

B I PROSPECT

Sedmnáctý ročník
Číslo 2/2007

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

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

**a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

RNDr. Tomislav Barth, DrSc.
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
(Editor)

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

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

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

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

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

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

B I P R O S P E C T

17th Volume
No. 2/2007

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the 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 and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive 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 cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

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

For more information contact the editorial board or directly:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

předpokládáme, že Vás druhé číslo našeho letošního „Bioprospectu“ zastihne právě před dovolenými, takže tentokrát budete mít čas si v klidu přečíst všechny články. Snažili jsme se Vám připravit pestrou paletu zajímavých témat, která se Vám budou určitě líbit a možná Vás budou inspirovat k napsání něčeho zajímavého nebo alespoň nás vyzvete ke zpracování tématu, které by Vás zajímalo. V tomto čísle si všímáme biologických palivových článků, nahlédneme do problematiky tvorby biofilmů a nezapomeneme ani na bioremediační tematiku, tentokrát na možnosti odstraňování anilinu z odpadních vod. Již tradičně nesmí chybět téma z oblasti medicíny, které věnujeme mozkovým nádorům a možnosti jejich léčby.

*Rád bych Vám připoměl, že důležité akce uvádíme v rubrice „aktuálně“ na našich webových stránkách <http://bts.vscht.cz>. Ze zahraničních akcí je stále aktuální **13. Evropský biotechnologický kongres**, který organizuje EFB ve dnech 17. – 19. září 2007 v Barceloně. Bližší informace naleznete na webových stránkách <http://www.ecb13.eu>. Blíží se také **13. International Biotechnology Symposium – IBS 2008**, sponzorované IUPACem, které se bude konat ve dnech **12. – 17. října 2008 v Dalianu**, Čínská lidová republika. Druhý cirkulář byl zveřejněn 1. června 2007 a **abstrakta mají být zaslána do 30. listopadu 2007**. Dále si Vás dovoluujeme pozvat na již **4th Swiss-Czech Symposium, které se bude konat 22. – 23. 5. 2008 ve Wadenswill** (u Curychu). Hlavním tématem symposia bude „Biopharmaceuticals: why from yeast“, ale symposium je otevřeno i pro další témata. Zveme k účasti jak jednotlivce, tak především české biotechnologické firmy. Po dalších dvou letech (2010) počítáme s 5. česko-švýcarským symposiem v České repub-*

lice. V příštím čísle Bioprospectu Vám přineseme podrobnější informace.

*16. 5. 2007 proběhl na VŠCHT, ve spolupráci s FPBT VŠCHT a Ministerstvem životního prostředí, **seminář o geneticky modifikovaných organismech zaměřený především na nezemědělské aplikace**. Součástí semináře byla i prezentace biotechnologického portálu www.gate2biotech.cz. Počítáme, že přibližně ve stejnou dobu v příštím roce zorganizujeme další seminář týkající se GMO. Semináře o zemědělské tematice GMO bude nadále organizovat Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou a my Vás budeme i o těchto akcích včas informovat.*

S potěšením Vám oznamujeme, že Jihomoravské inovační centrum (JIC) se sídlem v Brně vydalo začátkem minulého měsíce Czech Biotech Report 2007, tentokrát jako CD-ROM. Toto CD se již nebude komerčně prodávat, ale bude volně šířeno tak, aby posloužilo k propagaci české biotechnologie. Na adrese <http://www.enviweb.cz/cbr2007.zip> je možné si stáhnout první verzi CD. V současné době se pracuje na získání feedbacku na tuto první verzi. Získané připomínky se po vyhodnocení zapracují do finální verze CD. Pracovníci JIC mají zájem zejména o připomínky ke grafickému zpracování, přehlednosti a funkčnosti zprávy.

Závěrem Vám všem přeji příjemné prožití letních dnů, hezké dovolené a těším se na další spolupráci s Vámi,

Váš
Jan Káš

BIOLOGICKÉ PALIVOVÉ ČLÁNKY

Šimon Bednář

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

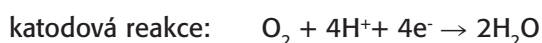
Palivový článek můžeme definovat jako elektrochemické zařízení uskutečňující přímou přeměnu chemické energie na stejnosměrný elektrický proud. Tato přeměna se děje katalytickými reakcemi na elektrodách. Svou činností se podobá galvanickým článkům, na rozdíl od nich však vyvíjí elektrickou energii nepřetržitě díky plynulému přísunu paliva k anodě a okysličovacímu ke katodě.

Oproti současným způsobům výroby elektrické energie mají palivové články řadu výhod, zejména vyšší účinnost a ekologičnost celého procesu. Při využívání fosilních paliv se zpravidla provádí jejich spalování, vzniklé teplo je potom konvertováno na mechanickou nebo elektrickou energii. Tento nepřímý postup výroby elektřiny je provázen řadou ztrát a má tedy nízkou účinnost. Navíc značně zatěžuje životní prostředí tvorbou škodlivých emisí a skleníkových plynů.

Vodíkový palivový článek

Palivem do nejběžnějších palivových článků může být vodík v kapalném nebo plynném stavu, nebo mohou být používána nepřímá, vodík obsahující paliva, jako uhlovodíky (methan) nebo alkoholy (methanol, ethanol), ze kterých se vodík uvolňuje reformovacím procesem. Finálním produktem palivového článku je voda, v případě využití uhlíkatých zdrojů vzniká navíc CO_2 .

Nejvíce využívané jsou palivové články na bázi membrány propouštějící pouze kladně nabitě ionty tzv. PEMFC („Proton Exchange Membrane Fuel Cell“), která je schopna práce i za nízkých teplot (kolem $80\text{ }^\circ\text{C}$). V takovém článku je vodík plynule přiváděn na platínovou elektrodu – anodu, která katalyzuje jeho rozklad na protony a volné elektrony. Protony difundují membránou ke katodě, zatímco elektrony přecházejí do elektrického obvodu, kde konají práci. Na katodě (kladné elektrodě) reagují kyslíkové molekuly s vodíkovými protony za účasti elektronů z vnějšího elektrického obvodu. Jako odpadní produkt celé reakce se tedy uvolňuje voda:



Typický vodíkový palivový článek produkuje napětí menší než 1 volt, pro jejich účinné využití ve většině elektrických spotřebičů je tedy nutné jejich sériové zapojení.

Jakkoli je ale produkce energie ve vodíkovém článku ekologická, vzhledem k tomu, že plynný vodík nemá na zemi své přirozené zásoby, může sloužit pouze jako přenašeč energie, ne jako její zdroj. K výrobě velmi čistého vodíku se používá elektrolyza, v některých typech článků ale může sloužit i vodík získaný rafinačními procesy ze zemního plynu, uhlí nebo biomasy.

Takový způsob výroby energie je nejen ekologičtější, ale také nesrovnatelně účinnější. V tepelných elektrárnách se energie získává spalováním uhlí v kotli, vzniklé teplo je poté využito k ohřevu vody. Horká pára roztáčí turbínu a ta zase generátor sloužící k výrobě elektrické energie. Když pára odevzdá využitelnou energii, kondenzuje v kondenzátoru a vrací se zpět do kotle. Při využití tzv. „Clean Coal Technology“ se uhlí nejprve zplyní na syntetický plyn, jehož hlavními složkami jsou vodík a oxid uhelnatý. Vodík se z plynu oddělí a přivádí do palivových článků, v nichž spalováním s kyslíkem vzniká elektrický proud a vodní pára.

Biologické palivové články

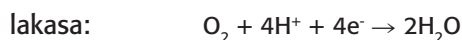
Speciální typ palivových článků představují články, které využívají enzymy nebo celé mikroorganismy místo anorganického katalyzátoru. Poskytovaný výkon je sice nižší, výzkum se ale v současnosti soustředí spíše na jejich využití pro některé speciální aplikace jako jsou biosenzory, medicínské implantáty, mikročipy a další¹. Můžeme si představit třeba kardiostimulátor, který by nepotřeboval žádný vnější zdroj energie, protože by ho poháněl článek napájený glukosou přítomnou v krevním řečišti.

Biokatalyzátory v takovém článku mohou mít dvojitou úlohu. U primárních článků je enzym či mikroorganismus katalyzátorem redoxní reakce a podílí se tak přímo na tvorbě elektřiny. V sekundárních člancích generují biokatalyzátory ze složitějších substrátů jednoduché sloučeniny jako je vodík či metan. Tyto molekuly jsou potom oxidovány prostřednictvím anorganické katalýzy na povrchu elektrod.

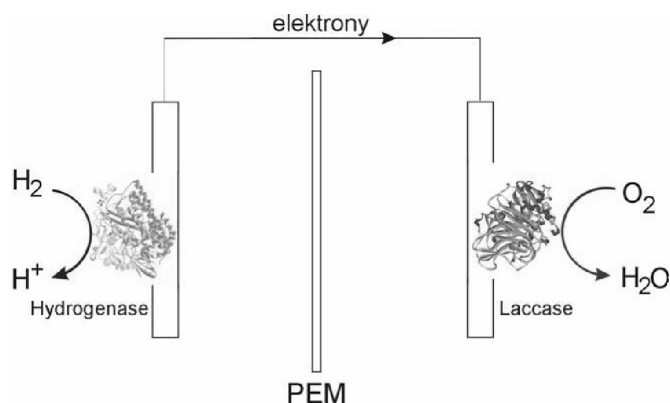
Enzymatické články

Palivové články oxidující vodík zpravidla využívají vysoce účinné platinové elektrody. Tento kov je ale relativně vzácný, a proto také velmi drahý. Navíc nečistoty, zejména oxid uhelnatý, které bývají běžně přítomny ve vodíkovém palivu, mohou způsobit její ireversibilní inaktivaci. Snahou vědců proto bylo nahradit platinovou elektrodu jiným katalyzátorem. Srovnatelnou účinnost přitom poskytl enzym hydrogenasa, který má v katalytickém místě atomy niklu nebo železa. Byly proto sestaveny enzymatické články obsahující imobi-

lizovanou hydrogenasu na anodě a lakasu na katodě². Přitom hydrogenasa katalyzovala oxidaci vodíku a odezdávala elektrony přímo na elektrodu, zatímco lakasa katalyzovala čtyřelektronovou redukci kyslíku:



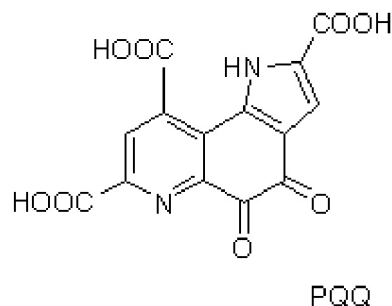
Přímý přenos elektronů mezi enzymem a povrchem elektrody („Direct Electron Transfer“, DET) byl pozorován pouze u nemnoha dalších proteinů (cytochrom c, některé peroxidasy). Často se proto při konstrukci enzymatických článků používají různé mediátory, fungující jako elektronové transportéry mezi enzymem a elektrodou. I když představují další krok v redoxním řetězci přenášejícím elektrony z molekuly paliva na elektrodu, zpravidla značně zvyšují efektivitu celého procesu³. Většina používaných mediátorů je však dosti drahá a toxická.



Obr. 1. Schéma enzymatického článku s přímým přenosem elektronů

Například pro enzymatickou oxidaci glukosy byl použit N-dimethyl-7-amino-1,2-benzophenoxaziniový kation (MB⁺)⁴. V takovém článku na anodě immobilizovaná glukosaoxidasa katalyzuje přeměnu glukosy na glukonovou kyselinu za současné redukce své flavinové prostetické skupiny (FAD). Ta je reoxidována elektronovým mediátorem a vzniklý MBH₂ předává elektrony na elektrodu za současného uvolnění vodíkových protonů.

Jinou strategii při řešení stejného problému představuje navázání glukosaoxidasy na pyrolochinolinchinon (PQQ, Obr.2) kovalentně vázaný na povrch zlaté elektrody modifikované cystaminem.⁵ Na druhé elektrodě může být immobilizována lakasa přenášející elektrony na kyslík, mikroperoxidasa redukující peroxid vodíku nebo cytochrom-c v kombinaci s cytochrom-c-oxidasou. Byl sestaven i podobný článek využívající laktát jako redukční činidlo. Na anodu modifikovanou PQQ-NAD⁺ byla přitom nejdříve pomocí bioafinitních interakcí navázána laktátdehydrogenasa (LDH), a potom prokřížena pomocí glutaraldehydu⁶.



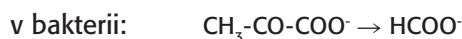
Obr. 2. Chemický vzorec PQQ

Životnost biologických palivových článků je limitována řadou faktorů. Asi nejdůležitějším z nich je stabilita vázaného enzymu. Většina zkonstruovaných enzymatických článků totiž vydržela pracovat pouze několik dní. Významným faktorem, který může zvýšit celkovou stabilitu enzymu, je způsob immobilizace. Nejjednodušším způsobem je fyzikální adsorpce na vodivé částice jako je grafitový prášek nebo uhlíková čern. Další možností je zachycení biokatalyzátoru v polymerní matici nebo kovalentní vazba enzymu na modifikovanou elektrodu. Při pokusech se zachycením hydrogenasy do Nafionové membrány modifikované tetrabutylammoniumbromidem dosáhla životnost článku 45 dní. Přitom polčas inaktivace hydrogenasy ve vodném roztoku byl pouhých 7-8 hodin⁷.

Mikrobiální palivové články

Využití celých mikroorganismů v palivovém článku má oproti samotným proteinům řadu výhod. Nemusí se izolovat potřebný enzym a odpadá i nutnost zachovávat prostředí, ve kterém má optimální aktivitu a stabilitu. Mikroorganismy se často využívají v sekundárních článcích, kde produkují sloučeniny, které jsou následně oxidovány na anodě. Vzhledem k tomu je možné fyzicky oddělit vlastní bioreaktor od elektrodového prostoru a udržovat tak v každé části odlišné podmínky. Typickým příkladem takového článku je bioreaktor produkující plynný vodík spojený s PEMFC.

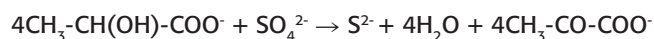
Články, ve kterých není bioreaktor oddělený od elektrodového prostoru, jsou limitovány podmínkami nutnými pro život mikroorganismů. Zpravidla se využívá fermentačního metabolismu bakterií rodu *Clostridium*, které produkují velké množství plynného vodíku. V takovém článku byly bakterie zachyceny v polyakrylamidové matici obalující elektrodu, takže generovaný vodík mohl být ihned oxidován. Další výhodou takového uspořádání je možnost využití i dalších produktů fermentačního metabolismu jako sekundárního paliva. Například pyruvát může být alternativně oxidován pyruvát-formiátlyasou na formiát, který se dále rozkládá na anodě:



Kromě plynného vodíku je možné využít k elektrodové reakci také redukováné senné sloučeniny jako je sul-

fidový nebo siřičitanový anion. Tyto sloučeniny jsou charakteristickým produktem anaerobního metabolismu bakterií rodu *Desulfovibrio*, které žijí v prostředí bohatém na organické sloučeniny a využívají síru jako konečného akceptoru elektronů. V experimentálním článku byly použity bakterie rodu *Desulfovibrio desulfuricans*, které oxidovaly laktát a produkovaly přitom sulfan pro oxidaci na anodě, zatímco na katodě se redukoval kyslík⁸.

Reakce katalyzovaná *Desulfovibrio desulfuricans*:

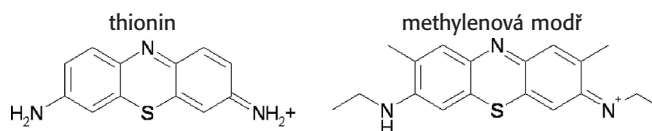


anodová reakce: $\text{S}^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$ nebo



katodová reakce: $\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

Tyto bakterie jsou schopny využívat jako zdroj energie i jiné na sacharidy bohaté substráty. Ve člancích, kde získání energie nebylo primárním cílem, sloužila jako substrát dokonce i odpadní voda.



Obr. 3 Příklady elektronových mediátorů

Odlíšným přístupem při konstrukci mikrobiálního palivového článku představuje použití elektronových mediátorů schopných přenášet elektrony z mikroorganismu na elektrodu. Bylo vyzkoušeno mnoho organických i organokovových sloučenin, které by mohly slou-

žit jako elektronové přenašeče (Obr.3). Tyto látky by přitom neměly být mikrobiálně odbouratelné, měly by snadno pronikat buněčnou membránou a zároveň by neměly být pro buňku toxické.

Podstatou funkce elektronových mediátorů je schopnost proniknout do plasmatické membrány a vázat zde elektrony z dýchacího řetězce. V redukované formě jsou poté uvolněny do média a reoxidovány na anodě. Současně se do prostředí uvolňují vodíkové protony, které difundují přes PEM do katodového prostoru, kde společně s elektrony a kyslíkem vytvářejí molekuly vody⁹. Jednou z podmínek úspěchu tohoto typu článku je eliminace kyslíku v anodovém prostoru. Kyslík je totiž zpravidla schopen reagovat s redukovanou formou mediátoru a snižovat tak účinnost procesu.

Novějším přístupem je využití bakterií z čeledi *Geobacteraceae*, které žijí v oblastech anoxických mořských sedimentů. Bylo prokázáno, že bakterie druhu *Geobacter* mohou oxidovat organické sloučeniny s využitím elektrody jako pevného akceptoru elektronů. Jsou tedy schopny realizovat přímý přenos elektronů na elektrodu bez použití často drahého a toxického mediátoru. Kromě nižší ceny zefektivňuje tento přístup celý proces a zvyšuje životnost článku^{10,11}.

Závěr

Souhrnem lze říci, že biologické palivové články představují perspektivní, životní prostředí nezatěžující biotechnologii. Jejich vysoká účinnost, ekologický provoz i schopnost využívat odpadních produktů průmyslu je zvýhodňuje oproti současným způsobům výroby elektrické energie. I když mají oproti článkům založeným na anorganických katalyzátorech nižší výkon, pro řadu aplikací bez vysokých energetických nároků budou ideálním řešením.

Literatura

1. Kim J., Hongfei J., Wang P.: *Biotechnol. Adv.* **24**, 296, (2006).
2. Varfolomeev S. D., Kurochkin I. N., Yaropolov A.I.: *Biosens. Bioelectron.* **11**, 863, (1996).
3. Park D.H., Kim S.K., Shin I.H., Jeong Y.J.: *Biotechnol. Letters* **22**, 1301, (2000).
4. Persson B., Gorton L., et al.: *Enzyme Microbiol. Technol.* **7**, 549 (1985).
5. Willner I., Katz E., Patolsky F., Bückmann A.F.: *J. Chem. Soc.* **2**, 1817 (1998).
6. Katz E., Bardea A., Willner I., et al.: *Biosens. Bioelectron.* **13**, 741 (1998).
7. Akers N.L., Moore C.M., Minteer S.D.: *Electrochim. Acta* **50**, 2521 (2005).
8. Habermann W., Pommer E.H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 128 (1991).
9. Allen R.M., Bennetto H.P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 27 (1993).
10. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R.: *Science* **295**, 483 (2002).
11. Bond D.R., Lovley D.R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 1548 (2003).

METODY ODSTRAŇOVÁNÍ ANILINU Z ODPADNÍCH VOD

Jitka Hrdinová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Anilin je široce rozšířený polutant životního prostředí. Kvůli jeho toxicitě, persistenci a hojně aplikaci jako součásti nejrůznějších materiálů a chemikálií je považován za vzrůstající hrozbu jak pro životní prostředí tak pro lidské zdraví. V ČR je vyráběn redukcí nitrobenzenu vodíkem (*BorsodChem MCHZ s.r.o. Ostrava*). Výrobní blok je tvořen technologicky navazujícími výrobami vodíku, koncentrované kyseliny dusičné, nitrobenzenu a anilinu. Většina anilinu je exportována mimo ČR, na tuzemském trhu se spotřebovává pouze asi 1 % z celkové produkce¹. Je používán v gumárenském průmyslu při výrobě syntetického kaučuku a gumy a jako součást urychlovačů vulkanizace (difenylguanidinu a cyklohexylaminu – *LZ Draslovka a.s. Kolín*), v chemickém průmyslu k výrobě herbicidů, fungicidů, zvířecích repelentů, defoliantů, jako součást vývojek při vyvolávání černobílé fotografie² a také ve farmaceutickém průmyslu k výrobě antipyrinu, antifebrinu a acetanilidu (antipyretikum, analgetikum)¹. Je také vstupní surovinou pro výrobu organických látek – barviv^{1,3} (4 typy barviv: azo-, trifenylmethanová, antrachinonová a safraniny) a polotovarů (*Aliachem a.s. o.z. Synthesia Pardubice, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, a.s. Ústí nad Labem*)¹. Kontaminace, zvláště vodních ekosystémů, je možná odpadními vodami právě z těchto provozů.

V posledních letech se neustále zvyšuje zájem státních orgánů o problematiku kontaminace anilinem a jeho odstraňování ze životního prostředí, především z vodních toků. Anilin však dosud není součástí seznamů nebezpečných nebo prioritních látek pro vodní prostředí. Hlavním legislativním nástrojem v ČR upravujícím zastoupení anilinu ve vodním prostředí je nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, které stanovuje imisní standardy pro obsah anilinu v povrchových vodách³. Existuje mnoho programů a opatření týkajících se snížení množství anilinu a dalších polutantů ve vodách. Zde jsou uvedeny jen některé z nich: *Legislativní opatření – Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách, v platném znění*, *Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění vod*⁴, *Mezinárodní spolupráce v oblasti ochrany vod – Mezinárodní komise pro ochranu Labe (MKOL)*, *Národní program čistší produkce a Program Responsible Care*³.

Metody odstranění anilinu z vodního prostředí

Rozpuštěný anilin se silně adsorbuje na organickou hmotu, která modifikuje jeho rozpustnost a pohyblivost v podzemní vodě. Anilin adsorbovaný na huminové

materiály je náchylnější k oxidaci. Produkty jsou např. azobenzen, azoxybenzen, acetanilid a další. Na udržení anilinu na půdních částicích se podílí kapilární tlak, Londonovy disperzní síly, výměna iontů atd. Anilin vázaný nekovalentními vazbami může prosakovat do podzemní vody nebo tvořit kovalentní vazby mezi sebou různými kondenzačními a oxidačními reakcemi nebo reakcemi s půdními částicemi. Další reakce mohou vést k tvorbě nehydrolyzovatelných vazeb⁵. Znalost mechanismů těchto interakcí je důležitá pro vývoj funkčních remediačních procesů.

Pro odstranění organických polutantů včetně anilinu byla vyvinuta celá řada fyzikálních, chemických a biologických technologií. Avšak všechny tyto technologie jsou limitovány efektivitou, aplikovatelností, ale především náklady. Proto je snaha vyvíjet další nové a efektivnější postupy k odstranění těchto nežádoucích látek⁶.

a) fyzikální a chemické metody

Atraktivní způsob čištění odpadních vod, které obsahují pevné nebo kapalné látky, nabízí elektrochemické metody. Jednou z nich je destrukce anilinu elektrochemickou oxidací na mediátoru z Ce^{4+} nebo Co^{3+} , kde je anilin přeměněn až na CO_2 . Tato metoda se nazývá „zprostředkovaná elektrochemická oxidace“ (MED). Během tohoto procesu se organické látky oxidují a katalyzátor (mediátor) se redukuje. Jeho reoxidace probíhá na anodě. Při oxidaci anilinu může docházet k polymeračním reakcím, při nichž se tvoří velmi stabilní polymer polyanilin. Proto bývá kompletní přeměna anilinu na CO_2 složitější. K tomuto jevu může docházet např. při oxidaci na PbO_2 elektrodě, to se pak vnáší do životního prostředí jiné polutanty. K efektivnější oxidaci anilinu se používají mediátory (redoxní páry Ce^{4+}/Ce^{3+} nebo Co^{3+}/Co^{2+} s poměrně vysokým redoxním potenciálem). Zprostředkovaná oxidace anilinu probíhá ve více krocích v elektrodovém systému Pt a RuO_2 -Ti, všechny vznikající intermediáty musí mít nižší oxidační potenciál než mediátorové redoxní páry⁷. Jako další metodu lze zmínit degradaci anilinu pomocí ultrazvuku. Degradace probíhá v roztoku nasyceném kyslíkem. Ultrazvuk způsobuje velmi rychlou degradaci chemických kontaminantů ve vodném prostředí. Chemický efekt ultrazvuku je způsoben akustickou kavitací, tj. tvorba, růst a implozivní prasknutí bublin v kapalině. Praskání bublin vyvolá lokálně zvýšení teploty, tlaku a elektrického náboje, při čemž se vytváří vysoké rychlosti zahřívání a chlazení. Vodní pára a kyslík prodělávají termální disociaci na radikály $H\cdot$, $HO\cdot$ a $HOO\cdot$. Účinnost degradace kontaminantů ve vodě je zvýšena při vyšších frekvencích. Rychlost degradace je spojena s fyzikálními a chemickými vlastnostmi cílové mole-

kuly. U látek s ionizovatelnou funkční skupinou hraje velkou roli hodnota pH. Nejlepších výsledků při degradaci anilinu je dosahováno v alkalické oblasti⁸. Při jeho odstraňování z odpadní vody je také možné použít fotokatalytických a fotochemických metod, kdy dochází k rychlému odstranění anilinu, ale na jeho úplnou mineralizaci je třeba delší doba. Oxidace anilinu zde probíhá působením hydroxylových radikálů v přítomnosti záření a vhodných chemických činidel (H_2O_2 , Fentonovo činidlo – $FeSO_4/H_2O_2$, ozón). Rychlostní konstanta oxidace hydroxylovými radikály je 10⁹krát vyšší než u běžných oxidací. Fotokatalýza může být také ekonomický proces pro transformaci komplexních organických molekul na jednodušší, netoxické a pro životní prostředí neškodné látky, ideálně na CO_2 a H_2O , použitím vhodného záření. Tato metoda využívá sluneční záření a je velmi slibná pro nejrůznější aplikace, kde je použití běžných metod obtížné nebo kde je nejdůležitější jednoduchost. Fotokatalytická reakce zde probíhá na povrchu TiO_2 , který má zde funkci katalyzátoru, a působením slunečního záření. Fotochemická reakce probíhala v přítomnosti H_2O_2 a slunečního záření a byla o 50 % méně účinná než fotochemická⁹.

b) biologické metody

V poslední době jsou stále více uplatňovány bioremediační technologie, jelikož jsou levnější a šetrnější k životnímu prostředí¹⁰. Kovalentně vázaný anilin na matici je štěpen aerobně i anaerobně velmi pomalu, pokud je vůbec degradován. Nejslibnější při procesu remediace se zdá být také použití původních methanogenních mikroorganismů, které jsou schopny pomalu uvolňovat anilin vázaný na půdní částice. Degradace může být urychlena změnou pH půdy z kyselého na neutrální. Při neutralizaci půdy byla pozorována zvýšená produkce volného anilinu a methanu⁵. Rovněž se zkoumá možnost fytoremediace anilinu¹¹.

Tab. 1 Přehled mikroorganismů degradujících anilin

Mikroorganismus	Buněčný typ	Biodegradace
<i>Pseudomonas sp</i> AK20 ¹⁸	bakterie	aerobní
<i>Pseudomonas putida</i> ^{10,17}	bakterie	aerobní
<i>Brevundimonas diminuta</i> INMI KS-7 ¹⁷	bakterie	aerobní
<i>Delftia acidovorans</i> CA28 ^{10,17,19}	bakterie	aerobní
<i>Comamonas testosteroni</i> I2 ¹⁷	bakterie	aerobní
<i>Aquaspirillum sp.</i> 2C ¹⁷	bakterie	aerobní
<i>Paracoccus denitrificans</i> 3CA ¹⁷	bakterie	aerobní
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ²⁰	bakterie	aerobní
<i>Acinetobacter sp.</i> YAA ²¹	bakterie	aerobní
<i>Moraxella sp.</i> G ²²	bakterie	aerobní
<i>Thauera aromatica</i> ¹⁶	bakterie	anaerobní
<i>Desulfobacterium anilini</i> ²³	bakterie	anaerobní
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> ¹⁶	bakterie	anaerobní
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 ²⁴	plíseň	aerobní
<i>Fusarium sp.</i> ²⁴	plíseň	aerobní
<i>Rhizopus sp.</i> ²⁴	plíseň	aerobní

Mechanismus biodegradace anilinu

Rozklad organických látek může probíhat za nepřítomnosti nebo přítomnosti molekulárního kyslíku¹². Biodegradace anilinu se účastní především bakteriální kmeny díky jejich širokému metabolickému vybavení. Byly však nalezeny i některé druhy nižších hub. Zástupci anilin-degradujících mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 1.

Aerobní metabolismus

Aromatické substituované látky mají mírně zvýšenou rezistenci k biodegradaci. To je způsobeno zavedením skupiny (většinou elektronegativní) do aromatického jádra, která snižuje reaktivitu rezonančních struktur s kyslíkem a zabraňuje aktivaci nebo rozrušení uhlovodíkového kruhu (tj. počátečních kroků biodegradace aromátů). Aerobní bakterie destabilizují tento systém pomocí reakce katalyzované dioxygenasou. Vznikají tak kruhy se 2 hydroxylovými skupinami v poloze *ortho*- nebo *para*-. Metabolismus odbourávání aromatických látek může dále probíhat dvěma cestami – podle vznikajících intermediátů hovoříme o katecholovém rozkladu nebo rozkladu přes kyselinu gentisovou¹³.

Biodegradace anilinu probíhá převážně katecholovou dráhou, minoritně reversibilní acylací na acetanilid a formanilid nebo oxidací dusíku vedoucí v menším množství oligomerních kondenzačních produktů. Kromě biodegradace se na odstranění anilinu z vodného prostředí podílejí fyzikální procesy jako autooxidace, fotooxidace a další chemické reakce¹³.

Tvorba katecholu probíhá přes *cis*-dihydrodiol, který vzniká působením NADH-dioxygenasy (tento enzym byl např. popsán u *Pseudomonas putida*)^{10,17}. Ten je okamžitě oxidován na katechol za současného vzniku molekuly NADH. Vznikající katecholy jsou štěpeny v poloze *ortho*-, *meta*- nebo *para*- na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové nebo na kyselinu 2-hydroxymukonovou. Tato reakce je katalyzována dioxyge-

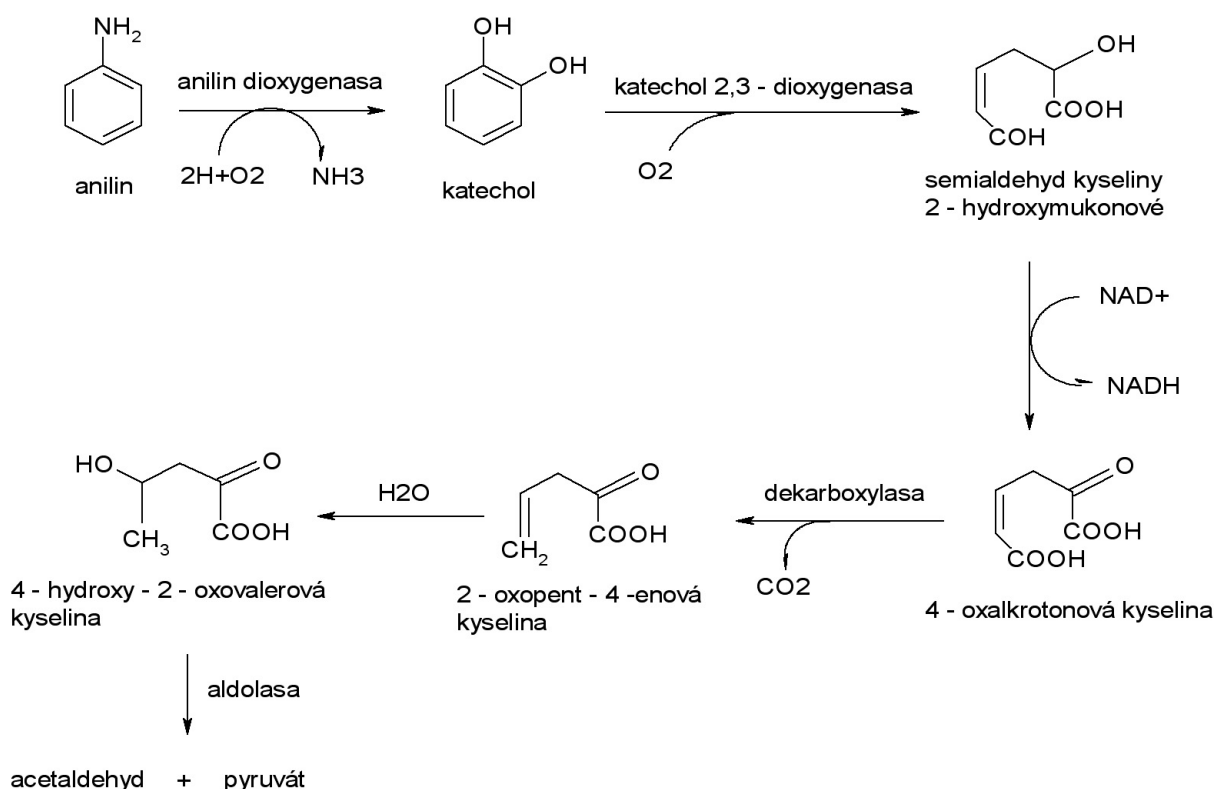
nasou a dochází při ní k navázání jedné molekuly kyslíku. Štěpy vzniklé z aromatických kruhů jsou dále metabolizovány až na intermediáty citrátového cyklu^{14,15}. Na obr. 1 je znázorněna metabolická dráha bakterie *Delftia sp.*AN3, která je extrémně tolerantní k vysokým koncentracím anilinu.

Anaerobní degradace

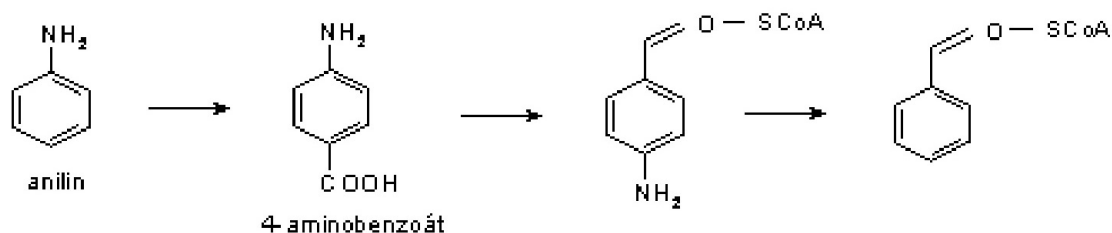
Některé mikroorganismy dokáží degradovat aromatické látky až na oxid uhličitý bez přítomnosti kyslíku. Anaerobní štěpení kruhu poprvé popsal W. C. Evans v roce 1977 (cit.¹⁶). Zahrnuje reakční mechanismy karboxylace, reduktivní dehydroxylace, adice a další. Mnoho denitrifikačních druhů, které rostou anaerobně na aromatických látkách, jsou schopny je využít i aerobně. Klíčovým enzymem anaerobní degradace je benzoyl-CoA reduktasa, o které se předpokládá, že je konstitutivním enzymem. Naopak enzymy periferních drah (např. dráhy pro degradaci anilinu, fenolů aj.) se syntetizují, až po dodání konkrétní látky (indukovatelné enzymy). Obvykle jsou aromatické sloučeniny využívány až tehdy, není-li přítomna už žádná utilizovatelná nearomatická látka (katabolická represe).

Byly popsány dvě dráhy k odbourávání aromatického jádra za anaerobních podmínek. Jedna vede přes resorcinol nebo fluoroglucinol na AcCoA (aromatické sloučeniny s více OH-skupinami) a druhá přes benzoyl-CoA na AcCoA (*p*-kresol, anilin, benzylalkohol aj.).

Biodegradace anilinu u denitrifikačních a sulfátredukcujících bakterií začíná karboxylací (aktivace vznikem thioesteru AcCoA) aromatického jádra. Rozklad anilinu probíhá dále přes 4-aminobenzoát až na benzoyl-CoA, který je klíčovým intermediem této metabolické dráhy (obr. 2). Ten je redukován na cyklohex-1,5-dien-1-karboxyl-CoA, který podléhá oxidaci v dráze analogické β -oxidaci mastných kyselin. Konečnými produkty jsou 3 molekuly AcCoA a 1 molekula CO₂ (obr. 3). AcCoA je většinou oxidován v citrátovém cyklu. Některé studované bakterie rostoucí anaerobně na aromatických substrátech obsahují NADP-specifickou 2-oxoglutarát dehydrogenasu. U těchto bakterií probíhá asimilace AcCoA přes glyoxylátový cyklus. Ovšem existují i výjimky (striktně anaerobní mikroorganismy), které využívají jiné způsoby asimilace AcCoA, např. oxidace AcCoA/uhlík monoxid-dehydrogenasovou cestou nebo redukcí na pyruvát¹⁶.



Obr. 1. Předpokládaná degradační dráha anilinu pomocí *Delftia sp.*AN3 – meta-dráha¹⁰



Obr. 2. Přeměna anilinu na klíčový intermediát benzoyl-CoA¹⁶

ROD *PSEUDOMONAS*: ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA, TVORBA BIOFILMU

Tereza Hudcová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Zástupci rodu *Pseudomonas* patří mezi všudypřítomné mikroorganismy, které můžeme v přírodě nalézt ve třech základních biotopech: planktonicky žijící buňky, buňky přichycené na biotický povrch a buňky přichycené na abiotický povrch. Některé patogenní zástupce tohoto rodu lze nalézt ve specifických lokalitách s podmínkami, které jsou pro většinu mikroorganismů zcela nevyhovující. Rozšíření rodu *Pseudomonas* je pravděpodobně dáno jeho malými nutričními nároky, velkým množstvím uhlíkatých substrátů, které mohou tyto mikroorganismy využívat a diverzitou jejich metabolismu, danou šíří enzymového vybavení. Lze říci, že zástupci rodu *Pseudomonas* se převážně vyskytují v půdě a vodě, za aerobních, mezofilních podmínek v pH neutrálním prostředí. Zástupci rodu *Pseudomonas* jsou také schopni tvořit konsorcia s rostlinami a zvířaty. Z výše uvedeného lze konstatovat, že se jednoznačně jedná o velmi vhodný mikroorganismus pro využití v bioremediačních technologiích¹.

Základní charakteristiky a morfologie (vybrané buněčné struktury)

Jedná se o gramnegativní bakterie, nesporulující, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, převážně striktně aerobní, pohyblivé (monotrichní nebo lofotrichní), využívající oxidativní, chemoorganotrofní metabolismus, nevykazující kvasné ani fotosyntetické schopnosti. Někteří zástupci jsou schopni fixovat dusík (*P. stutzeri*, *P. aeruginosa*). Mezi vlastnosti pseudomonád, které jsou kódované na plasmidech, patří resistance na antibiotika, chemická činidla, UV záření, bakteriofágy, bakteriociny, geny degradace organických sloučenin, schopnost být donorem chromosomů, inhibice produkce bakteriocinu, inhibice rozmnožování, nekompatibilita s ostatními plasmidy. Mezi významné vlastnosti patří také produkce sekundárních metabolitů, zejména pak sideroforů a antibiotik².

Epidemiologie a patogenita

Někteří zástupci rodu *Pseudomonas* jsou patogenní pro člověka, lidi a zvířata. Extracelulární enzymy sekretované psychrotrofními bakteriemi jsou známými původci kažení masa, mléka a mléčných výrobků³. Pseudomonádová infekce lidského organismu, způsobená nejčastěji kmenem *Pseudomonas aeruginosa* (10 % ze všech bakteriologických infekcí ročně), postihuje nejružnější části lidského těla. Infekce ovšem postihuje většinou pouze závažně nemocné lidi. Vzhledem ke svým charakteristickým vlastnostem (např. schopnost přichytit se na tkáňové buňky, minimální nutriční požadavky, resistance k velkému počtu antibiotik,

produkce proteinů poškozujících tkáň, ochranná vrstva) bývá léčba těchto infekcí náročná⁴.

Obecný metabolismus

Zástupci rodu *Pseudomonas* využívají klasický respirační metabolismus s kyslíkem jako konečným akceptorem elektronů, ale některé druhy jsou schopny rovněž využívat nitrát jako alternativní akceptor elektronů a mohou využívat redukční disimilaci nitrátu (na N₂O nebo N₂). Např. *P. mendocina* a *P. fluorescens* jsou schopny anaerobní respirace s nitráty jako konečnými akceptory elektronů a aerobní přeměny argininu na ornitin. Rod *Pseudomonas* využívá cukry Entner-Doudoroffovou drahou. Některé druhy jsou schopny využívat až 150 druhů organických sloučenin jako zdroje uhlíku a energie^{2,5}. V komplexním prostředí obsahujícím několik vzájemně zastupitelných zdrojů živin se může každý z přítomných mikrobiálních rodů specializovat na utilizaci pouze jednoho nebo několika z nich⁵.

Biofilm

Povrchová adheze bakterií a jejich následné dceřinné generace vzniklé binárním dělením a produkce exopolysacharidů vedou k tvorbě bakteriálního biofilmu. Biofilm je definován jako společenství mikroorganismů a jejich extracelulárních produktů vázaných k pevnému povrchu⁶. Prokaryotický biofilm převládající v širokém rozmezí ekosystému je často vysoce organizovaná uspořádaná komunita složená z velkého počtu druhů mikroorganismů. Uvnitř této komunity jsou propojené metabolické aktivity jednotlivých členů. Možnost uzpůsobení struktury biofilmu a vztahů mezi jeho jednotlivými členy je pravděpodobně dána možností exprese sady genů, která ve výsledku vyústí ve fenotypový projev, který je naprosto odlišný od fenotypu jednotlivě rostoucích buněk stejného druhu⁶.

Struktura a diferenciací biofilmu

Populace vázaná na povrch (jednodruhová a vícedruhová) obvykle preferuje uspořádání do struktury biofilmu. Mnoho bakteriálních rodů tvoří biofilm ve vývojevém sledu, který lze rozdělit do tří základních kroků:

1. počáteční vazba na povrch
2. tvorba mikrokolonií
3. dozrávání mikrokolonií ve vyvinutý biofilm uzavřený ve vytvořených exopolysacharidech⁸.

Vývoj biofilmu u gramnegativních mikroorganismů (modelový mikroorganismus *P. aeruginosa*) byl popsán například v práci Davey a kol. (2000) se zaměřením na studium vývoje bičíků⁹. Přítomností bičíků byl v tomto případě zajištěn pohyb buňky do blízkosti

povrchu, s pomocí lipopolysacharidů byly zprostředkovány první interakce s povrchem pravděpodobně ve spolupráci s vnějšími membránovými proteiny buňky (OMPs). Jakmile bakterie vytvoří na povrchu monovrstvu pil typu IV, šubavými pohyby zajistí agregaci buněk v mikrokolonie. Produkce pil je regulována nutričními signály (Crc). Doposud prokázané změny v expresi genů v této první etapě tvorby biofilmu zahrnují posílení exprese genů pro syntézu alginátu a snížení exprese genů pro syntézu bičíků. Pro zrání biofilmu je rovněž důležitá produkce signálních molekul sloužících k mezibuněčné komunikaci (acyl-HSLs). Další sloučeninou, která hraje v tomto procesu důležitou roli je právě zmíněný alginát⁹. O'Toole a kol. (1998) pomocí testů na iniciaci tvorby biofilmu (např. přichycení na biotický povrch) u *P. fluorescens* kmen WCS365 prokázali, že tento kmen je schopen tvořit biofilm na biotickém povrchu pokud má k dispozici dostatečně široký zdroj nutrientů, z důvodu nutnosti proteosyntesy krátce po zahájení tvorby biofilmu⁸. Je patrné, že jeden (nebo více) exocytosomálních proteinů hraje roli při kontaktu s biotickým povrchem. V této fázi hraje roli rovněž osmotický tlak v médiu, který ovlivňuje schopnost buněk tvořit biofilm⁸.

Vliv okolního prostředí na strukturu biofilmu

Bakteriální biofilm se začíná tvořit v okamžiku, kdy se individuálně rostoucí buňky začínají přichytávat na povrch. Schopnost buněk provést tento počáteční atak povrchu je ovlivňována řadou environmentálních faktorů zahrnujících například koncentraci nutrietií, teplotu, pH a genetické faktory, včetně genů kódujících pohybové funkce a environmentální senzory. Biofilmy vykazují resistenci k široké škále antibiotik (např. ampicilin, streptomycin, tetracykliny, gentamycin a řadě dalších) a biocidním oxidačním činidlům jako jsou ozón, chlór a jód¹⁰. Chang a kol. (2003) například popsali změnu buněčné morfologie u *P. putida* kmen mt-2 při snížené dostupnosti vody, což mělo za následek ovlivnění velikosti mikrokolonií a ultrastrukturu biofilmu¹¹.

Fenotypová diferenciaci v průběhu vývoje biofilmu

Významnou charakteristikou mikrobiální populace tvořící biofilm je, jak již bylo řečeno, její odlišný fenotypový projev ve srovnání s populací žijící volně. Z fenotypových změn, které se zejména v posledních letech stávají předmětem intenzivního studia, je z hlediska využitelnosti biofilmu v biotechnologiích významná především schopnost mikroorganismů lépe využívat živiny, následně tvořit větší množství metabolitů a minimalizovat vznik dále nevyužitelných intermediátů (tzv. dead-metabolitů). Nespornou výhodou je možnost opakovaného použití biomasy bez nutnosti její složité separace, vysoká hustota buněk v reaktoru, jež zvyšuje rychlost a tím i produktivitu procesu nebo stabilita biofilmu. Proces tvorby biofilmu je v neposlední řadě využíván v moderních zařízeních pro biologickou degradaci toxických látek a čištění odpadních vod¹².

Klíčová sekvence genů u *P. fluorescens* WCS365 pojmenovaná *lap*, jakožto místo bohaté na adhezivní proteiny („large adhesin protein“) nutné k přichycení buňky na biotický povrch, kóduje ~880 kDa protein a ABC transporter potřebný k sekreci *lapA*. *Lap*-systém je důležitý pro přechod z reversibilního na ireverzibilní krok v procesu přichycení buňky na povrch v prvních fázích vývoje biofilmu¹³. V případě, že je ABC transporter mutován, *LapA* je možno nalézt pouze v cytoplazmě buněk, není tedy exkretován do supernatantu ani lokalizován na buněčném povrchu¹⁴.

Široká škála mikroorganismů, zvláště pak bakterie, jsou schopné tvořit extracelulární polysacharidy (EPS) v rozličném prostředí. Bylo zjištěno, že produkce exopolysacharidů je přímá a logická odpověď na selektivní tlak prostředí, ve kterém se daný mikroorganismus nachází, to znamená, že je možné připsat EPS funkci přirozené ochrany svého producenta.

Životní podmínky v některých lokalitách doslova vyžadují pro přežití mikroorganismů jejich adhezi na pevný povrch. Zdá se, že u kmenů produkujících EPS je adheze na povrch a vytvoření biofilmu pravděpodobnější než u kmene, který expolysacharidy netvoří. Je tedy pravděpodobné, že EPS mají důležitou roli při adhezi buňky na povrch. Oliveira a kol. (1993) studovali vliv pH a povrchu materiálů nosiče (polymerní látky) na produkci polysacharidů a tvorby biofilmu u *P. fluorescens*¹⁵. Z výsledků je patrné, že množství vyprodukovaných exopolysacharidů je maximální v případě, kdy jako počáteční pH použijeme pH 7, to samé platí pro množství narostlé biomasy. Již dříve bylo prokázáno, že optimální pH pro produkci exopolysacharidů je zcela individuální pro každý kmen, pro většinu bakterií je však toto optimum v blízkosti pH 7.

Mezi koncentrací EPS v médiu a tloušťkou vrstvy biofilmu, tvořící se na povrchovém materiálu nebyla prokázána přímá souvislost. Adheze mikroorganismů na povrch a produkce exopolysacharidů je pravděpodobně odpovědí na typ a vlastnosti povrchového materiálu nosiče a je tedy možné, že povrchový materiál na základě svých vlastností může produkci EPS navýšit nebo snížit¹⁶.

Charakterizace hlavních komponent exopolysacharidů může vést k odhalení potenciálních vazebných míst např. pro kovy nebo radionuklidy na tento exopolymerní biosorbent. Hung a kol. (2005) izolovali a charakterizovali exopolysacharidy produkované *Pseudomonas fluorescens* Biovar II (cit.⁵). Monosacharidy stanovené pomocí GS-MS byly složeny z rhamnosy, fruktosy, arabinosy, xylosy, mannosy, galaktosy a glukosy. Kyselé skupiny v EPS byly převážně zastoupeny karboxylovými kyselinami a v menší míře také polyaniontovými skupinami jako je např. sulfát a fosfát. Více než 70 % celkových uhlovodíků bylo zastoupeno uronovými kyselinami. Kromě neutrálních a kyselých cukrů obsahovaly EPS i 2 % proteinů.

Mezibuněčná komunikace v průběhu tvorby biofilmu, systém quorum-sensing

Jak již bylo řečeno v předchozím textu, bakterie tvoří biofilmy multicelulárního charakteru. Genetická analýza

za buněk tvořících biofilm vedla ke vzniku myšlenky, že extracelulární signalizace a regulační systém quorum-sensing (QS) jsou nezbytné pro vznik diferencovaného biofilmu. Tato představa vystihuje pojem densitou řízené mezibuněčné komunikace a vede k popisu vývoje biofilmu u různých bakteriálních kmenů za různých podmínek, je třeba však mít na paměti, že proces tvorby biofilmu je proces multifaktoriální a komplexní. Fyzikální vlastnosti prostředí, dodávka živin a intracelulární tok zdroje uhlíku mají pravděpodobně hlavní vliv na měnící se buněčnou expresi nezbytnou pro adaptaci buněk v průběhu různých fází tvorby biofilmu.

Tvorba biofilmu může být rovněž výsledkem propojení několika nezávislých interakcí určených speciálním komplexním systémem QS, který zprostředkovává mezibuněčnou komunikaci a umožní bakteriím koordinovat komplexní buněčnou odpověď na danou situaci. Tato komunikace spočívá v syntéze a extracelulární produkci chemických signálních molekul zvaných autoinduktory. Lze tedy říci, že QS je druhem účelového chování bakteriálních buněk, souvisejícího se změnou populační density. Zvyšování koncentrace autoinduktorů přímo úměrně souvisí se vzrůstem populační density. Dosažení prahové koncentrace signálních molekul vyvolá specifickou odpověď příslušného organismu, která vyústí v ovlivnění genové exprese. Jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie využívají QS jako komunikační kaskádu vedoucí ke změně konkrétních fyziologických projevů buněk. Zmíněné děje souvisejí mimo tvorby biofilmu např. se symbiózou, virulencí, konjugací, produkcí antibiotik, pohybem a sporulací. Pro komunikaci využívají gramnegativní bakterie především acylovaných laktonů homoserinu (AHL), zatímco bakterie grampozitivní rozmanité oligopeptidy. Komunikaci QS jsou bakterie schopny využívat jak v rámci druhu, tak mezidruhově. Jak charakter jednotlivých signálních molekul, tak i mechanismus přenosu příslušné informace vnitrobuněčným prostředím se liší, a odlišné jsou i geny, jejichž exprese je kontrolována systémy QS. Tento děj uděluje jednobuněčným organismům rysy chování, jimiž se vyznačují vyšší organismy¹⁷.

P. aeruginosa je velmi variabilní organismus, který je schopen se adaptovat na různá prostředí a který je vybaven rozsáhlým 6,3 MB genomem. Velikost genomu naznačuje existenci vysoce komplexní genové regulace, která umožňuje rychlou adaptaci na změny prostředí. Tento mikroorganismus produkuje širokou škálu extracelulárních produktů. Produkce je v populaci regulována na densitě-závislém chování skrz mezibuněčnou komunikaci nebo systém QS. U dvou propojených QS systémů (*las* a *rhl* systém) bylo prokázáno jejich zapojení do systému virulence, vývoje biofilmu a dalších procesů probíhajících v *P. aeruginosa*¹⁸.

Detekce AHL-molekul je v současné době usnadněna díky vývoji sensitivních biodetektorů použitelných pro rychlý screening mikroorganismů nebo difundovaných signálních molekul. AHL nebo jejich diketopiperazinové deriváty, jakožto nástroje mezibuněčné komunikace, hrají roli v regulaci rozličných bakteriálních funkcí,

jako je například syntéza antibiotik, produkce virulentních faktorů, biosyntéza exopolysacharidů, přenos plastidů konjugací a přechod kultury do stacionárního stavu. Gramnegativní bakterie žijící na povrchu rostlinných kořenů produkují quorum-sensing signální molekuly, například u *P. fluorescens* byla prokázána produkce N-(3-hydroxy-butyryl)-L-homoserinového laktonu¹⁸. U *Pseudomonas syringae* vede zvýšení koncentrace AHL k expresi virulentních faktorů a sekundárních metabolitů, které zprostředkovávají úspěšnou kolonizaci hostitele^{19,20}.

Oddělování komponent v průběhu vývoje biofilmu

Oddělování komponent v průběhu vývoje biofilmu, neboli tzv. „detachment“ (pohyb buněk z biofilmu do kapaliny), je proces, který umožňuje buněčné populaci odpoutání buněk z matrice biofilmu, čímž buňky získávají možnost osidlovat jiné povrchy. Tento proces je realizován dvěma základními procesy, a to mechanickým oddělováním (proudem kapaliny) a spontánním oddělováním. Tento proces je především důsledkem mortality buněk, která narušuje architekturu biofilmu. Allison a kol. (1998) prokázali vliv extracelulárních produktů *P. fluorescens* B52 na tvorbu biofilmu a „detachment“ biofilmu²¹. Tento kmen tvoří biofilm s maximálním nárůstem již po 20 – 50 hodinách od inokulace. Z výsledků jejich práce vyplývá, že mezibuněčná komunikace zprostředkovaná například homoserinovým laktonem je spojená s tvorbou biofilmu. Enzymatická degradace, ke které dochází, má specifickou roli při „detachmentu“ biofilmu za podmínek limitace substrátem a hladovění. Zatímco krátké uhlovodíkové řetězce (C_6) exogenních homoserinů mohou také spouštět buněčnou odpověď v *P. fluorescens*, vlastní podstata odpovědi je pravděpodobně důsledkem přítomnosti dlouhých řetězců mastných kyselin ($>C_8$).

Tvorba biofilmu jako vývojový proces – dynamika biofilmu

Moderní metody studia tvorby biofilmu jsou v současné době založeny na konfokální mikroskopii a genetické analýze. Tolker-Nielsen a kol. (2000) použili pro studium dynamiky biofilmu geneticky značené zástupce následujících mikroorganismů: *Pseudomonas* sp. kmen B13 a *P. putida* OUS82 (zelený fluorescenční protein) a *Discosoma* sp. (červený fluorescenční protein). Na začátku byla pozorována tvorba jednodruhových mikrokolonií, to značí, že tyto mikrokolonie v počátečních fázích tvorby biofilmu jsou snadněji tvořeny buňkami využívajícími stejný substrát a nikoliv buněčnou agregací. Výskyt malého množství zelených buněk v červených mikrokoloniích naopak prokazuje možnost přesunu buněk mezi mikrokoloniemi. Rychlý přesun *P. putida* OUS82 do středu mikrokolonií byl pozorován před jejich přechodem na kompaktní mikrokolonie. Tento přechod doprovází ztráta nepravidelně rostoucích povrchových struktur buněk. Pokusy provádě-

děné s bezbičíkovým mutantem *P. putida* potvrdily, že pohyb uvnitř a mezi mikrokoloniami je řízen právě bičíky. Je tedy zřejmé, že volně žijící buňky se nacházejí v jiném fyziologickém stavu, než buňky vázané v biofilmu²².

Literatura

1. <http://textbookofbacteriology.net/Pseudomonas.etc.html>. Citováno 12.12.2006.
2. Garrity G.M., Boone D.R.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vydavatelství Springer, 2001.
3. Rajmohan S., Dodd C.E.R., Waites W.M.: *J. Appl. Microbiol.* **93**, 205 (2002).
4. www.healthatoz.com. Citováno dne 9.2.2007.
5. Hung C., Santschi P.H., Gillow J.B.: *Carbohydrate Polymers* **61**, 141 (2005).
6. Stolz, J.F. *Microbial Sediments*. Riding, R.E., Awramik, M.S. eds. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 1-8 (2000).
7. Lazarova V., Manem J.: *Wat. Res.* **29**, 2227 (1995).
8. O'Toole G.A., Kolter R.: *Mol. Microb.* **28**, 449 (1998).
9. Davey M.E., O'Toole G.A.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847 (2000).
10. Costerton J.W.: *J. Ind. Microbiol.* **15**, 137 (1995).
11. Chang W.S., Halverson L.J.: *J. Bacter.* **185**, 6199 (2003).
12. Stoodley P., Kauter K. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187 (2002).
13. Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U.: *FEMS Microb. Rev.* **24**, 661 (2000).
14. Hinsä S.M., Ramos E.U. M. O'Toole G.A.: *Mol. Microbiol.* **49**, 905 (2003).
15. Oliveira R., Mělo L. et al.: *Coll. Surf. – B Biointer.* **2**, 41 (1993).
16. Wilkinson J.F.: *Bacteriol. Rev.* **22**, 46 (1958).
17. Kjelleberg S., Molin S.: *Current Opin. Microb.* **5**, 254 (2002).
18. Cámara M.: *Quorum sensing: University of Nottingham, UK* (2004).
19. Loh J., Pierson E.A. et al.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 285 (2002).
20. Quiñones B., Pujol C.J., Lindow S.E.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 521 (2004).
21. Allison D.G., Ruiz B. et al.: *FEMS Microb. Lett.* **167**, 179 (1998).
22. Wolker-Nielsen T., Brinch U.C. et al.: *J. Bacter.* **182**, 6482 (2000).

ENZYMY PRODÁVANÉ JAKO POTRAVNÍ DOPLŇKY

Kristýna Slámová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Enzymy jsou bílkoviny s biokatalytickou aktivitou, přítomné ve všech živých buňkách, kde se podílejí prakticky na všech životních funkcích. Lze je rozdělit na **endogenní**, tj. produkované organismem, a **exogenní**, přijímané potravou. Endogenní enzymy můžeme dále rozlišit na metabolické, katalyzující různé chemické reakce v buňkách, a trávicí, které jsou sekretovány v gastrointestinálním traktu, kde se podílí na rozkladu přijaté potravy na menší látky, které mohou být absorbovány přes střešní stěnu do krve a transportovány k buňkám. Exogenní enzymy jsou přirozeně obsaženy ve všech syrových potravinách. Toto se týká především rostlinných produktů, které běžně konzumujeme syrové, platí to ale samozřejmě i pro masné nezpracované výrobky. Zpracováním a vařením se enzymy obsažené v potravinách nevratně deaktivují, což je také cílem při konzervaci potravin, ale není výhodné pro jejich snadnější trávení.

Je tedy zřejmé, že velké množství problémů spojených se špatným trávením spočívá v nadměrné konzumaci zpracovaných jídel a **nedostatku syrových potravin** v moderním stravování. Předpokládá se, že naše orgány a žlázy mají naprogramovaný určitý „enzymový

Tato práce vznikla za podpory GAČR (projekt č. 104/05/0194) a Ministerstva školství České republiky (projekt MSM 6046137305).

potenciál“, tedy množství enzymů, které jsou schopny během života vyprodukovat. Tento potenciál je geneticky určen, ale závisí také na různých faktorech životního prostředí. Během stárnutí organismu dochází k úbytku produkovaných enzymů a tím i ke zhoršení trávení – kromě klasických trávicích obtíží dochází i ke vzniku chronických obtíží jiného typu – oslabení imunity, cévní choroby nebo různé metabolické poruchy. Příčinou těchto obtíží jsou špatně nebo nedokonale strávené metabolické produkty absorbované z GI traktu do krve, kde jsou metabolické enzymy nuceny je zpracovat, a proto nemohou plnit svou primární funkci (např. obrana proti infekcím, opravné funkce). Dochází k **porušení homeostázy** a vzniku chronických obtíží (1). V takových případech je snadnou pomocí podávání potřebných enzymů ve formě potravinových doplňků, které sice neléčí žádnou chorobu, ale odstraní nebo zmírní dlouhodobé obtíže spojené s nedostatkem vlastních trávicích enzymů.

Enzymové deficiencie

Při nedostatku **proteas** je hlavním příznakem alkali- zace krve, která může vést až k úzkostným stavům a často je řešena podáváním sedativ. Dále také dochá-

zí k otokům, protože nedostatek proteinů v krvi podporuje přechod vody z krve do tkání. Špatné trávení vede k syndromu toxického tračníku, který může skončit i rakovinou tlustého střeva. Deficience proteas také způsobuje poruchy imunity, chronické a opakované záněty středního ucha u dětí a otoky končetin během PMS u žen.

Lidé s nedostatkem **lipas** jsou náchylní ke zvýšeným hladinám cholesterolu a triacylglycerolů v krvi, obezitě, diabetu a glukosurii. Následkem je většinou závažné onemocnění srdce a cév. Při nedostatku lipas dochází ke snížení permeability cytoplazmatické membrány, což způsobí problémy s transportem živin do buňky a zplodin metabolismu ven z ní, souhrnně se projevy někdy označují jako syndrom chronické únavy. Dalším příznakem deficience lipas mohou být svalové křeče v oblasti ramen a krku, podobné křečím při tetanu.

Amylasy metabolizují kromě polysacharidů i mrtvé lymfocyty (hnis), takže lidé trpící jejich nedostatkem jsou náchylní ke vzniku abscesů. Amylasy se také účastní protizánětlivé reakce vyvolané histaminem, jejich deficience způsobuje kožní a plicní problémy jako ekzémy, opary, atopické dermatitidy nebo astma (1).

Systémová enzymoterapie

Poměrně novou léčebnou metodou je tzv. **systémová enzymoterapie (SET)**, která je založena na komplexním působení cíleně sestavených směsí hydrolytických enzymů (především proteas) na klíčové fyziologické a patofyziologické pochody. Zakladatelem systémové enzymoterapie byl prof. Max Wolf z USA, průmyslovou výrobu preparátů pro SET zavedl Dr. Karl Ransberger. Díky prudkému rozvoji molekulární biologie v posledních desetiletích se systémová enzymoterapie z původně empirické léčebné metody stala vědecky podloženou součástí moderní medicíny. Můžeme říci, že jsme schopni popsat mechanismus působení enzymatického přípravku na patologický proces, konkrétně jsou známy zásahy proteas do cytokinové sítě, ovlivnění buněčného povrchu jak ve smyslu jeho adhezivní tak i modulační buněčných receptorů, a také ovlivnění humorálních složek účastnících se řady fyziologických i patologických procesů. V současné době existuje dostatek experimentálních i klinických důkazů popírajících dogma o neresorbovatelnosti makromolekul střevní stěnou.

Přípravky pro systémovou enzymoterapii mají prokázaný vliv na imunitní systém a průběh zánětlivé reakce v organismu. **Zánět** je fylogeneticky nejstarším typem obranné reakce organismu na nejrůznější podněty, které mohou být povahy biologické (bakterie, plísňe, viry, parazité), fyzikální (záření, trauma), chemické nebo metabolické (hypoxie, poruchy metabolismu). Cílem zánětu je odstranění jeho příčiny, lokalizace poškození, odstranění poškozených tkání, jejich regenerace a obnovení jejich funkce. Při rozvoji zánětu spolupracují endotel, trombocyty, leukocyty, plazmatický koagulační systém a komplement. Je důležité, aby zánětlivá reakce probíhala v tempu a rozsahu odpoví-

dajícím intenzitě vyvolávajícího podnětu, pokud tomu tak není, může dojít k rozvoji autoagresivního zánětu.

Proteasy obsažené v preparátech pro systémovou enzymoterapii jsou schopny zvýšit intenzitu akutní buněčné odpovědi na podnět. Buňky účastnící se zánětlivé reakce po své aktivaci **cytokiny** mění spektrum adhezivních molekul v membráně, což jim umožňuje vzájemně interagovat a produkovat další cytokiny. Produkce cytokinů aktivovanými buňkami je žádoucí pouze v první fázi zánětu, dále může přerůst v patologický proces. Z tohoto důvodu je vhodné zvýšení clearance prozánětlivých cytokinů vlivem proteas. Proteasy mají také schopnost regulovat přímo adhezivní molekuly na povrchu imunoaktivních buněk (CD44, CD45, CD4, CD80, CD62L), a tím zprostředkovaně ovlivňují produkci cytokinů. Proteasy se v krvi váží na přirozené antiproteasy především α 1-antitrypsin a α 2-makroglobulin. V těchto komplexech jsou proteasy chráněny před rozeznáním imunitním systémem a směřovány do oblasti zánětu. α 2-M je po navázání proteasy aktivován, mění se z pomalé formy na rychlou formu. Obě formy váží cytokiny, ale s různou specifíčností: nativní volný α 2-M váže především IL-6, PDGF a NGF, α 2-M v rychlé formě váže hlavně TNF- α , IL-1, TGF- α a TGF- β . Tyto cytokiny po navázání ztrácí svoji aktivitu a podněcují makrofágy k expresi receptorů pro α 2-M, čímž jsou eliminovány z krevního oběhu. V časně fázi zánětu se významně projevuje protiedémový účinek proteas (trypsinu, chymotrypsinu a bromelainu). Proteasy také významně ovlivňují reologické vlastnosti krve, protože zvyšují v krvi koncentraci plazminogenu, snižují tvorbu fibrinu a rozpouštějí již vzniklé tromby. Dochází i ke snížení agregace destiček, a tím pomáhají udržet průchodnost mikrocirkulace. Důležité je, že toto ovlivnění hemokoagulace nevede k výraznějšímu zhoršení hemostázy. Proteasy také mají schopnost aktivovat některé buňky podílející se na zánětlivé reakci. V pokusech *in vitro* došlo v přítomnosti proteas už po 10 minutách k sedminásobnému zvýšení aktivity makrofágů a aktivita NK-buněk se zvýšila dokonce třináctkrát. Proteolytické enzymy (především papain a bromelain) také tlumí vznik imunokomplexů a zvyšují jejich clearance (2). Je tedy zřejmé, že proteasy mají velký pozitivní vliv v mnoha důležitých fyziologických procesech v našem těle a mají široké možnosti použití.

Moderní medicína má pro preparáty systémové enzymoterapie využití téměř v každém svém oboru, zmíním se jen o několika nejčastějších aplikacích. Jak už bylo popsáno výše, proteasy mají významný vliv na regulaci imunitní odpovědi organismu, čehož využívají imunologové buď k posílení imunity u oslabených jedinců, nebo naopak k tlumení nadměrné reakce u pacientů s chronickými nebo autoimunními chorobami. Další významnou oblastí pro aplikaci těchto léků je samozřejmě angiologie. Vzhledem k vlivu proteas na koagulační rovnováhu se používají jako prevence cévních a srdečních onemocnění u rizikových osob. Enzymové preparáty našly své použití i v oblasti chirurgie a trau-

matologie, kde jsou podávány ke zmírnění zánětu a otoku, což jsou hlavní pooperační komplikace. Výhodou je možnost předoperační medikace, takže enzymy mohou pracovat již během zákroku a urychlovat tak úspěšné hojení.

Enzymy prodávané jako potravní doplňky

Enzymy v prodáváných enzymatických preparátech jsou rostlinného i živočišného původu, ale většinou jsou produkovány v modifikovaných kmenech *A. oryzae*, *A. niger* nebo *S. cerevisiae*. Tyto kmeny jsou z potravinářského hlediska považovány za bezpečné a jejich produkty jsou považovány za potraviny. Některé enzymy živočišného původu mohou také být vyráběny z vnitřností zvířat (např. trypsin z pankreatu vepřů). Enzymové preparáty bývají ve formě tablet potažených acidorezistentním obalem, tablety se rozpouštějí až v tenkém střevě, kde se vstřebávají. Enzymové přípravky jsou směsí různých typů hydrolytických enzymů: proteas (trypsin, chymotrypsin, papain, bromelain), lipas, amylas a dalších sacharolytických enzymů (cellulasy, pektinasy, invertasy, glukoamylasy aj.).

Snad nejznámějším enzymovým přípravkem na našem trhu je **Wobenzym**, který vyrábí německá firma MUCOS Pharma. Jedná se o jeden z prvních preparátů využívaných v medicíně pro systémovou enzymoterapii, jak již bylo uvedeno výše, ale je též možné si Wobenzym zakoupit v lékárně bez lékařského předpisu. Wobenzym je směs sedmi hydrolas s různou specifitou účinku (papain, bromelain, pankreatin, trypsin, chymotrypsin, lipasa, a amylasa). Tento enzymový preparát byl vyvinut tak, že má velké množství různých indikací: poúrazové otoky, lymfedémy, fibrocystická mastopatie, pooperační stavy v chirurgii, záněty povrchových žil, revmatoidní artritida, artróza, chronické a recidivující záněty. MUCOS Pharma vyrábí ještě další přípravky **SET**, **Phlogenzym** a **Prevenzym**, které se liší složením enzymů a tím i specifitou účinku (2).

Velkým producentem enzymových preparátů na americkém trhu je společnost **Enzymes.com**, která vyrábí více než dvě desítky různých přípravků s obsahem enzymů a prodává je jako doplňky stravy. Z velké nabídky jsem vybrala tři reprezentanty, o kterých bych se chtěla zmínit. Zdá se, že velmi oblíbeným preparátem je směs trávicích enzymů příhodně nazvaná **Digestive enzymes**, která má za úkol pomáhat účinně a kompletně strávit potravu. Obsahuje velmi různoro-

dou směs enzymů (tři různé proteasy, peptidasa, amylasa, lipasa, laktasa, invertasa, cellulasa, alfa-galaktosidasa, a glukoamylasa). Je vhodný pro osoby s různými poruchami trávení, s nesnášenlivostí mléčných výrobků nebo cukrů, alergií na potraviny nebo žlučnickovým stresem. Jiným produktem je **Super Cellzyme**, který obsahuje směs enzymů (proteasu, amylasu, lipasu, cellulasu, glukoamylasu a pektinasy) a několik rostlinných extraktů. Tento přípravek působí proti únavě, stresu, nedostatku energie, anemii a poruchám metabolismu. Dalším příkladem je **LypoZyme**, který obsahuje zejména velké množství lipasy, která se postará o snížení hladiny cholesterolu a triacylglycerolů v krvi a lepší trávení tuků. Tento preparát je doporučován pro zdraví kardiovaskulárního systému, kontrolu nadváhy a při diabetu (1).

Poslední dobou se v našich lékárnách objevuje velmi úspěšný produkt pro snižování nadváhy **Lipoxal**, který vyrábí firma Garden State Nutritionals. Tento přípravek obsahuje enzymy papain a lipasu a velké množství přírodních výtažků z rostlin, hlavně ze zeleného čaje, šalvěže a zázvoru. Tato směs účinných látek podporuje metabolismus tukových buněk a spalování podkožního tuku, snižuje potřebu příjmu potravy, posiluje imunitu a čistí krev (3).

Jedním ze světově uznávaných enzymových přípravků je **Natto NKCP**, nazývaný též „tajemství japonské dlouhověkosti“, vyráběný Daiwa Pharmaceutical v Tokiu. Tento preparát obsahuje proteiny produkované *Bacillus subtilis natto*, což je speciální kmen pěstovaný na fermentované sóje. Účinnou složkou je fibrinolytický enzym nattokinasa, který rozpouští krevní sraženiny a udržuje rovnováhu mezi koagulací a fibrinolýzou. Tento přípravek je vhodný pro lidi s vyšším rizikem infarktu nebo mozkové mrtvice nebo s bércovými vředy, používá se též jako prevence proti vzniku trombózy (např. v těhotenství, při diabetu, během dlouhých letů apod.) (3).

Závěr

Závěrem bych chtěla zdůraznit, že enzymové přípravky mají své příznivce i odpůrce v řadách odborníků. S rozvojem molekulární biologie však lépe rozumíme působení enzymů na konkrétní procesy, a je zřejmé, že tento nový a moderní obor medicíny se bude rychle rozvíjet, a s tím zároveň poroste množství a objemy prodáváných enzymových preparátů.

Literatura

1. <http://www.enzymes.com>
2. <http://www.wobenzym.cz>

3. <http://www.lekarna.cz>

MOZKOVÉ NÁDORY A JEJICH LÉČBA

Petr Bartík

Katedra biochemie, PŘF UK Praha / Fakulta farmacie, Universita Louise Pasteura Strasbourg

Rakovina je zhoubné onemocnění, při kterém normální buňky uniknou běžným kontrolním mechanismům a nadměrně se začínou množit. Žádná z miliard buněk našeho těla není nesmrtelná. Naopak doba života buňky je pod přísnou kontrolou a po čase každá buňka umírá a je nahrazena buňkou novou. Během své existence buňky čelí mnoha nepříznivým vlivům, které je poškozují. Za normálních okolností zafungují kontrolní a opravné mechanismy a poškozená buňka je opravena a plní opět svoji funkci. V případě těžkého poškození je buňka trvale odstraněna z organismu. Nicméně za určitých okolností dojde k poškození vlastních kontrolních mechanismů a pokud poškození buňky není fatální, tak dochází k nadměrnému růstu a vzniku nádorového onemocnění. Náš moderní způsob života s sebou přináší zvýšené riziko vystavení faktorům poškozujícím buňky (smog, kouření, potravinová aditiva aj.), což spolu s prodloužením lidského života (efektivita opravných mechanismů se stářím snižuje) vede k nárůstu počtu nádorových onemocnění v populaci. Rakovina se tak stává jednou z hlavních příčin umrtí v Evropě a ročně jí podlehnou přes 1,7 milionů lidí.

Moderní medicína udělala značný pokrok v léčbě některých druhů nádorů jako je nádor prostaty, prsu nebo kůže s 5-ti letým indexem přežití přes 90 %. Nicméně klasické léčebné postupy (chirurgie, radiotherapie, chemoterapie) jsou zřetelně méně úspěšné v boji proti rakovinám se špatnými prognózami jako je rakovina plic a mozku.

Mozkové nádory jsou v několika aspektech zvláštní a odlišné od nádorů ostatních orgánů a tkání. Mozek je hlavním řídicím orgánem kontrolujícím vitální pochody našeho těla, umožňuje nám vnímat okolní podněty, reagovat na ně, chodit, myslet, mluvit atd.. Proto každý zásah do tohoto komplikovaného orgánu je velmi delicate a hrozí poškozením základních životních funkcí. Mozek je dobře chráněn jednak lebeční kostí i ochrannou vrstvou buněk, tzv. hematoencefalickou bariérou. Tyto ochranné bariéry jsou pak přes svou původní pozitivní roli, při vývoji nádoru spíše faktorem negativním. I růst nezhooubného nádoru v uzavřeném prostoru (ohraničeného právě lebeční kostí) může mít velmi vážné zdravotní následky dané tlakem nádoru na okolní zdravou tkáň. Navíc hematoencefalická bariéra, sloužící primárně k bránění vstupu škodlivin do mozku, brání stejně i přísunu chemoterapeutik a ostatních léků na místo účinku. Navíc mozkové nádory jsou velice různorodé, což značně komplikuje jejich diagnózu a léčbu.

Nádory mozku dělíme v zásadě na nádory primární a sekundární. Nádory primární vznikají přímo z buněk mozkové tkáně nebo z buněk okolních podpůrných struktur. Nádory sekundární mají svůj původ mimo

centrální nervovou soustavu a jsou způsobeny metastázami z jiných tkání. Primární mozkové nádory představují asi 1 – 2 % všech zhoubných nádorů a jsou častější pro muže než pro ženy. Každým rokem je v České republice diagnostikováno 700 nových pacientů s primárními mozkovými nádory. Celosvětově je tento počet odhadován na 176 000 případů, přičemž nejvíce do těchto statistik přispívají Spojené státy americké (41 000 nových případů ročně). Incidence těchto nádorů kulminuje v dvou obdobích lidského života: (1) u dětí do 5 let, (2) u starších lidí nad 60 let. Primární mozkové nádory jsou velice variabilní a jejich klasifikace není jednoduchá a stále se na ní pracuje. Podle typu buněk, ze kterých nádor vzniká rozlišujeme gliomy, meningeomy, neurinomy, adenomy hypofýzy, meduloblastomy, ependymomy a další. Nejčastějšími mezi nimi jsou gliomy, které vznikají z buněk podpůrné mozkové tkáně (neuroglie) a tvoří víc jak 50% všech primárních mozkových nádorů. Klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) dělí mozkové nádory podle jejich histopatologie, zhoubnosti a mikroskopického vzhledu do čtyř skupin : WHO grade I, WHO grade II, WHO grade III a WHO grade IV. WHO grade I zahrnuje nádory s nejlepšími a WHO grade IV naopak s nejhoršími prognózami na přežití pacienta. Do skupiny WHO grade IV patří např. vysoce zhoubné gliomy, glioblastoma multiforme. Pacienti diagnostikovaní s tímto typem nádorů mají velmi malou šanci na přežití a většina umírá do 8 měsíců po diagnóze nemoci. Léčba právě nádorů jako glioblastoma multiforme je největší výzvou současné onkologie.

Současný léčebný standard pro pacienty s mozkovými nádory zahrnuje chirurgii, radioterapii a chemoterapii. Nejdříve je však nutno typ nádoru co nejlépe a nepřesněji diagnostikovat, neboť různým typům nádoru odpovídá i různý typ léčby. Obecně však platí, že prvním a základním léčebným postupem je chirurgická operace. Cílem neurochirurga je vždy odstranění maximální části nádoru. To je však často limitováno jeho velikostí, ale především umístěním. Základním problémem většiny zhoubných mozkových nádorů je jejich infiltrativní charakter růstu, kdy nádorové buňky prorůstají mezi zdravými a hranice nádoru tak nejsou ostré. Zřídka kdy se tak podaří odstranit nádor celý a zbývající nádorová tkáň je pak léčena radioterapií, eventuelně chemoterapií v závislosti na histologickém typu nádoru. Ozařování (radioterapie) nastupuje většinou jako metoda doplňková k chirurgické resekci, nicméně v situacích, kdy operace není možná, se používá i jako metoda hlavní. Ozařování je metoda, která též poškozují zdravé buňky, ty jsou však více odolné než buňky nádorové. Délka ozařování se zpravidla pohybuje mezi třemi až šesti týdny. Během této doby pacient při stan-

dardním ozařování dochází do ozařovny pětkrát za týden. Chemoterapie je metodou z valné části doplňkovou. Její účinnost je totiž často limitována sníženým průchodem cytostatika přes hematoencefalickou bariéru. Nicméně v posledních několika letech se masivněji prosadil temozolomide, derivát imidazotetrazinu metylující specifická místa DNA. Toto cytostatikum je velmi vhodné jako doplňková léčba pro mozkové nádory, protože snadno prochází přes hematoencefalickou bariéru, dosahuje vysokých účinných koncentrací v místě nádoru, nepotřebuje ke své aktivaci jaterní metabolismus a je málo toxický. Používá se hlavně k léčbě recidivujících nádorů.

Tyto klasické léčebné postupy (chirurgie, radioterapie, chemoterapie) jsou velmi účinné pro některé typy nádorů jako např. meningeomy, adenomy hypofýzy, germinativní nádory, které jsou pro moderní medicínu léčitelné a plně vyléčitelné. Bohužel vysoce zhoubné mozkové nádory (např. glioblastoma multiforme) jsou i přes moderní medicínské postupy neléčitelné a pacienti mohou očekávat jen mírné prodloužení jejich postdiagnostického života. To je základním důvodem, proč probíhá rozsáhlý výzkum nových možných cest, jak léčit tyto vysoce zhoubné mozkové nádory. Výchoiskem je naše rostoucí poznání molekulárních změn, které prodělává normální buňka při transformaci v nádorovou. Výzkumníci se snaží najít takovou molekulu (enzym, receptor), která je ve zvýšené míře expri-

mována v nádorových buňkách a zároveň hraje důležitou roli v pochodech nutných pro rozvoj nádoru (proliferace, invazivita, migrace, neoangiogeneze). Cílem je pak zablokovat funkce zprostředkované touto molekulou, což postihne daleko více rychle se množící nádorové buňky, než klidové normální buňky. Takovým léčebným postupům se říká cílené terapie (targeted therapies). Mezi molekuly, na které se zaměřila pozornost vědců patří receptory pro růstové faktory (VEGFR, EGFR, PDGFR), kinasy (PKC, Raf kinase) a integriny. Přes desítku let trávající výzkum na tomto poli s sebou přinesl vývoj mnoha inhibitorů na bázi protilátek, malých peptidů nebo nepetidových mimetik, které v současné době vstupují do různých fází klinického testování. Za všechny uvedme alespoň Bevacizumab (monoklonální protilátka proti VEGF), Cetuximab (monoklonální protilátka proti EGFR) a Cilengitide (inhibitor integrinu $\alpha V\beta 3$ a $\alpha V\beta 5$). Nejnovějším trendem je kombinovat tyto nově objevené látky s již zavedenými terapiemi, což zvyšuje jejich účinek.

Nicméně i přes snahu výzkumných center a moderní medicíny jsou zhoubné mozkové nádory stále nemocí smrtelnou, přestože se daří prodlužovat a zkvalitňovat život pacientů diagnostikovaných s touto chorobou. Věřím však, že s prohlubováním našich znalostí o molekulárních změnách doprovázejících nádorovou transformaci, se naučíme bojovat s touto nebezpečnou chorobou daleko účinněji.

Literatura:

1. http://www.linkos.cz/pacienti/cns_clanek.php (MUDr. Radek Lakomý: Zhoubné nádory mozku a míchy)
2. www.lpr.cz/down/publikace/cns.doc (MUDr. Jan Novotný: Nádory centrálního nervového systému)
3. http://www.qmagazin.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=676&Itemid=61 (Tisková konference, Nemocnice Na Homolce, 9. 3. 2005, MUDr. Vladimír Dbalý)
4. Reardon D.A. et al.: J. Clin. Oncol. **24**, 1253 (2006).
5. Reardon D.A., Wen P.Y.: Oncologist **11**, 152 (2006).
6. Sathornsumetee S., Rich J.N.: Anticancer Drugs **17**, 1003 (2006).

V TOMTO ČÍSLE NAJDETE

Š. Bednář: Biologické palivové články	18
J. Hrdinová: Metody odstraňování anilinu z odpadních vod	21
T. Hudcová: Rod <i>Pseudomonas</i>: Základní charakteristika, tvorba biofilmu	25
K. Slámová: Enzymy prodávané jako potravní doplňky	28
P. Bartík: Mozkové nádory a jejich léčba	31

CONTENTS

Bednář Š.: Biological Fuel Cells	18
Hrdinová J.: Methods of the Anilin Removal from Waste-Water	21
Hudcová T.: Genus <i>Pseudomonas</i>: Basic Characteristics, Biofilm Forming	25
Slámová K.: Enzymes Marketed as Food Adjuncts	28
Bartík P.: Encephaloms and Their Therapy	31

POKYNY PRO AUTORY

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

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

Děkuji

L. Fukal

**BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST**
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

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