slova: buněčný cyklus, fluorescenční proteiny, fluorescenční biosenzory

Summary

Knoblochová L., Šolc P.: Biosensors for monitoring the cell cycle in live cells

Cell cycle monitoring in live cells is crucial for better understanding of molecular mechanisms regulating cell cycle. Important achievement in cell cycle monitoring in live cells represents discovery of fluorescent proteins. Fluorescent biosensor is created by attaching coding sequence of a fluorescent protein to the protein of interest. Among most important fluorescent biosensors in cell cycle monitoring are PCNA-GFP sensor (proliferating-cell nuclear antigen) or DHB-mVenus (DNA helicase B) and FUCCI system (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator). PCNA is replication factor, which creates distinct replication foci during ongoing replication. DHB-GFP or mVenus was used for monitoring of cell cycle phases because of its translocation from the nucleus to the cytoplasm. FUCCI system is based on the detection of expression and following degradation of Cdt1 and geminin proteins that play an important role in licensing of replication origins. Above mentioned biosensors are able to distinguish all cell cycle phases. A suitable tool for cell cycle monitoring in live cells are also chromobodies (small antibodies fragments with an attached fluorophore). As an example, there is PCNA-chromobody on market. Although fluorescent biosensors show also certain disadvantages, they are now the best solution for cell cycle monitoring in live cells.

Keywords: cell cycle, fluorescent proteins, fluorescent biosensors

ALARMON (p)ppGpp: KLÍČOVÁ SIGNÁLNÍ MOLEKULA REGULUJÍCÍ STRESOVOU OBRANU BAKTERIÍ

Ondřej Bulvas, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; bulvas@uochb.cas.cz

Úvod

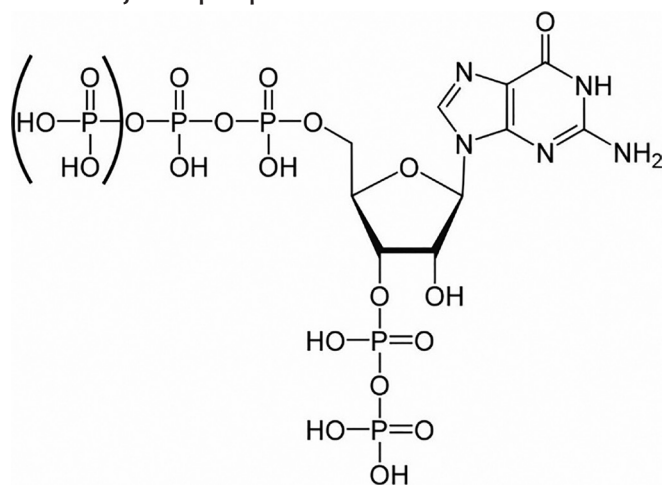
Zástupci bakterií se v průběhu evoluce naučili kolonizovat snad všechny myslitelné ekosystémy. Od všestranných půdních saprofytů po vysoce specializované parazitické druhy, bakterie musí být schopné reagovat na celou řadou nepříznivých a rychle se měnících vnějších podmínek. Pro tyto účely mají bakterie celé spektrum stresových adaptačních mechanismů, včetně klíčové stringentní odpovědi.

Stringentní odpověď

Stringentní odpověď je stresový obranný mechanismus, který je konzervovaný u většiny bakterií a reaguje zejména na limitaci živinami (dusíkem, uhlíkem, fosfátem) nebo na tepelný či oxidativní stres. Tyto vněj-

ší stimuly způsobují změny koncentrace intracelulární signální molekuly (alarmonu) guanosintetrafosfátu a guanosinpentaosfátu, souhrnně označovaného zkratkou (p)ppGpp (Obr. 1). Při běžném exponenciálním růstu je (p)ppGpp přítomen pouze v nízkých bazálních koncentracích a funguje jako modulátor bakteriálního růstu, buněčného cyklu a obecného metabolismu¹. V případě limitace živinami může hladina tohoto alarmonu skokově vzrůst, což má ve výsledku zásadní dopad na aktivaci specializovaných stresových odpovědí, ale zároveň způsobuje inhibici produkce rRNA, růstu a dělení bakterií. Tento efekt může být vysvětlen působením (p)ppGpp na několika úrovních, od regulace transkripce konkrétních genů jeho vazbou na RNA polymerasu, přes změny poměru koncentrace jednotlivých

purinových nukleotidů, až po vazbu na konkrétní metabolické enzymy spojenou s regulací jejich aktivity². U modelového kmene *E. coli* může stringentní odpověď ovlivnit transkripci více než 30 % veškerých genů, přičemž přibližně polovina z nich je indukována, zatímco druhá je naopak potlačena³.



Obr. 1: Struktura alarmonu stringentní odpovědi (p)ppGpp. Označení (p)ppGpp souhrnně označuje molekuly guanosintetrafosfátu a guanosinpentafosfátu (naznačeno závorkou ve schématu molekuly) fungující jako signální molekuly u stringentní odpovědi.

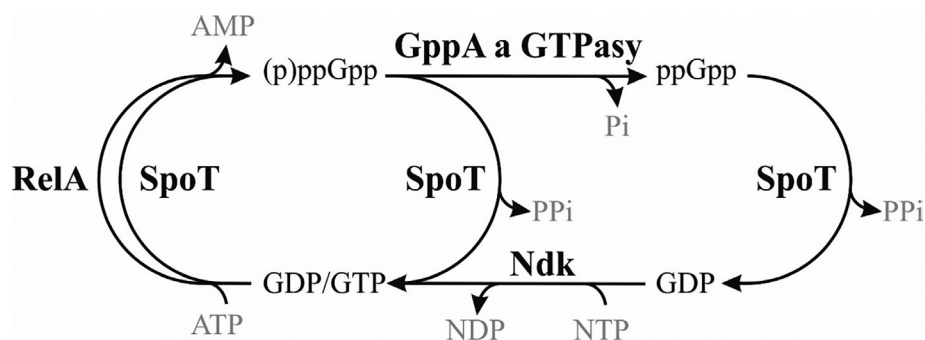
RSH proteiny

Klíčovými regulátory hladiny alarmonu (p)ppGpp v bakteriální buňce jsou enzymy z rodiny RSH proteinů (z angl. RelA/SpoT Homologue), které mohou katalyzovat reversibilní reakci syntézy (p)ppGpp z ATP a GDP/GTP přidáním pyrofosfátového zbytku do 3' pozice molekuly GDP nebo GTP, a hydrolýzy (p)ppGpp zpět na GDP/GTP a pyrofosfát. Konverzi pppGpp na ppGpp může specificky katalyzovat enzym guanosinpentafosfátfosfohydrolasa (GppA) nebo nespecificky celá řada buněčných GTPas². Celý systém založený na RSH proteinech je schopen jemně regulovat stabilní hladinu (p)ppGpp, a zároveň také vyvolat její skokové zvýšení (shrnuje na Obr. 2). S výjimkou bakterií ze skupiny PVC (kmeny *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* a *Chlamydiae*) a některých patogenů s redukováným genomem (například řád *Rickettsiales*, rod *Mycoplasma* nebo původce syfilis *Treponema pallidum*) jsou geny pro RSH mezi bakteriemi vysoce konzervované. RSH proteiny lze

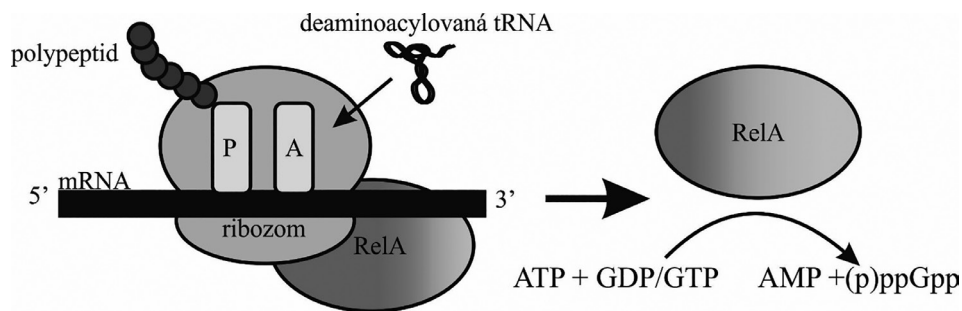
rozdělit na „dlouhé“ multidoménové a „krátké“ jednodoménové enzymy. Většina bakterií má jeden bifunkční protein Rel složený z šesti domén rozdělených mezi katalytickou N-koncovou část (NTD) a regulační C-koncovou část (CTD). V NTD části se nacházejí oblasti pro hydrolýzu (HD) a syntézu (p)ppGpp. Odlišná situace je u tříd β -/ γ -*proteobacterium* (do kterých patří především dobře prozkoumaný model *E. coli*), u kterých došlo k duplikaci genu *Rel* za vzniku dvou paralogů *RelA* a *SpoT*. „Krátké“ RSH proteiny tvoří skupiny příbuzných jednodoménových enzymů s (p)ppGpp hydrolasovou (SAH – z angl. Small Alarmon Hydrolases) nebo syntetasovou (SAS – z angl. Small Alarmon Synthases) doménou^{1,4}.

Nejlépe prozkoumaný mechanismus stringentní odpovědi zprostředkované současně proteiny RelA a SpoT je u modelového organismu *E. coli*. RelA má pouze (p)ppGpp syntetasovou aktivitu indukovanou nedostatkem aminokyselin nebo tepelným šokem⁵. Přestože si RelA zachovává patrný pozůstatek HD domény, její hydrolasová aktivita byla v průběhu evoluce ztracena⁴. RelA v buňce funguje především jako senzor její translační aktivity s přímou vazbou na ribozomy. Za normálních podmínek jsou při translaci nové aminokyseliny dopravovány do akceptorového místa (A-místa) na ribozomu ve formě aminoacyl-tRNA konjugátu. V případě nedostatku „volných“ aminokyselin se v buňce začnou akumulovat deaminoacylované tRNA, které se mohou vázat do volného A-místa, a tím zastaví posun ribozomu. RelA navázaný na zastavený ribozomální komplex je následně aktivován přímou interakcí mezi jeho C-koncovou regulační částí a 3'-OH skupinou deacylované tRNA⁶. Po této interakci, indukující syntézu (p)ppGpp, dochází k uvolnění RelA z ribozomu a dočasněmu zachování jeho aktivované formy mechanismem „molekulové paměti“ (Obr. 3). Tento fenomén zatím nebyl uspokojivě vysvětlen, ale je pravděpodobně závislý na autoinhibičních vlastnostech CTD částí⁷. RelA je dále alostericky aktivován vlastním produktem (p)ppGpp a tato pozitivní zpětná vazba následně napomáhá ke skokové akumulaci tohoto alarmonu a ke spuštění stringentní odpovědi⁸.

Zatímco RelA z *E. coli* reaguje velmi specificky na konkrétní signál v podobě nedostatku aminokyselin, druhý bifunkční RSH protein SpoT funguje se svou (p)ppGpp hydrolasovou aktivitou jako regulační uzel stringentní odpovědi a dále jako křižovatka signálů pro další stresové události, jako je limitace zdrojů uhlíku nebo železa⁹. Bakteriální kmeny s úplně vyřazenou schopností produkovat (p)ppGpp jsou i přes různé fenotypové defekty stále životaschopné, zatímco vyřazení genu *SpoT* zabráňujícího nekontrolovatelnému vzrůstu hladiny (p)ppGpp je pro bakterii letální¹⁰. Regulace aktivity SpoT probíhá pravděpodobně prostřednictvím interakce s dalšími proteiny, schopnými reagovat na stav živin v buňce. Jedním z těchto případů je represe synte-



Obr. 2: Schéma funkce a struktury RSH proteinů. V modelové bakterii *E. coli* je (p)ppGpp syntetizován z GDP/GTP RSH enzymy RelA/SpoT, přičemž je zpětně hydrolyzován bifunkčním enzymem SpoT. Hydrolýzu pppGpp na ppGpp zprostředkovávají GTP-Pasy jako GppA, zatímco přeměnu GDP na GTP zajišťuje nukleotiddifosfát kinasa (Ndk).



Obr. 3: Schéma aktivace stringentní odpovědi proteinem RelA. Po vazbě deaminoacylované tRNA do A-místa ribozomu se indukuje (p)ppGpp syntetasa aktivita proteinu RelA, který se uvolní z ribozomu a pokračuje v syntéze molekul alarmonu (p)ppGpp.

tasové aktivity SpoT GTPasou CgtA¹¹ při dostatku živin. Dalším příkladem aktivace stringentní odpovědi je interakce SpoT s kofaktorem lipidového metabolismu ACP (z angl. Acyl Carrier Protein), který se pravděpodobně váže do oblasti CTD ve SpoT¹². Přesné mechanismy těchto interakcí zatím nebyly dosud objasněny, což je do značné míry způsobeno neúspěšnými pokusy o purifikaci a následné určení prostorové struktury SpoT.

Většina bakterií má intracelulární hladinu (p)ppGpp regulovanou jediným bifunkčním enzymem označovaným jako Rel, který velmi pravděpodobně přebírá funkce obou proteinů RelA a SpoT u *E. coli*. Na rozdíl od modelu *E. coli* nejsou vlastnosti a mechanismy regulace proteinu Rel tak dobře popsány. U *Mycobacterium tuberculosis* je syntéza (p)ppGpp silně indukována interakcí Rel s ribozomy a deaminoacylovanou tRNA¹³, což připomíná mechanismus odpovědi RelA na nedostatek aminokyselin u *E. coli*. Na druhou stranu se zdá, že Rel potřebuje pro aktivaci stringentní odpovědi u některých bakterií dodatečný signál ve formě limitace ostatními živinami. To platí například právě pro *M. tuberculosis*¹⁴ nebo *Helicobacter pylori*¹⁵, zatímco pro jiné bakterie jako *Enterococcus faecalis* je limitace aminokyselinami ke spuštění stringentní odpovědi dostatečná¹⁶. Mezi další netradiční spouštěče stringentní odpovědi mohou patřit i změny vnějších podmínek, jako je hodnota pH nebo koncentrace CO₂ u *H. pylori*¹⁷ nebo přechod ze světla do tmy u *Rhodospseudomonas spheroides*¹⁸. Všechny tyto rozdíly naznačují, že i přes univerzální konzervovanost samotného fenoménu stringentní odpovědi se mohou jeho spouštěcí mechanismy mezi jednotlivými druhy značně lišit, což pravděpodobně odráží jejich adaptaci na rozdílné životní styly¹⁹. Konkrétní molekulární mechanismy regulace těchto dějů zatím nebyly dostatečně popsány a ani některé principy známé z modelu *E. coli* se neukázaly u jiných bakteriálních druhů funkční. Na rozdíl od SpoT není aktivita Rel u těchto bakterií patrně regulována kofaktorem lipidového metabolismu ACP¹². Podobně jako u proteinu SpoT se ukázalo problematické určení prostorové struktury Rel, ale nedávné vyřešení struktury katalyticky aktivní N-koncové domény Rel u *M. tuberculosis* by mohlo v budoucnu napomoci pochopení molekulárního mechanismu jeho funkce²⁰. Celý model stringentní odpovědi, nehledě na počet multidoménových RSH, ještě navíc komplikuje současná přítomnost „krátkých“ jednodoménových SAS a SAH proteinů, jejichž výskyt

i funkce se u různých bakteriálních druhů dramaticky liší a není jasné, do jaké míry se na celém procesu podílí.

Mechanismus účinku (p)ppGpp

Po prudkém zvýšení koncentrace (p)ppGpp v buňce působením některého z RSH proteinů dojde k aktivaci stringentní odpovědi, která je spojena zejména s pozitivní či negativní regulací transkripce celé řady genů. Dochází především k ná-

růstu transkripce genů pro biosyntézu aminokyselin, stresových faktorů nebo samotného genu *Rel*, a to na úkor inhibice produkce rRNA a ribozomálních proteinů. Jedním z mechanismů, popsaných především u *E. coli*, je přímá interakce molekuly (p)ppGpp s RNA polymerasou (RNAP) vedoucí k iniciaci transkripce na vybraných promotorech. Molekula (p)ppGpp se může vázat na dvě odlišná místa v RNAP a alostericky tak ovlivňuje její aktivitu. První vazebné místo se nachází mimo aminokyselinové zbytky zapojené přímo do katalýzy syntézy RNA, stejně jako mimo DNA vazebnou doménu. Tato vazba pravděpodobně slouží k regulaci transkripce při bazálních hladinách (p)ppGpp za normálních růstových podmínek²¹. Druhé vazebné místo pro (p)ppGpp v molekule RNAP je v oblasti sekundárního kanálu, kde se váže také transkripční faktor DksA (supresor DnaK). Právě tento mechanismus je patrně důležitý za podmínek stringentní odpovědi²². Některé promotory vytvářejí s RNAP nestabilní otevřené komplexy (například rRNA promotor), které jsou vlivem vazby (p)ppGpp/DksA destabilizovány, což vede k potlačení transkripce. Naopak jiné promotory, které tvoří s RNAP stabilní otevřené komplexy, mohou být touto vazbou aktivovány²³.

Kromě přímé vazby na RNAP může (p)ppGpp ovlivňovat transkripci i nepřímo procesem kompetice mezi σ -faktory. Za normálních podmínek faktor σ^{70} (RpoD) navádí RNAP k iniciaci transkripce z promotorů genů důležitých pro logaritmický růst (syntéza proteinů, lipidů, replikace DNA). Při stringentní odpovědi vysoká hladina (p)ppGpp inhibuje vazbu σ^{70} na RNAP, a umožňuje tak vazbu alternativních stresových σ -faktorů²⁴. Tyto alternativní faktory mohou být dále regulovány pomocí (p)ppGpp na různých úrovních. Například faktor σ^5 (RpoS) je specifický pro stacionární fázi, která hraje klíčovou roli při rezistenci na stres a expresi faktorů virulence u celé řady patogenních druhů. Stabilita RpoS je komplexně regulována pomocí adaptorového proteinu RssB, který směřuje konstitutivně exprimovaný σ^5 k degradaci v proteazomu. (p)ppGpp však může indukovat expresi antiadaptorových proteinů IraP a IraD vyvazujících RssB, a tím stabilizuje faktor σ^5 v buňce²⁵. Dalším příkladem regulace transkripce pomocí σ -faktorů je přímá stimulace iniciace transkripce z promotorů regulovaných stresovým faktorem σ^E (RpoE) na základě jeho interakce s (p)ppGpp a proteinem DksA²⁶.

Jiným nepřímým mechanismem regulace transkripce u G^+ modelového organismu *Bacillus subtilis* je změna účinnosti iniciace transkripce na základě změn poměru buněčných koncentrací dostupných nukleotidů GTP:ATP. Účinnost transkripce je u některých promotorů závislá na druhu báze na transkripčním startu a může se dramaticky měnit s aktuální hladinou odpovídajícího nukleotidu. Skokové zvýšení biosyntézy (p)ppGpp proteinem Rel vede ke snížení buněčné hladiny GTP, protože tento nukleotid slouží jako jeho reakční substrát²⁷. Zvyšující se hladina alarmonu může dále ovlivnit dostupnost GTP v buňce přímou regulací jeho biosyntézy, jejíž některé klíčové enzymy jsou s různou účinností přímo inhibovány (p)ppGpp²⁸.

Mimo výše popsané regulace exprese na úrovni transkripce byly popsány mechanismy, kdy (p)ppGpp zasahuje také na úrovni translace. CsrA je RNA vazebný protein, který se váže na vedoucí sekvence a ribozomální vazebná místa některých mRNA, a tím je označuje k degradaci. Tato regulační aktivita CsrA může být inhibována vazbou nekódujících RNA, jejichž exprese je indukována pomocí (p)ppGpp²⁹. Další možností regulace translace je interakce (p)ppGpp přímo s elongačními nebo iniciačními faktory vedoucí k inhibici jejich aktivity. Například vazba (p)ppGpp na iniciační faktor GTPasu IF2 vede k destabilizaci tvorby 30S iniciačního ribosomálního komplexu³⁰.

Kromě RNAP může (p)ppGpp přímo regulovat aktivitu i dalších enzymů. (p)ppGpp vznikající katalýzou proteinem Rel se může za určitých podmínek vázat do jeho regulační domény a může touto zpětnou vazbou regulovat jeho enzymovou aktivitu³¹. Dalšími příklady jsou inhibice replikace interakcí (p)ppGpp s DNA primasou (DnaG), regulace metabolismu fosfátu interakcí s enzymem exopolyfosfatase nebo modulace stresové odpovědi na změny pH interakcí s lysin-dekarboxylasou (Ldc/CadA)³². Zajímavou oblastí je role (p)ppGpp v metabolismu dalších nukleotidových signálních molekul – cyklických purinových dinukleotidů. Některé výsledky ukazují, že by jejich syntéza mohla být při stringenční odpovědi částečně regulována pomocí vazby (p)ppGpp na enzymy účastnící se jejich biosyntézy^{32,33}.

S přihlédnutím ke všem výše popsaným mechanismům je zřejmé, že (p)ppGpp může globálně regulovat celou řadu procesů probíhajících v bakteriálních buňkách a je pravděpodobně jednou z centrálních signálních molekul bakterií nejen při stresu, ale i za běžných růstových podmínek.

(p)ppGpp a patogeneze

Rostoucí počet studií ukazuje na klíčovou roli (p)ppGpp pro virulenci mnoha patogenních druhů bakterií³⁴. Pro úspěšnou kolonizaci tkání hostitele a překonání jeho obrany potřebuje bakterie celou řadu specifických faktorů zajišťujících například adhezi, vstup do buněk a tkání nebo modulaci imunitního systému. Regulace těchto velmi specifických funkcí je často provázána s obecnými stresovými odpověďmi. To se děje pomocí integrace individuálních regulátorů virulence s globálními signálními drahami, jako je právě systém závislý na (p)ppGpp. Bakterie může tímto způsobem

efektivně řídit komplexní změny ve své fyziologii. Takovým případem je diferenciace replikativní a transmisivní formy fakultativních intracelulárních parazitů, jako je *Legionella pneumophila*³⁵ nebo přechod mezi růstem v biofilmu a ve volné planktonní formě u *Pseudomonas aeruginosa*³⁶. U rodu *Salmonella* je aktivace produkce virulentních faktorů z ostrůvků patogenity SPI 1 a SPI 2 zcela závislá na signalizaci pomocí (p)ppGpp akumulovaného ve stacionární fázi³⁷. Defekty ve virulenci mnoha patogenních bakterií jsou tak zásadní, že se pracuje na vývoji atenuovaných vakcín založených na kmenech deficientních na schopnost syntézy (p)ppGpp. Vakcíny tohoto typu jsou v současnosti ve vývoji například proti infekcím *Salmonella typhimurium*³⁸.

Mezi obecné mechanismy obrany bakterií proti působení antimikrobiálních látek je vývoj jejich perzistentní formy. V bakteriálních populacích často dochází ke stochastickému vzniku odolných pomalu rostoucích buněk, které při náhlé změně podmínek slouží jako „záchranná síť“ celé populace. Tento fenotyp je spojován s regulací metabolismu mechanismem stringenční odpovědi. U *E. coli* bylo ukázáno, že stochastickou variací v aktivitě enzymů RelA/SpoT může dojít ke zvýšení hladiny (p)ppGpp, která vede přes akumulaci polyfosfátu k aktivaci Lon proteasy. Ta následně štěpí antitoxiny 10 systémů toxin-antitoxin (TA systémy; většinou páry specifické mRNasy s vlastním inhibitorem), které následně aktivují geny nutné pro perzistenci. Zpětná smyčka je zajištěna dalším TA systémem HipAB, který způsobí přes inhibici glutamyl tRNA syntetasy akumulaci deaminoacylovaných tRNA a kanonickou aktivaci stringenční odpovědi. Tento elegantní systém je schopen jemné regulace vzniku perzistentních buněk jak vzácným náhodným mechanismem, tak cílenou aktivací při nepříznivých podmínkách³⁹.

Závěr

Pochopení významu alarmonu (p)ppGpp v bakteriální fyziologii prošlo za poslední dekády významným vývojem. Původně byla stringenční odpověď definována jako adaptační mechanismus na nedostatek aminokyselin, který je specificky řízen enzymem RelA, reagujícím na přítomnost deaminoacylovaných tRNA. Tento pohled se postupně rozšiřuje na integrální funkci (p)ppGpp v regulaci celé řady dalších stresových odpovědí i vzniku perzistence. Ukazuje se, že kromě toho, že (p)ppGpp ovlivňuje řadu fyziologických procesů v bakteriích, jako např. buněčného dělení nebo metabolismu aminokyselin a purinů, sehrává klíčovou roli i ve virulenci patogenních bakterií. Jednotlivé procesy, které jsou (p)ppGpp regulovány a proteiny, se kterými (p)ppGpp interaguje, představují velmi zajímavé cíle pro vývoj nových léčiv proti patogenním bakteriím. Díky tomu, že stringenční odpověď regulovaná (p)ppGpp je specifická pro bakterie, by nové inhibitory mohly být vysoce selektivní a použitelné pro problematické bakteriální infekce.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem NPU LO 1302 od MŠMT.

Literatura

1. Potrykus K and Cashel M: *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 35 (2008).
2. Haurlyuk V, Atkinson GC, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.* 13(5), 298 (2015).
3. Traxler MF, Summers SM, et al.: *Mol. Microbiol.* 68(5), 1128 (2008).
4. Atkinson GC, Tenson T, et al.: *PLoS One* 6(8), e23479 (2011).
5. Vanbogelen RA and Neidhardt FC: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(15), 5589 (1990).
6. Brown A, Fernandez IS, et al.: *Nature* 534(7606), 277 (2016).
7. English BP, Haurlyuk V, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(31), E365 (2011).
8. Shyp V, Tankov S, et al.: *EMBO Rep* 13(9), 835 (2012).
9. Seyfzadeh M, Keener J, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(23), 11004 (1993). Vinella D, Albrecht C, et al.: *Mol. Microbiol.* 56(4), 958 (2005).
10. Xiao H, Kalman M, et al.: *J. Biol. Chem.* 266(9), 5980 (1991).
11. Raskin DM, Judson N, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(11), 4636 (2007).
12. Battesti A and Bouveret E: *J. Bacteriol.* 191(2), 616 (2009).
13. Avarbock D, Avarbock A, et al.: *Biochemistry* 39(38), 11640 (2000).
14. Primm TP, Andersen SJ, et al.: *J. Bacteriol.* 182(17), 4889 (2000).
15. Wells DH and Gaynor EC: *J. Bacteriol.* 188(10), 3726 (2006).
16. Gaca AO, Abranches J, et al.: *Microbiology* 158(Pt 8), 1994 (2012).
17. Park SA, Ko A, et al.: *BMC Microbiol.* 11, 96 (2011).
18. Eccleston ED, Jr. and Gray ED: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54(4), 1370 (1973).
19. Boute CC and Crosson S: *Trends Microbiol.* 21(4), 174 (2013).
20. Singal B, Balakrishna AM, et al.: *FEBS Lett.* 591(15), 2323 (2017).
21. Zuo Y, Wang Y, et al.: *Mol. Cell* 50(3), 430 (2013).
22. Ross W, Sanchez-Vazquez P, et al.: *Mol. Cell* 62(6), 811 (2016).
23. Haugen SP, Ross W, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.* 6(7), 507 (2008).
24. Osterberg S, Del Peso-Santos T, et al.: *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 37 (2011).
25. Merrikh H, Ferrazzoli AE, et al.: *J. Bacteriol.* 191(24), 7436 (2009).
26. Costanzo A, Nicoloff H, et al.: *Mol. Microbiol.* 67(3), 619 (2008).
27. Krásný L and Gourse RL: *EMBO J.* 23(22), 4473 (2004).
28. Kriel A, Bittner AN, et al.: *Mol. Cell.* 48(2), 231 (2012).
29. Edwards AN, Patterson-Fortin LM, et al.: *Mol. Microbiol.* 80(6), 1561 (2011).
30. Milon P, Tischenko E, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(38), 13962 (2006).
31. Syal K, Joshi H, et al.: *FEBS J* 282(19), 3773 (2015).
32. Dalebroux ZD and Swanson MS: *Nat. Rev. Microbiol.* 10(3), 203 (2012).
33. Srivatsan A and Wang JD: *Curr. Opin. Microbiol.* 11(2), 100 (2008).
34. Dalebroux ZD, Svensson SL, et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(2), 171 (2010).
35. Dalebroux ZD, Yagi BF, et al.: *Mol. Microbiol.* 76(1), 200 (2010).
36. Van Delden C, Comte R, et al.: *J. Bacteriol.* 183(18), 5376 (2001).
37. Thompson A, Rolfe MD, et al.: *J. Biol. Chem.* 281(40), 30112 (2006).
38. Na HS, Kim HJ, et al.: *Vaccine* 24(12), 2027 (2006).
39. Germain E, Roghanian M, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(16), 5171 (2015).

Souhrn

Bulvas O., Pichová I.: Alarmon (p)ppGpp: Klíčová signální molekula regulující stresovou obranu bakterií

Pro přežití výkyvů vnějších podmínek bakterie vyvinuly stresové adaptační mechanismy, ke kterým patří i stringentní odpověď, která je řízena hladinou nukleotidové signální molekuly (p)ppGpp. Klíčovými regulátory tohoto procesu jsou multifunkční enzymy Rel a RelA/SpoT z rodiny proteinů RSH. Přestože jsou komponenty a funkce stringentní odpovědi u bakterií vysoce konzervované, mohou se u některých bakterií konkrétní molekulární mechanismy regulace značně lišit. Stringentní odpověď a její komponenty ovlivňují celou řadu buněčných pochodů a představují tak potenciální cíle pro vývoj nových typů léčiv proti infekcím způsobených rezistentními bakteriálními patogeny.

Klíčová slova: stringentní odpověď, (p)ppGpp, RelA/SpoT, Rel, RSH proteiny, stresová odpověď bakterií

Summary

Bulvas O., Pichová I.: Alarmon (p)ppGpp: Key signal molecule regulating stress response in bacteria

To survive fluctuations of the environmental conditions, the bacteria have evolved stress response mechanisms, such as the stringent response, which is controlled by the changes of intracellular signal molecule (p)ppGpp levels. The key regulators of this process are the multifunctional enzymes Rel and RelA/SpoT of the RSH protein family. Components and functions of the stringent response are highly conserved throughout the bacterial domain, yet the particular molecular mechanisms of its regulation can differ strongly between species. Stringent response and its components play a role in the whole spectrum of cellular functions and represent a potential target for development of novel drugs against infections caused by resistant bacterial pathogens.

Keywords: stringent response, (p)ppGpp, RelA/SpoT, Rel, RSH proteins, bacterial stress response

VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH NANOVLÁKENNÝCH MATERIÁLŮ PŘI LÉČBĚ KOŽNÍCH PORANĚNÍ

Simona Lencová, Kamila Zdeňková, Hana Stiborová, Kateřina Demnerová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; lencovas@vscht.cz

Úvod

Infekce kůže a měkkých tkání jsou celosvětově nejčastějším typem infekcí. I přes významné pokroky medicíny mohou vést v krajních případech k závažným komplikacím s fatálními následky. Navzdory úspěšné léčbě některých povrchových kožních infekcí může docházet k napadení podkožní tkáně, ke zpomalení procesu hojení a k přímému ohrožení života. Je proto potřeba hledat efektivní způsoby, jak předcházet takovým patologickým situacím¹. V současné době je v tomto směru pozornost věnována aplikacím nanotechnologií, zejména funkcionalizovaných nanovlákených materiálů. Jejich hlavní výhodou pro medicínské aplikace je podobnost s přirozenou morfologií tkání, díky čemuž mohou stimulovat buněčný růst v místech poškozené tkáně. Využití nanomateriálů pro hojení akutních a chronických kožních defektů je vhodné i díky volitelné době biodegradability bez následného jizvení².

Pro zajištění efektivní léčby kožních zranění je nezbytné kontrolovat vnější podmínky v místě zranění tak, aby byla zajištěna optimální buněčná aktivita během procesu hojení. Jedná se zejména o kyslík, teplotu, dostupnost potřebných nutričních látek a naopak zabránění přístupu nežádoucích elementů³. Právě využití nanovlákených struktur může výrazně přispět k zajištění těchto podmínek, zejména krytím rány za dostatečného přístupu vzduchu. Mimo to je možné do struktur těchto materiálů inkorporovat látky s antimikrobiální aktivitou, které brání bakteriální kolonizaci a infekci rány.

V současné době se testují nanomateriály různého složení se zabudovanými antimikrobiálními činidly, která mají za cíl spolehlivě chránit poranění před infekcí.

Patofyziologie a proces hojení ran

Poškození kůže se projevuje porušením celistvosti integrity tkáně v důsledku mechanických, fyzických nebo metabolických problémů⁴. Rány jsou klasifikovány podle délky trvání a povahy hojivého procesu, jako akutní nebo chronické. Akutní rány se objevují náhle v důsledku odřenin, popálenin, řezů, roztrhnutí a propíchnutí a v případě lehčích poranění za normálních

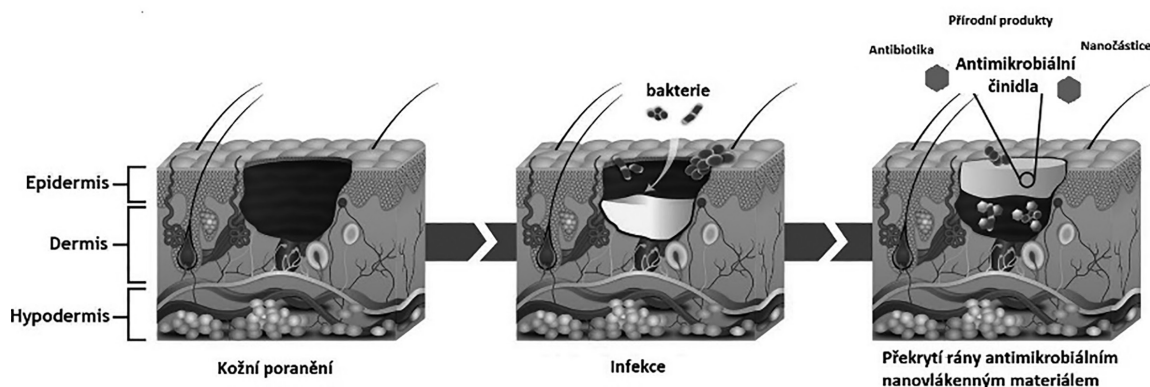
fyzilogických podmínek bývá regenerace epidermální struktury vysoce účinná^{5,6}. V případě chronických poranění je proces regenerace poškozen a k hojení pokožky nedochází. Tato poranění jsou obecně dělena do čtyř kategorií, a to na tlaková, diabetická, vředy vznikající žilní a arteriální insuficiencí⁷.

Hojivý proces kožních zranění je sledem synchronizovaných událostí od hemostázy přes zánět, migraci buněk, proliferaci až po remodelaci nové tkáně⁸. Během hemostázy je vytvářena fibrinová sraženina, která zabraňuje ztrátě krve a mikrobiální kontaminaci. Zánětlivá fáze pak zahrnuje tvorbu neutrofilů, které ničí přítomné bakterie a dekontaminují poranění sekrecí proteas a antimikrobiálních peptidů. V migrační a proliferační fázi pak do místa poranění migrují fibroblasty a dochází k diferenciaci do myofibroblastů za vzniku komponentů extracelulární matrice – fibronektinu, kyseliny hyaluronové, kolagenu a proteoglykanu, které se poté podílejí na tvorbě extracelulární matrice, nových krevních cév a na epitelizaci⁹. Posledním krokem je pak přestavba tkáně, čímž jsou všechny regenerační procesy aktivované po úrazu ukončeny.

Přestože proces hojení ran je velmi komplexní, imunitní systém pacienta někdy nemusí dostatečně zareagovat na přítomnost patogenů v ráně a může dojít k infekci. Mnoha studiemi bylo zjištěno, že během procesu infekce dochází ke změnám mikrobioty přítomné v ráně. V počáteční fázi infekčního procesu jsou hlavními zúčastněnými mikroorganismy grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*, zatímco gramnegativní bakterie, zejména *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, jsou detekovány až v pozdní fázi infekcí. Fakultativně anaerobní gramnegativní bakterie napadají hlubší vrstvy kůže, kde specificky poškozuji tkáň. Velmi často se v kožních poraněních nacházejí grampozitivní koky zástupci rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus*¹⁰.

Antimikrobiální aktivita materiálů

Bakteriální kontaminace kožních ran vedoucí k zánětům mohou při nedostatečném a rychlém ošetření vést



Obr. 1: Princip působení antimikrobiálních činidel v materiálech používaných ke krytí kožních ran.

i k úmrtí pacienta. V současné době se řada výzkumných pracovišť zabývá vývojem obvazových materiálů s antimikrobiálními vlastnostmi, které mohou v praxi zabránit rozvoji nežádoucích mikroorganismů v ráně. Testuje se řada různých materiálů lišících se fyzikálními vlastnostmi, které je předurčují pro daná konkrétní využití v praxi. Materiály, které se používají pro výrobu obvazového

materiálu, musí být prodyšné. Samy o sobě nevykazují schopnost inhibovat růst mikroorganismů, plní funkci nosiče látek s prokázaným antibakteriálním účinkem (Obr. 1)¹. Skupinu těchto činidel tvoří především antibiotika, nanočástice a přírodní produkty. Přehled konkrétních aplikací vybraných materiálů i činidel je uveden v Tab. I.

Tabulka I: Přehled antimikrobiálních činidel a materiálů použitých pro účel vývoje krytí kožních ran.

Antimikrobiální látka	Materiál	Příprava materiálu	Testované mikroorganismy	Výsledky studie
Ciprofloxacin	Polyvinylpyrrolidon (nanovlákněný* kompozitní** materiál)	Zvláknění homogenního roztoku polyvinylpyrrolidonu a ciprofloxacinu	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Testováno na myších, výborné vlastnosti materiálů při hojení ran ¹¹ . (<i>in vivo</i> studie)
Gentamycin	Chitosan (nanovlákněný kompozitní materiál)	Imobilizace gentamycinu enkapsulovaného do lipozomů na povrch chitosanu	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Postupné uvolňování gentamycinu z chitosanu po dobu 24 hodin, výborné antibiotické účinky ¹³ . (<i>in vitro</i> studie)
Tetracyklin	Celulóza (kompozitní materiál)	Smáčení zvlákněné celulózy v roztoku tetracyklinu po dobu 24 h	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i>	Excelentní antibakteriální aktivita vzniklých kompozitů, vysoká biokompatibilita materiálu ¹⁶ . (<i>in vitro</i> studie)
TiO₂ nanočástice	Chitosan/ polyvinylpyrrolidon (nanokompozitní*** materiál)	Zvláknění homogenního roztoku chitosanu, polyvinylpyrrolidonu a TiO ₂	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Nanokompozit měl výborné výsledky inhibice penetrace bakterií a protizánětlivého efektu ²¹ . (<i>in vivo</i> studie)
ZnO nanočástice	Hydrogely z alginátu sodného a akáciové gummy (kompozitní materiál)	Přídavek ZnO nanočástic do roztoku alginátu a akáciové gummy	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i>	Hojivý účinek prokázán při nízkých koncentracích nanočástic na ovčích fibroblastech. Vysoké koncentrace samotných nanočástic ZnO byly toxické pro buňky, ale hydrogely významně snížily jejich toxicitu a zachovaly prospěšný antibakteriální a léčebný účinek ²² . (<i>in vitro</i> studie)
Ag nanočástice	Polykaprolakton (nanovlákněný kompozitní materiál)	Zvláknění homogenního roztoku polykaprolaktonu a Ag nanočástic	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Výborná antimikrobiální aktivita materiálu, se zvyšující se koncentrací nanočástic rostly i antibakteriální účinky ²⁹ . (<i>in vitro</i> studie)

Tabulka I: Přehled antimikrobiálních činidel a materiálů použitých pro účel vývoje krytí kožních ran (*pokračování*).

Antimikrobiální látka	Materiál	Příprava materiálu	Testované mikroorganismy	Výsledky studie
Ag nanočástice	Celulóza (nanovlákněný kompozitní materiál)	Smáčení zvlákněné celulózy v roztoku $[Ag(NH_3)_2]^+$ po dobu 24 h	<i>E. coli</i> , + <i>P. aeruginosa</i>	Membrána s Ag NPs inhibovala růst všech testovaných bakterií, samotná celulóza bez Ag NPs vliv neměla. Pro porovnání byl využit komerčně dostupný obvaz Coloplast® Ag, výsledky obou materiálů byly srovnatelné ³⁰ . (<i>in vitro</i> studie)
Ag nanočástice a hyaluronová kyselina	Chitosan (porézní kompozitní materiál)	Zmražený a následně lyofilizovaný homogenní roztok chitosanu, Ag nanočástic a kyseliny hyaluronové	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , methicillin-resistent <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>K. pneumoniae</i>	Vývoj obvazů na rány – diabetické vředy na nohou infikované bakteriemi rezistentními na běžné léky; vysoká antimikrobiální aktivita proti všem MO, vyšší koncentrace Ag NPS (0,005%, 0,01% a 0,02%) aktivní i proti MRSA ³¹ . (<i>in vitro</i> studie)
Třezalka tečkovaná	Chitosan (kompozitní materiál)	Enkapsulace oleje třezalky tečkované do chitosanu	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Antimikrobiální testy provedeny diskovou difúzní metodou, inhibice růstu MO testována při různých koncentracích oleje. Nejvyšší účinek: 0,25 % obsahu oleje v chitosanových filmech ³² . (<i>in vitro</i> studie)
Kurkumin	Polyvinylalkohol (nanokompozitní materiál)	Nanokompozit (homogenní roztok polyvinylalkoholu a kurkuminu) nanesen na bavlněné tkaniny metodou spin-coating	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. mendocina</i>	Bavlněná tkanina pokrytá nanokompozitem vykazovala vyšší absorpci vody, delší dobu schnutí a silné antibakteriální účinky ²⁷ . (<i>in vitro</i> studie)

*Nanovlákněné materiály jsou materiály s průměrem vláken do 1000 nm.

**Kompozitní materiály jsou složeny ze dvou nebo více substancí.

***Nanokompozitní materiály jsou složeny ze dvou nebo více substancí, z nichž alespoň jedna se v materiálu vyskytuje ve formě částic o velikosti jednotek až desítek nm.

Antibiotika

Objev antibiotik byl přelomem v léčbě onemocnění způsobených převážně bakteriemi. Dnes jsou známy tisíce látek s antimikrobiální aktivitou, avšak pouze malé procento z nich lze využít v běžné praxi z důvodu jejich toxicity pro některé tkáně nebo nedostatečné absorpce hostitelskými buňkami. Antibiotika používaná v humaní medicíně působí proti bakteriím na základě několika hlavních principů. β -laktamová antibiotika a glykopeptidy inhibují syntézu buněčné stěny, sulfonamidy blokuji klíčové metabolické cesty, aminoglykosidy a tetracykliny inhibují syntézu proteinů a chinolony inhibují syntézu nukleových kyselin. V případě aplikací antibiotik do materiálů pro léčbu kožních ran byly úspěšně využity mimo jiné ciprofloxacin^{11,12}, gentamicin¹³, sulfadiazin^{14,15} nebo tetracyklin¹⁶. Např. ciprofloxacin byl inkorporován do polyvinylpyrrolidonu. Účinek byl nejprve ověřen v laboratoři na bakteriích *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*, a poté proběhlo úspěšné testování *in vivo* na poraněných myších. Výsledky studie tak ukázaly potenciál výroby obvazů nové generace s antibiotiky¹¹.

Četnost léčby pomocí antibiotik se za poslední desetiletí zvýšila natolik, že si mnoho bakterií dokázalo vyvinout rezistenci k jejich účinkům. Některé bakteriální kmeny jsou tak proti jejich působení odolné a je potřeba hledat nové způsoby, jak zabránit šíření těchto rezistentních bakterií. Nadějným přístupem je využití nanočástic.

Nanočástice

Ukazuje se, že nanočástice kovů (Ag, Au) jsou vedle používaných antibiotik jejich slibnou alternativou. Vykazují baktericidní aktivitu vůči širokému spektru bakteriálních kmenů a zároveň představují nízké riziko vzniku mikrobiální rezistence. Problematika možné rezistence mikroorganismů na působení nanočástic byla poprvé studována na stříbrných nanočásticích ve studii Panáček a kol., 2017, v níž byly využity kmeny gramnegativních bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Po opakované expozici subinhibičním dávkám nanočástic skutečně došlo ke vzniku rezistence testovaných bakterií, a to bez genetických změn¹⁷. Přestože studie poukázala na možná rizika, není v současné době potřeba se tohoto problému obávat. Výsledky mohou přispět k objasnění principů vzniku bakteriální rezistence na antibiotika. Nanočástice, zejména stříbrné, jsou stále účinným nástrojem pro potlačení bakteriálního růstu.

Obecně pro nanočástice platí, že jejich baktericidní účinek je založen na schopnosti pronikat do bakteriálních struktur a narušovat funkce organismu, což poté vede k usmrcení buněk. Nanočástice oxidu zinečnatého, hořčíku, železa a dalších prvků či oxidů prvků jsou schopny narušit funkce buněčných membrán a ovlivnit tak jejich permeabilitu, narušit membránový potenciál, případně poškodit genetickou informaci.

Nejvíce prostudovanými jsou již zmíněné nanočástice stříbra. Baktericidní efekt stříbrných nanočástic je založen na některém z následujících principů. Prvním je při-

pojení nanočástic k povrchu buněčné membrány a narušení její správné funkce, tedy propustnosti a schopnosti respirace. Druhým je proniknutí nanočástic do bakterií a jejich poškození interakcí se sloučeninami obsahujícími síru a fosfor, tedy zejména s DNA. Třetím je pak uvolnění stříbrných iontů z nanočástic, které přispívají k baktericidnímu účinku nanočástic svou vazbou na proteiny a poškozením jejich funkce. Všechny tyto interakce vedou k usmrcení bakterií. Je logické, že účinek nanočástic je závislý na velikosti dávky a též bylo prokázáno, že gramnegativní bakterie jsou citlivější ve srovnání s bakteriemi grampozitivními¹⁸.

V oblasti výzkumu nanovláknenných materiálů perspektivně využitelných pro hojení kožních ran, jsou nejčastěji využívány právě stříbrné nanočástice. Na trhu je již dostupných několik výrobků na principu stříbrných nanočástic, např. Actiocat®, Aquacel Ag®, Silvasorb®, Silverlon® nebo Simpurity®¹⁹. Kromě jmenovaných přípravků se využívají i jiné, obsahující např. nanočástice oxidu železitého²⁰, oxidu titaničitého²¹ nebo oxidu zinečnatého^{22, 23}.

Přestože antibakteriální účinky nanočástic byly studovány do hloubky, o jejich možné cytotoxicitě se zatím přes snahu vědců po celém světě to samé říci nedá. U většiny studií jsou zároveň s testy na inhibici bakteriálního růstu prováděny i experimenty na cytotoxicitu pro lidské buňky, avšak toto téma stále není dostatečně prozkoumáno. Panují tedy obavy z možných rizik, která by běžné použití nanočástic v praxi mohlo pro lidské zdraví přinést. Jednou ze současných strategií, jak snížit potenciální toxicitu nanočástic a zároveň zvýšit jejich biokompatibilitu, je jejich kombinace s přírodními látkami.

Přírodní látky

Materiály obohacené o přídavek přírodních látek nebo rostlinných extraktů jsou veřejností obecně lépe přijímány než materiály s antibiotiky či nanočásticemi. Přírodní látky jsou považovány za méně rizikové a dosud nejsou relevantní informace o bakteriální rezistenci k jejich účinkům.

V některých studiích byly přírodní látky inkorporovány do struktur materiálů samostatně, v jiných společně s nanočásticemi^{29, 30, 31}. Za zmínku jistě stojí antimikrobiální aktivita medu, který je pro své zdraví prospěšné účinky používán již od nepaměti. Med je používán pro výrobu obvazů na kožní rány¹ nejen díky svým antimikrobiálním účinkům, ale i schopnosti výživy rány, odstranění nečistot z rány, minimalizaci tvorby zánětů, stimulaci angiogeneze, granulace a epitelizace^{1,24,25}. Na trhu jsou již k dispozici komerční výrobky s obsahem medu, např. MediHoney®, Activon Tulle®, Algivon® a Actilite®^{1,25}.

Kromě medu se často používají esenciální oleje extrahované z různých druhů rostlin. Jedná se o sekundární metabolity s antioxidačními, protizánětlivými, antimikrobiálními nebo protirakovinnými účinky. V souvislosti s hojením kožních ran se nejčastěji používají sloučeniny esenciálních olejů, např. thymol obsažený v silici

tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*), karvakrol obsažený v esenciálním oleji dobromysli obecné (*Origanum vulgare*), menthol a pepermint obsažené v silici máty peprné (*Mentha piperita*), cinnamaldehyd extrahovaný ze skořice (*Cinnamomum*), eukalyptový olej (*Eucalyptus*), olej z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), silice z voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*) a citronový olej (*Citrus limon*)¹.

Další látkou, jejíž vlastnosti jsou vhodné pro vývoj obvazových materiálů, je kurkumin. Jedná se poly-fenolickou sloučeninu s širokým spektrem biologických funkcí izolovanou z kořenů kurkumovníku (*Curcuma longa*). Má protirakovinné, antioxidační a protizánětlivé účinky. Jeho nízká biologická dostupnost a *in vivo* stabilita jej zároveň předurčuje být nosičem pro jiné molekuly. Mnoho studií popisuje schopnost kurkuminu snížit uvolňování zánětlivých cytokinů z monocytů a makrofágů a inhibovat enzymy podílející se na zánětlivých procesech. Antioxidační účinky kurkuminu pak chrání fibroblasty a keratinocyty proti poškozením

způsobeným peroxidem vodíku²⁶. Na základě těchto charakteristik byl kurkumin zvolen jako látka vhodná pro funkcionalizaci nanovláknenných materiálů a následně úspěšně využit v několika studiích zaměřených na vývoj materiálů pro účel hojení kožních poranění, např. z polykaprolaktonu²⁶, polyvinylalkoholu²⁷, nebo chitosanu²⁸.

Závěr

V současné době je využití nanovláknenných textilií pro účely krytí kožních ran perspektivní i díky možnosti jejich funkcionalizace pomocí různých látek s antimikrobiální aktivitou. Dříve často používaná antibiotika začínají být nahrazována nanočásticemi a přírodními látkami, případně jejich různými kombinacemi. Na trhu je již řada výrobků z biodegradabilních materiálů s prokázaným antimikrobiálním účinkem. To však nebrání tomu zkoumat další nové materiály i aktivní látky, které budou cíleny na konkrétní praktické aplikace v humaní medicíně.

Literatura

1. Simoes D, Miguel SP, Riberio MP, et al.: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127, 130–141 (2018).
2. Krchová S, Dzan L, Lukáš D, et al.: *Česká Dermatovenerologie* 4, 234–240 (2014).
3. Flanagan M.: *Journal of Wound Care* 9, 299–300 (2000).
4. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, et al.: *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1–31 (2016).
5. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, et al.: *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1–19 (2017).
6. Dhivya S, Padma VV, Santhini E: *BioMedicine* 5, 24–28 (2015).
7. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M: *Science Translational Medicine* 6, 265–271 (2014).
8. Morgado PI, Aguiar-Ricardo A, Correia IJ: *Journal of Membrane Science* 490, 139–151 (2015).
9. Thiruvoth FM, Mohapatra DP, Sivakumar D, et al.: *Plastic and Aesthetic Research* 2, 250–256 (2015).
10. Cardona AF, Wilson SE: *Clinical Infectious Diseases* 61, 69–78 (2015).
11. Contardi M, Heredia-Guerrero JA, Perotto G, et al.: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 133–144 (2017).
12. Unnithan AR, Barakat NA, Pichiah PT, et al.: *Carbohydrate Polymers* 90, 1786–1793 (2012).
13. Monteiro N, Martins M, Martins A, et al.: *Acta Biomaterialia* 18, 196–205 (2015).
14. Mohseni M, Shamloo A, Aghababaei Z, et al.: *Artificial Organs* 40, 765–773 (2016).
15. Shao W, Wu J, Wang S, et al.: *Carbohydrate Polymers* 157, 1963–1970 (2017).
16. Shao W, Liu H, Wang S, et al.: *Carbohydrate Polymers* 145, 114–120 (2016).
17. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, et al.: *Nature Nanotechnology* 13, 65–71 (2018).
18. Dos Santos CA, Seckler MM, Ingle AP, et al.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, 1931–1944 (2014).
19. Leaper DJ: *International Wound Journal* 3, 282–294 (2006).
20. Cai N, Li C, Han C, et al.: *Applied Surface Science* 369, 492–500 (2016).
21. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta P: *Carbohydrate Polymers* 95, 530–539 (2013).
22. Raguvaran R, Manuja BK, Chopra M, et al.: *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 185–191 (2017).
23. Khalid A, Khan R, Ul-Islam M, et al.: *Carbohydrate Polymers* 164, 214–221 (2017).
24. Packer JM, Irish J, Herbert BR, et al.: *International Journal of Antimicrobial Agents* 40, 43–50 (2012).
25. Scagnelli AM: *Journal of Exotic Pet Medicine* 25, 168–171 (2016).
26. Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, et al.: *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 36, 1149–1156 (2009).
27. Venkatasubbu GD, Anusuya T: *International Journal of Biological Macromolecules* 98, 366–378 (2017).
28. Tsekova PB, Spasova MG, Manolova NE, et al.: *Materials Science and Engineering* 73, 206–214 (2017).
29. Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S: *Applied Nanoscience* 6, 337–344 (2016).
30. Wu J, Zheng Y, Song W, et al.: *Carbohydrate Polymers* 102, 762–771 (2014).
31. Anisha B, Biswas R, Chennazhi K, Jayakumar R: *International Journal of Biological Macromolecules* 62, 310–320 (2013).
32. Günes S, Tihminlioglu FT: *International Journal of Biological Macromolecules* 102, 933–943 (2017).

Souhrn

Lencová S., Zdeňková K., Stiborová H., Demnerová K.: Využití antimikrobiálních nanovláknenných materiálů při léčbě kožních poranění

K úspěšné léčbě kožních poranění a infekcí je potřeba hledat účinné obvazové materiály, které by představovaly nejen spolehlivou bariéru mezi ránou a vnějším prostředím, ale zároveň byly obohaceny o antimikrobiální látky chránící ránu před patogenními mikroorganismy. V současné době jsou za tímto účelem testovány různé druhy nanomateriálů obohacené o antibiotika, nanočástice nebo přírodní látky. V této práci jsou shrnuty aktuální aplikace těchto materiálů a antimikrobiálních činidel využívaných pro vývoj obvazových materiálů.

Klíčová slova: Nanovláknenné textilie, antimikrobiální látky, tkáňové inženýrství, hojení kožních ran

Summary

Lencová S., Zdeňková K., Stiborová H., Demnerová K.: Use of antimicrobial nanofibrous materials in the treatment of skin injuries

For a successful treatment of skin injuries and infections, it is necessary to look for effective dressing materials that would not only represent a reliable barrier between the wound and the external environment, but also should be enriched with antimicrobial agents to protect the wound from pathogenic microorganisms. Different types of nanomaterials enriched with antibiotics, nanoparticles or natural substances are currently being tested for this purpose. This paper summarizes the current applications of the materials and antimicrobial agents used for the development of dressing materials.

Keywords: Nanofibrous fabrics, antimicrobial substances, tissue engineering, skin wound healing

O B S A H

Úvodem	1
Vrublevskaya M.: Možnost využití vinařského odpadu jako zdroje polyfenolových sloučenin	2
Zavřel M.: Ulcerózní kolitida – současné poznání	7
Landová B., Bouřa E.: Oprava poškozené DNA pomocí NEIL3 glykosylasy	14
Knoblochová L., Šolc P.: Biosenzory pro monitorování buněčného cyklu v živých buňkách	16
Bulvas O., Pichová I.: Alarmon (p)ppGpp: Klíčová signální molekula regulující stresovou obranu bakterií	21
Lencová S., Zdeňková K., Stiborová H., Demnerová K.: Využití antimikrobiálních nanovláknenných materiálů při léčbě kožních poranění	26

C O N T E N T

Editorial	1
Vrublevskaya M.: Possibilities of reuse of winemaking industry waste as possible source of polyphenolic substances	2
Zavřel M.: Ulcerative colitis – current understanding	7
Landová B., Bouřa E.: DNA damage repair by NEIL3 glycosylase	14
Knoblochová L., Šolc P.: Biosensors for monitoring the cell cycle in live cells	16
Bulvas O., Pichová I.: Alarmon (p)ppGpp: Key signal molecule regulating stress response in bacteria	21
Lencová S., Zdeňková K., Stiborová H., Demnerová K.: Use of antimicrobial nanofibrous materials in the treatment of skin injuries	26

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers. In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).