

Bio

Ročník 24 • Číslo 2/2014

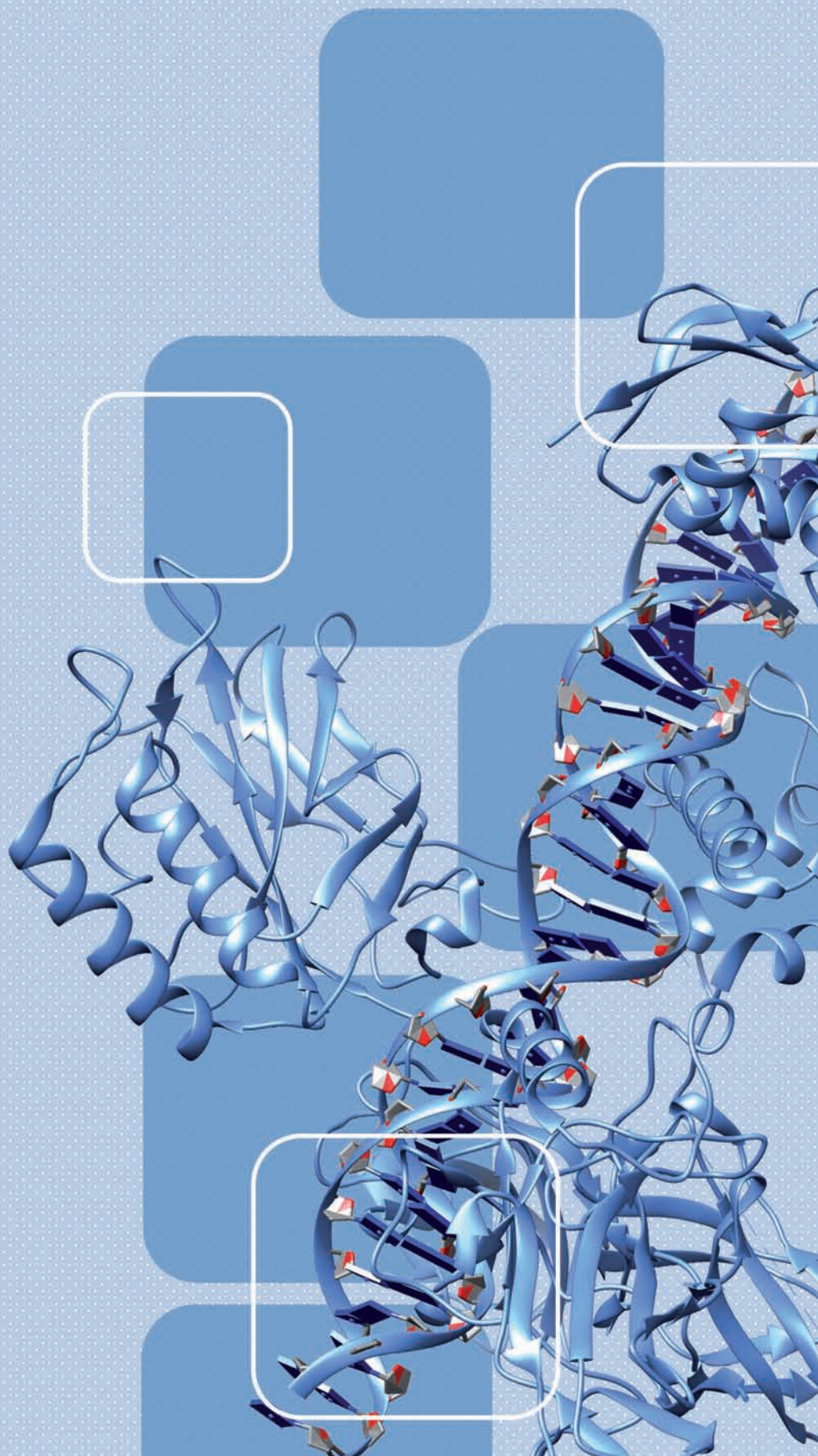
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

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)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

druhé čtvrtletí tohoto roku bylo pro naši společnost velmi náročné. Přes velké vytížení spojené s přípravou mezinárodního symposia BioTech 2014 a s ním spojeného 7. Česko-švýcarského symposia se 13. května uskutečnil tradiční jarní seminář, který se tentokrát věnoval problematice aplikace metagenomiky v biotechnologiích. Přednášku na toto téma přednesl RNDr. Václav Štěpánek, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. a seminář řídil doc. Ing. Ondřej Uhlík, PhD. z Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze.

Hlavní událost roku, zmíněné mezinárodní symposium, úspěšně proběhla opět v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích ve dnech 11.–14.6.2014. Podrobnou zprávu o symposiu přinášíme dále. Na webových stránkách www.biotech2014.cz je k dispozici kniha abstraktů (Book of Abstracts), fotografie z průběhu symposia (Gallery) a mnoho dalších informací.

Na webové stránce <http://www.saworldview.com/tracking-innovation/high-impact/> se autoři příspěvku (editoři „Scientific American Worldview“) zamýšlejí, kterých 10 produktů či procesů z oblasti biotechnologií nejvíce přispělo ke zlepšení kvality života ve světě. Můžete tento názor porovnat se svými představami.

a) v oblasti medicíny:

- Prevence smrtelné nemoci – obrny – umožněná na základě přípravy a testování vakciny Jonasem Salkem (1952)
- Humulin – vyvinutí biosyntetického lidského insulinu genetikem Arthurem Riggsem (1978) a komercializace firmou Genentech
- Monoklonální protilátky – Georg Köhler a César Milstein publikovali v časopise Nature (1975), že myší buňky mohou sloužit jako „továrny“ k přípravě jednoho typu protilátek. V současnosti se monoklonální protilátky, mimo jiné, používají jako terapeutika, např. Herceptin – účinný lék proti rakovině prsu produkovaný firmou Genentech

b) v průmyslu:

- Bioplasty vyráběné z různých složek biomasy (škroby, tuky a j.), nahrazující fosilní zdroje, mají různé přednosti jako např. aplikace obnovitelných zdrojů či biodegradabilita.
- Bio-informační prostředky a IT inovace – výzkum vyžaduje složité analýzy a simulace, budoucí lékařská péče bude závislá na vzrůstajícím počtu vyšetření a léčebných zákroků a na genomických a environmentálních informacích

c) energie

- Biopaliva – rostlinné materiály a řasy mohou být transformovány na bioethanol a další paliva, která jsou v současnosti využívána

d) molekulární biologie

- Polymerasová řetězová reakce (PCR) – technika objevená Kary Mullis (1983) umožnila kopírování DNA a tím, mimo jiné, vytvořila předpoklady pro vývoj nových způsobů diagnózy chorob

- Sekvenování DNA – Současné techniky jsou výsledkem práce řady vědců, které umožňují objasnit genomy nejrůznějších organismů. Jejich vylepšování přináší podstatné zlevnění a tím se stávají běžně dostupnými téměř pro všechna pracoviště. Mimo jiné podpoří rozvoj medicíny.

e) zemědělství

- Bollgard – komerční název pro geneticky modifikovaný bavlník, kdy inkorporace genů z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt) umožnila vznik odrůdy rezistentní vůči hmyzu (1996, Monsanto). Tato technika umožnila vytvoření dalších hmyzu rezistentních odrůd různých ekonomicky významných plodin (např. kukuřice)
- Zemědělské plodiny rezistentní vůči glyfozátu – firma Monsanto v r. 1974 začala produkovat herbicid Roundup založený na glyfozátu. Následně vyvinutí plodin rezistentních vůči tomuto herbicidu umožnilo farmářům hubit plevely tímto herbicidem bez poškození pěstované plodiny

Prudký rozvoj věd je současně spojen s rostoucím fenoménem interdisciplinarity. Pro vědecké pracovníky je čím dál obtížnější si udržet kontakt s příbuznými obory, které jsou však významné pro dění v jeho vlastním oboru. Americká chemická společnost se pokouší tento problém řešit a pro rok 2015 připravuje publikaci nového recenzovaného časopisu *ACS Central Science*, který by přinášel přehled výjimečných a inovativních výsledků výzkumu v celém spektru vědeckých disciplín a zejména demonstroval základní i přesahující potenciál chemie. Časopis se jistě stane inspirací nejen pro širokou obec chemiků, ale i pro všechny vědecké pracovníky, kteří přicházejí s chemií do styku. Zajímavou informací je jistě to, že časopis bude volně přístupný pro všechny zájemce a za publikaci se nebudou platit žádné poplatky.

Závěrem našeho úvodníku bychom, již tradičně, rádi připomněli témata článků, které naleznete v tomto čísle. Pojednávají o acyklických analogiích nukleosidů a acyklických nukleosidfosfonátech, manumycinových antibiotikách, o vakcínách a vakcinaci a o samčím značkovacím feromonu čmeláků.

Všem našim čtenářům přejeme hezké léto a příjemné prožití dovolených.

Se srdečnými pozdravy se těší na Vaše příspěvky
Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

ZPRÁVA Z KONFERENCE

BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium

Biotechnologická společnost spolu s VŠCHT Praha, CzechInvestem a švýcarskými partnery (Institute of Biotechnology, School of Life Sciences and Facility Management LSFM, Zurich University of Applied Sciences ZHAW a švýcarskými biotechnologickými organizacemi) pořádaly ve dnech 11.–14. června 2014 v NTK již šesté symposium, které bylo otevřeno všem zájemcům z oblasti biotechnologií. Symposia se zúčastnilo 265 odborníků z 32 zemí. Nejvyšší účast byla jako tradičně z ČR (133) a Švýcarska (46). V hlavním programu symposia bylo předneseno 77 ústních sdělení a prezentováno 120 posterů. Tento hlavní program doprovázely ještě tři workshopy (How to get manuscript published, Biotechnology for controlled remediation a International Postgraduate Research Program).

Při oficiálním zahájení symposia jeho účastníky pozdravili rektor VŠCHT Praha prof. Karel Melzoch, zástupce ředitele LSFM ZHAW prof. Daniel Baumann, zástupce švýcarského velvyslanectví v ČR p. Werner Bardill a starostka Prahy 6 Ing. Marie Kousalíková. Situaci v oblasti biotechnologií ve Švýcarsku a v ČR a zejména spolupráci švýcarských a českých biotechnologů od sametové revoluce po dnešek zhodnotili zakladatelé česko-švýcarských symposií Hans-Peter Meyer a Jan Káš. Po plenární přednášce prof. Pačese „On the origin of life on the earth“ vystoupili se svými prezentacemi představitelé tří hlavních sponzorů, a to Robert Kužela, Lonza Biotec, ČR, Christoph Bremus, Europe Eppendorf, Německo a Dirk Hebel, Infors HT, Švýcarsko. Toto symposium bylo také prvním, kdy jednání probíhala v paralelních sekcích. To umožnilo obsah symposia tematicky rozšířit a umožnit více účastníkům ústně prezentovat své příspěvky. Abstrakta přednášek přednesených v následujících sekcích i prezentovaných posterů je si možno přečíst v „Book of Abstracts“, která je dostupná na webové stránce symposia www.biotech2014.cz:

- **Large and Small Molecules for Pharma**
- **Food, Feed and Nutrition**
- **Biomaterials and Biochemicals**
- **Environmental Biotechnology**
- **Biorefinery**
- **Microalgae Biotechnology**

Sponzoři (Elsevier, DSM a Wiley) umožnily organizátorům ocenit nejlepší postery finančními odměnami, knihami a ročním předplatným časopisu *Biotechnology Advances*.

Finanční odměnu ve výši 500 EUR obdrželi:

1. K. Richterová, ČR : Heterologous expression of three laccases from different source of origin in yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and their use for environmental application

2. S. Kübler, Švýcarsko: Antioxidant properties in extracts of microalgal biomass produced biotechnologically under heterotrophic culture conditions
3. F. Krujatz, Německo: Organic light for organic production a novel scale OLED-based photobioreactor

Finanční odměnu ve výši 250 EURO obdrželi:

1. A. Macůrková, ČR: *De novo* designed short antimicrobial lipopeptides: biophysical and biological properties
2. E. Bedrlíková, ČR: Fungal b-rutinosidases: Structure – function study

Právě vyšlou knihu „Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells“ (Hans-Peter Meyer, Diego Schmidhalter, ISBN: 978-3-527-33547-3) × **obdrželi:**

1. P. Ferreira, Portugalsko: Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* under increased pressure
2. E. Potocká, Slovensko: Enzymatic synthesis of bioactive compounds: glucosylation of tyrosol
3. A. Gallazi, Itálie: Continuous production of n-butanol from glycerol using *Clostridium pasteurianum* (DSM525) cells immobilized on corn stover

Více informací o knize naleznete na webu:

<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-3527335471.html>

Předplatné časopisu *Biotechnology Advances* a možnost bezplatné publikace v placeném on-line časopise obdrželi:

1. H. Raschmanová, ČR: Influence of cultivation condition on production and secretion of fusion protein trypsinogen-EGFP by *Pichia pastoris* yeast
2. M. Nováková, ČR: Evaluation of endophytic and rhizospheric microflora of transgenic plants prepared for phytoremediation of polychlorinated biphenyls

Vybrané přehledné články významných přednášejících budou otištěny v prestižním biotechnologickém časopise *Biotechnology Advances* (Elsevier).

Organizátoři symposia připravili pro jeho účastníky i bohatý sociální program, který zahrnoval návštěvu břevnovské pivovaru s ukázkou výroby středověkého piva i jeho ochutnávku, večeři v břevnovském klášteře, večerní prohlídku Prahy, exkurzi do budějovického Budvaru i návštěvu Českého Krumlova. Účastníci symposia se vyjadřovali velmi pochvalně o jeho průběhu a stáli návštěvníci česko-švýcarských symposií označili to letošní jako nejlepší.

Závěrem této krátké zprávy bychom rádi poděkovali všem partnerům, sponzorům, účastníkům i dobrovolným pomocníkům za jejich příspěvek ke zdaření symposia a těšíme se na shledání za 3 roky (t.j. v roce 2017) ve na 7. Česko-švýcarském symposiu



ŽIVOTNÍ JUBILEUM Prof. Ing. JANA KÁŠE, DrSc

V květnu tohoto roku se prof. Ing. Jan Káš, DrSc. dožil v plné svěžesti a pracovním nasazení 80ti let. Všem, kdo profesora Káše znají, se bude zdát toto sdělení neuvěřitelné, protože jeho životní elán a postoje odpovídají osobnosti výrazně mladší.

Prof. Káš v roce 1957 získal po studiu na fakultě potravinářské technologie (nyní fakulta potravinářské a biochemické technologie FPBT) titul inženýra chemie. Po čtyřletém působení v potravinářské praxi nastoupil na kandidaturu na tehdejší katedru biologických věd (nyní ústav biochemie a mikrobiologie) VŠCHT, kde prošel všemi stupni ve výuce i výzkumu až k profesuře z biochemie. Vyučoval v laboratorních cvičeních, na jejichž přestavbě měl významnou roli, přednášel biochemii, biotechnologie a další specializované předměty z oblasti enzymologie, biochemických technik a imunochemie. Organizoval již v šedesátých letech minulého století na

ústavu kurzy s účastí zahraničních expertů. Vychoval řadu studentů inženýrského a doktorského studia, kteří se uplatnili v průmyslu a na vědeckých ústavech nejen doma, ale i v zahraničí. V letech 1994 – 2000 byl vedoucím ústavu a toto období mělo pro vývoj ústavu, zejména vzhledem k navázání mnohočetné zahraniční spolupráce a získání významných mezinárodních grantů, značný význam, neboť umožnilo vybudovat moderní ústav na úrovni srovnatelné s významnými zahraničními pracovišti.

Jeho iniciativa byla a stále je velmi široká a sahá od pedagogické práce, přes vědecko-výzkumnou činnost až po rozsáhlé aktivity organizační. Je předsedou oborové rady v oboru biochemie na FPBT VŠCHT Praha a členem oborových rad na PŘF UK v Praze a UP v Olomouci. Jeho významným počinem bylo založení Biotechnologické společnosti, která je zakládajícím

členem Českého svazu vědeckotechnických společností a členem Evropské biotechnologické federace (European Federation of Biotechnology). Do dnešních dnů je předsedou této společnosti a redaktorem Bulletinu biotechnologické společnosti BIOPROSPECT, jehož vznik rovněž inicioval. Je iniciátorem myšlenky společných mezinárodních biotechnologických symposií, kterou spolu s Dr. Hans-Peter Meyerem z Lonzy realizoval formou Česko-švýcarských biotechnologických symposií. V současnosti se podílel na přípravě již šestého symposia, které se uskutečnilo v r. 2014 v Praze. Profesor Káš je též členem Rady nově vytvořeného Biotechnologického ústavu AV ČR i členem Koordinačního výboru projektu UNEP/GEF „Implementation of the Draft NBF for the Czech Republic“, na jehož realizaci spolupracuje s Ministerstvem životního prostředí a řadou dalších státních institucí i nevládních organizací.

V oblasti vědecko-výzkumné se prof. Káš věnoval zejména enzymologii, imunochemii a biosenzorům. Publikoval více než 200 původních sdělení, převážně v zahraničních časopisech, více jak 70 přehledných článků a je spoluautorem 12 patentů i řady učebních textů a kapitol v monografiích. V devadesátých letech byl koordinátorem celkem tří mezinárodních projektů EU TEMPUS. V posledních letech koordinoval dva projekty USA (USIA a CZ/US program), 2 granty EU (Copernicus) a řadu projektů GA ČR i FRVŠ i mezinárodní projekt UNEP/GEF „National Biosafety Framework for the Czech Republic“ (Opatření k biologické bezpečnosti v České republice).

Prof. Káš byl a v některých případech stále je aktivním členem a funkcionářem renomovaných domácích a zahraničních společností a organizací. Mezi nejvýznamnější z nich patřila funkce sekretáře komise pro biotechnologie IUPAC. Ze současných funkcí je to již zmíněné

předsednictví Biotechnologické společnosti ČR a její zastupování v European Federation of Biotechnology, členství v redakčních radách Food and Agricultural Immunology (Karger), Biotechnology Advances (Elsevier), Chemických listů a bulletinu Bioprospect. Je též členem České společnosti chemické, Komitétu pro biochemii a molekulární biologii, České společnosti pro biochemii a molekulární biologii, Americké chemické společnosti. Po několika obdobích byl členem vědeckých rad VŠCHT, FPBT VŠCHT, 1. LF UK v Praze, Chemické fakulty Slovenské technické univerzity v Bratislavě a Ústavu genetiky a fyziologie AV ČR. Zastával též funkci proděkana FPBT VŠCHT.

Za svou práci byl prof. Káš oceněn Ballingovou medailí, Medailí italských agronomů, Votočkovou medailí, Medailí Josefa Hlávky pro nestory a významné osobnosti vědy a umění a u příležitosti 20. výročí jím založené České biotechnologické společnosti čestným uznáním České rady ČSVTS a Medailí Františka Palackého.

Suchý výpis aktivit profesora Káše, jeho funkcí, členství v redakčních radách i jeho ocenění dává tušit, kolik práce v oblasti vědy a pedagogiky vykonal a jaký respekt a renomé si v oblasti biochemie a biotechnologie získal jak doma tak v zahraničí. Do dějin Ústavu biochemie a mikrobiologie na VŠCHT se zapsal nesmazatelným písmem jako osobnost, která zmodernizovala ústav a vyvedla ho na mezinárodní úroveň.

Přejeme prof. Kášovi, aby mu ještě po dlouhou dobu vydržela jeho činnost a elán, s nímž se pouští do další práce a do řešení ne vždy jednoduchých záležitostí.

Hodně zdraví a dalších úspěchů!

Blanka Králová

ODBORNÉ PŘÍSPĚVKY

BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A PROLÉČIVA ACYKlickÝCH ANALOG NUKLEOSIDŮ A ACYKlickÝCH NUKLEOSIDFOSFONÁTŮ

Jiří Blažek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, v.v.i., Praha, jiri.blazek@centrum.cz

Úvod

Acyklická analoga složek nukleových kyselin patří dnes k běžnému repertoáru antivirální a protinádorové terapie. Ačkoli jejich prvním zástupcům bude již téměř 40 let, výzkum této třídy látek stále pokračuje s nezmenšeným úsilím. Přitom jsou objevovány nejen nové struktury, ale i nové oblasti použití a biologických aktivit. Tak se látky původně plánované jako antivirotika prokázaly jako účinné i vůči prvokům, bakteriím, ve veterinární medicíně, či léčbě lidských nádorů.

I přes svoji velmi úspěšnou kariéru však tyto látky nejsou zcela dokonalé a jejich terapeutické použití naráží na řadu problémů. Vedle nefrotoxicity u acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) je to především nízká biologická dostupnost acyklických analogů složek nukleových kyselin obecně. Tento článek se přitom zaměřuje především na příčiny nízké biologické dostupnosti a na řešení vedoucí ke zvýšení biologické dostupnosti acyklických analog nukleosidů a nukleotidů.

Biologická dostupnost acyklických analog nukleosidů a nukleotidů

Nízká biologická dostupnost je sice obecným znakem diskutované třídy látek, její příčina je však pro jednotlivé typy těchto sloučenin rozdílná. V případě acyklických analog nukleosidů je hlavním nedostatkem relativně nízká rozpustnost za fyziologických podmínek. Např. acyklovir (ACV) je možné dokonale rozpustit až v oblasti pH ~ 11¹. Jeho rozpustnost ve vodě se pohybuje okolo 0,2 % při 25 °C². Výrazně lepších výsledků nedosahují ani ostatní acyklické deriváty nukleosidů, jako penciklovir, ganciklovir, či (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin ((S)-DHPA). To se odráží ve velmi nízké biologické dostupnosti léčiva při perorálním podání, která se pro ACV pohybuje v rozmezí 15 – 20 %², i když jiné zdroje udávají i 30% dostupnost³. Pro penciklovir a ganciklovir je přitom nutno počítat s ještě nižší biologickou dostupností². Tento problém může být vyřešen infuzním podáním^{2,3}. V minulých letech bylo zjištěno, že (S)-DHPA⁴, acyklovir⁵ i ganciklovir^{6,7} jsou transportovány do buněk usnadněnou difúzí transmembránovými proteiny, transportující buď nukleosidy, nebo nukleobáze. Samotný transport do buňky je však možno ovlivnit pouze zvýšením koncentrace léčiva v krvi, a tedy vyšším dávkováním. To ovšem pouze do nasycení transportního proteinu substrátem a dosažení limitní rychlosti transportu. Infuze i vysoké dávky přitom zatěžují pacienta, prodražují léčbu a komplikují ji.

Potíže s podáváním ANP jsou spojené hlavně s jejich rychlým vylučováním, a s tím souvisejícím krátkým poločasem v krevní plazmě¹. Díky své struktuře, obsahující ve fyziologickém pH nabitou fosfonátovou skupinu, se ANP obtížně resorbují střevní stěnou a velmi špatně transportují do buňky přes cytoplasmatickou membránu (na druhou stranu tato vlastnost zaručuje také jejich dlouhé setrvání uvnitř buňky). S rychlou eliminací těchto látek z organismu ledvinami je také spojena jejich nefrotoxicita⁸.

Pro vyřešení těchto problémů bylo vyvinuto několik typů proléčivových forem, jež mají zlepšit transport léčiva do buněk a případně zvýšit jeho rozpustnost za fyziologických podmínek. Ačkoli se tyto systémy u acyklických analog nukleosidů a ANP navzájem podobají, budou v následujícím textu pojednávány odděleně.

Proléčivové formy acyklických analog nukleosidů

V minulosti byla podniknuta řada kroků pro nalezení optimální proléčivové formy ACV, pencikloviru i gancikloviru. V případě acykloviru byla pro zvýšení rozpustnosti provedena syntéza esterů aminokyselin, z nichž největší rozšíření a úspěch dosáhl ester L-valinu, obecně známý pod názvem valacyklovir^{2,3}. Zavedením aminokyseliny do molekuly přineslo zvýšení rozpustnosti díky ionizovatelné aminoskupině, jež za fyziologického pH nese kladný náboj. Současně bylo zjištěno, že valacyklovir je přenášen střevními a ledvinovými transportéry peptidů PEP1 a PEP2⁹ a transportním proteinem hPEPT1, přičemž je transport následován rychlou hydrolýzou na ACV a L-valin² ve sliznici střeva a v játrech³. Tento přístup vedl ke zvýšení biologické dostupnosti při

perorálním podání až na 50 %³. Z biotechnologického hlediska je zajímavé, že teprve v nedávné době byla publikována enzymová syntéza valacykloviru enzymovou transesterifikací katalyzovanou komerčně dostupnými proteasami¹⁰. Jiným přístupem bylo vyvinutí fosfolipidového proléčiva ACV – sn-1,2-dimyristoylglycerol-3-difosfo-acykloviru. Toto profarmakum nejenže bylo transportováno dobře membránou, ale navíc bylo schopno obnovit účinnost ACV i vůči viru herpes simplex (HSV) s mutací thymidinkinasy, který se vůči terapii ACV stal rezistentním¹¹.

Za dvoustupňové proléčivo pencikloviru je možno pokládat famciklovir podávaný jako diacetát^{1,2,3}. Proléčivo je nejprve hydrolyzováno a dále převedeno na penciklovir reakcí katalyzovanou aldehydoxidasou². Biologická dostupnost pencikloviru z famcikloviru vzrůstá z 5 % na 80 %^{2,3}.

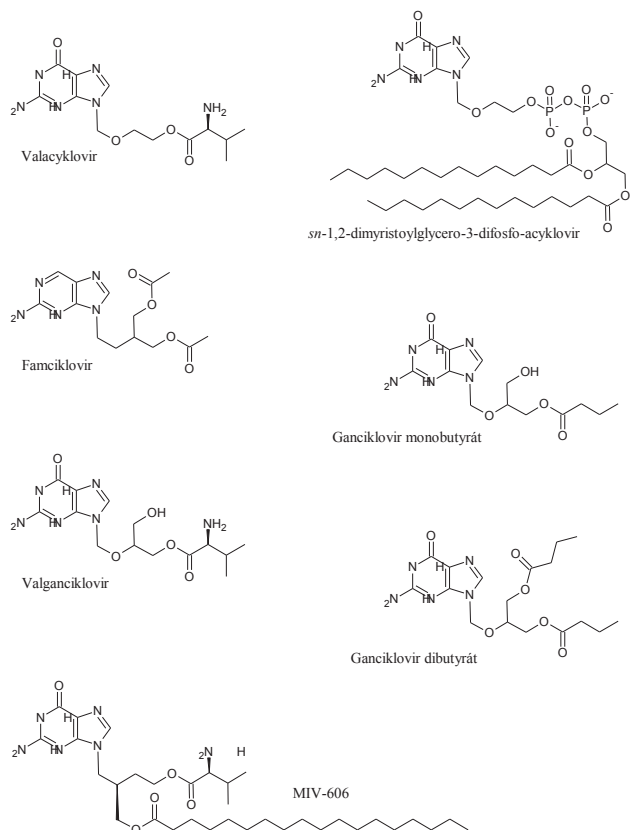
Stejně jako u acykloviru, bylo i pro ganciklovir etablováno proléčivo ve formě esteru s aminokyselinou L-valinem. Mechanismus přenosu i aktivace je přitom analogický valacykloviru^{2,12}. Vedle tohoto proléčiva byly testovány i možnosti syntézy¹³ a nasazení mono- a diesterů karboxylových kyselin a gancikloviru. Problémem tohoto systému ovšem bylo další snížení rozpustnosti získaných látek ve srovnání s výchozím ganciklovirem. Jako řešení nabídli autoři možnost komplexace připravených esterů s cyklodextriny, což sice vedlo k zvýšení stability a rozpustnosti, transport do buňky se ale touto strategií zlepšit nepodařilo¹⁴. I v případě gancikloviru byla použita strategie tvorby fosfolipidů, pro něž byl v případě tohoto léčiva vypracován transportní systém používající lipidová proléčiva v krystalické formě¹⁵.

Veskrze zajímavým přístupem je syntéza kombinovaného proléčiva MIV-606 odvozeného od (R)-(9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guaninu, označovaného jako H2G. H2G byl objeven jako nadějný inhibitor DNA-polymerasy VSV, jeho biologická dostupnost však dosahovala pouhých 17 %. Převedením na MIV-606, což je vlastně kombinovaný ester H2G s L-valinem a kyselinou okta-dekanovou byla biologická dostupnost zvýšena na více než 70 %².

Obecně se dá shrnout, že příprava profarmak acyklických analog nukleosidů využívá jako hlavní nástroj esterifikaci hydroxylových skupin. Použitím aminokyselin se nejen zvyšuje rozpustnost získaných sloučenin, ale navíc je možné pozorovat benefit ve formě usnadněného transportu přes střevní epitel. Esterifikace mastnými kyselinami, nebo převedení na fosfolipidy sice problém rozpustnosti neřeší, podstatně ale usnadňuje transport přes buněčné membrány. Příklady výše diskutovaných struktur ukazuje obr. 1.

Podobná strategie – převedení na ester – stála za nedávno publikovanou studií přípravy lipofilních proléčiv dihydroxypropyladeninu (DHPA), prodávaného pod názvem Duviragel¹⁶. Autoři zde zvolili enzymovou syntézu pomocí různých lipas, přičemž tímto způsobem bylo možné připravit širokou paletu esterů s navázanou karboxylovou kyselinou na primární hydroxylové skupině DHPA se středními výtěžky.

Dalším přístupem pro zlepšení rozpustnosti acyklických analog nukleosidů je jejich převedení na glykosidy. I zde byla v nedávné minulosti použita enzymová



Obr. 1: Proléčiva acyklických analog nukleosidů

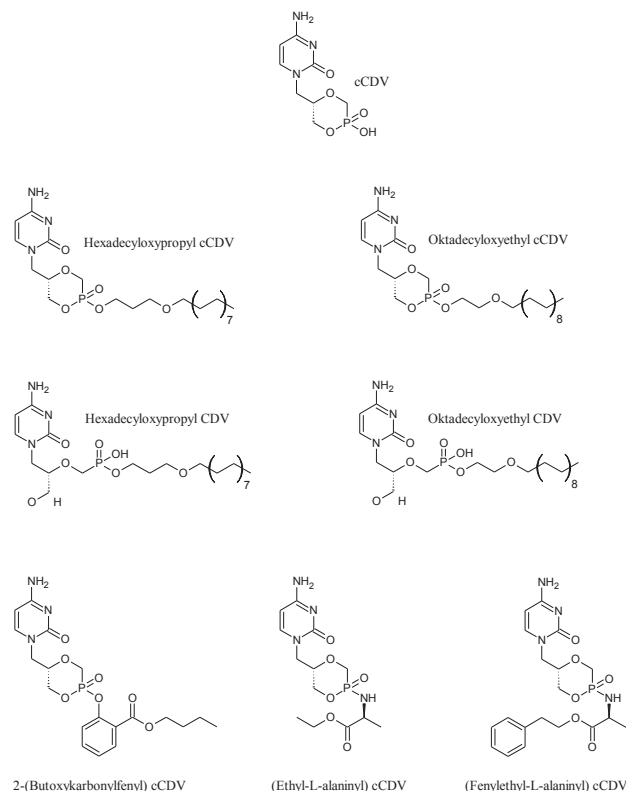
syntéza¹⁷, která je známa již z chemie nukleosidů^{18,19,20}. V rámci této studie bylo možné ukázat, že jednoduchým biotechnologickým postupem je možné rychle a snadno syntetizovat přesně definované glykosidy acyklických analog nukleosidů vykazující rozmanitou strukturu v uspokojivých výtěžcích.

Proléčivové formy ANP

Hlavním cílem přípravy proléčiv ANP je maskování jejich fosfonátové skupiny, a tím eliminace náboje, který brání přechodu přes membránu. Pro zvýšení transportu membránou se současně usiluje o vytvoření vhodné lipofilní struktury. V širokém spektru vyvinutých systémů můžeme nalézt analogy fosfolipidů, jednoduché estery, či amidáty.

Poměrně široce zkoumaným ANP je cidofovir (CDV). To je dáno jednak tím, že se jedná o první ANP, připuštěný na farmaceutický trh, ale také tím, že samotná látka je poměrně nefrotoxická, což omezuje její dávkování, a v malé míře transportovaná do buňky pomocí pinocytózy^{2,8}. Prvním úspěšným řešením těchto problémů se ukázala být cyklizace molekuly za vzniku cyklického CDV (cCDV). Za zachování biologické aktivity bylo možné tímto krokem redukovat vedlejší účinky, transport do buňky se však vyřešit nepodařilo^{2,8}. Stejně jako CDV je i cCDV transportován do buňky pinocytózou. Problém transportu se podařilo vyřešit až esterifikací zbývajících funkčních skupiny CDV^{2,21}. Inspirací pro tento krok byla struktura fosfolipidů, o nichž bylo známo, že část z nich prochází střevním epitelem v nezměněném stavu. Byly připraveny a zkoumány série alkoxyalkylesterů s různými spojovacími elementy (propandiol, ethandiol, glycerol) a alkylysterů s proměnnými délkami řetězce.

Všechny zkoumané série přitom byly připraveny jak pro CDV, tak i pro cCDV. Prakticky u všech syntetizovaných látek přitom bylo možné prokázat zvýšenou biologickou aktivitu v porovnání s mateřskými látkami^{21,22,23}. Pro hexadecyloxypropylester cCDV byl navržen podobně jako pro ganciklovir transportní systém využívající krystalické lipidové proléčivo¹⁵. Vedle těchto esterových proléčiv opírajících se svojí strukturou o lipidy, byla připravena i amidátová proléčiva jak CDV, tak i cCDV. Všechny připravené látky přitom vykazovaly vyšší aktivitu než mateřská sloučenina²⁴, zdaleka ne však takovou, jako výše zmíněné estery^{22,24}. Ačkoli byla vyvinuta řada profarmak CDV, obsahuje licencovaný lék VistideTM pouze základní molekulu CDV¹. Proléčiva CDV a cCDV diskutované v této pasáži ukazuje obr. 2.



Obr. 2: Proléčiva CDV a cCDV

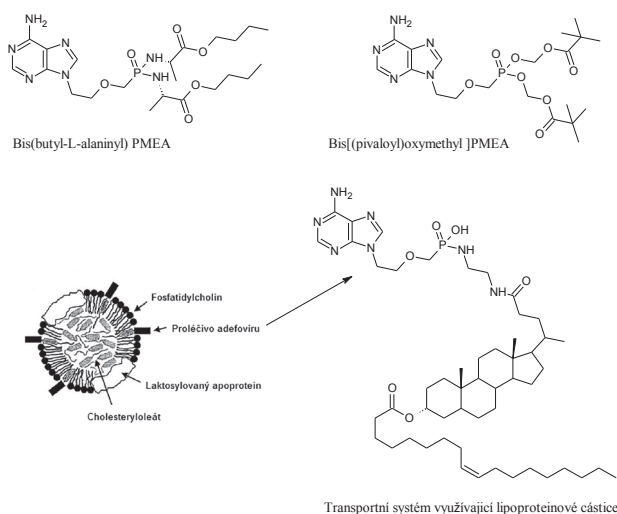
V případě adefoviru (PMEA) vedlo převedení na amidát s butyl-L-alaninem k signifikantnímu zlepšení biologické aktivity²⁴. PMEa se ale dnes podává pacientům s chronickou hepatitidou B v jednom léku s licenci – HepseraTM. Zde je mateřská sloučenina převedena na bis(pivaloyloxymethyl)ester (adefovir dipivoxil)^{1,2}, který je rychle transportován do buňky, kde je aktivován na PMEa a následně fosforylován až na difosfát PMEa²⁵. Pro zlepšení účinnosti vůči viru hepatitidy B (HBV) byl vypracován i nosičem podporovaný transport PMEa pomocí lipidových tělísek do jater²⁶. Pro tento účel byl připraven amidát PMEa s lithocholovou kyselinou-3 α -oleátem, inkorporovaný do lipoproteinových částic Lac-NeoHDL. Autoři studie ukázali, že takto připravené proléčivo je specificky dopravováno do jater, vykazuje nižší toxicitu než mateřská sloučenina, má vyšší biologickou aktivitu měřenou jako EC₅₀ a zaručuje vyšší intracelulární koncentraci PMEa, než při použití samotné účinné látky. Diskutovaná proléčiva PMEa prezentuje obr. 3.

Opět zajímavá je nedávno publikovaná příprava nového typu esterových proléčiv adefoviru a cidofoviru s volnou hydroxylovou skupinou na konci alkylového řetězce navázaného na fosfonátovou skupinu ANP²⁷. Tato volná skupina totiž umožňuje připojení dalších struktur, které by mohly léčivo např. cílit k požadovaným buňkám, nebo jinak pozměňovat jeho farmakologické vlastnosti.

Tenofovir, poslední z řady ANP s přidělenou licencí, je podáván ve formě bis(isopropoxykarbonyloxymethyl) esteru (tenofovir disoproxil fumarát) (viz obr. 4). I toto proléčivo je dobře transportováno do buněk a po hydrolýze uvolní aktivní látku^{1,2}.

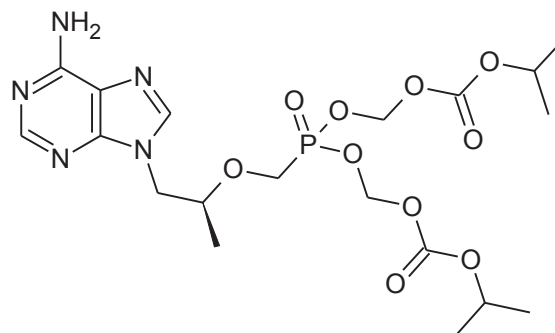
Závěr

V minulosti byla podniknuta řada kroků pro zlepšení biologické dostupnosti acyklických analogů složek



Obr. 3: Proléčiva PMEA

nukleových kyselin. Ačkoli se tímto způsobem podařilo vyřešit značnou část problémů spojených s biologickou dostupností, výzkum v této oblasti pokračuje dál. Hledají se nové cesty pro cílení léčiv, zlepšení jejich specifického účinku a snížení vedlejších účinků. Z biotechnologického hlediska pozoruhodné je, že i zde se alespoň výjimečně dostaly ke slovu enzymy, které byly použity pro syntézu některých proléčiv. Další budoucnost ukáže, zda enzymové přístupy k přípravě proléčiv budou stále častěji využívány, anebo se bude jednat pouze o přechodnou záležitost, která zapadne stejně rychle, jako se objevila. Práce na vývoji proléčiv acyklických analogů nukleosidů a nukleotidů tak i nadále zůstává atraktivním polem činnosti organochemického, farmaceutického a aplikovaného výzkumu.



Obr. 4: Tenofovir disoproxil

Literatura

- Holý A: Principy biororganické chemie ve vývoji anti-virotik a cytostatik. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2004
- De Clercq E, Field HJ: *Br. J. Pharmacol.* 147, 1 (2006).
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M: Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, Praha 2002
- Dragún M, Rada B, Holý A: *Acta Virol.* 27, 119 (1983).
- Mahony WB, et al.: *J. Biol. Chem.* 263, 9285 (1988).
- Mahony WB, Domin BA, Zimmermann TP: *Biochem. Pharmacol.* 41, 263 (1991).
- Haberkorn U, et al.: *Nucl. Med. Biol.* 25, 367 (1998).
- Holý A: *Curr. Pharm. Des.* 31, 2567 (2003).
- Ganapathy ME, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 470 (1998).
- McClean K, et al.: *Tetrahedron Lett.* 52, 215 (2011).
- Hostetler KY, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11835 (1993).
- Brodin B, et al.: *Pharmacol. Toxicol. (Copenhagen)* 90, 285 (2002).
- Gao H, Mitra AK: *Tetrahedron Lett.* 41, 1131 (2000).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14621977>, staženo 21.ledna 2014.
- Cheng L, et al.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 45, 4138 (2004).
- Brabcová J, et al.: *Molecules* 17, 13813 (2012).
- Blažek J, et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 20, 3111 (2012).
- Andreotti G, Trincione A, Giordano A: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 47, 28 (2007).
- Zeng QM, Zong MH: *Biotechnol. Lett.* 32, 1251 (2010).
- Ye M., et al.: *J. Biotechnol.* 155, 203 (2011).
- Wan WB, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 656 (2005).
- Hartline CB, et al.: *J. Infect. Dis.* 191, 396 (2005).
- Hostetler KY: *Viruses* 2, 2213 (2010).
- Keith KA, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2193 (2003).
- Srinivas RV, et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2247 (1993).
- Bijsterbosch MK, et al.: *Mol. Pharmacol.* 60, 521 (2001).
- Tichý T, et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3527 (2011).

Souhrn

Blažek J.: Biologická dostupnost a proléčiva acyklických analog nukleosidů a acyklických nukleosidfosfonátů

Acyklická analoga složek nukleových kyselin jsou látky s velmi širokým spektrem účinku. Jejich použití přitom stále naráží na překážky spojené s jejich biologickou dostupností, případně vedlejšími účinky. Tyto problémy byly v minulosti řešeny mimo jiné přípravou různých profarmak. Tento článek v kostce představuje výběr použitých strategií, přičemž pozornost je věnována v neposlední řadě biotechnologickým úvahám a postupům v rámci přípravy představených struktur.

Klíčová slova: Proléčiva, acyklická analoga, nukleosidy, nukleotidy, acyklické nukleosidfosfonáty

Summary

Blažek J.: Bioavailability and prodrugs of acyclic nucleoside analogs and acyclic nucleoside phosphonates

Acyclic analogs of nucleic acids components are compounds with a broad spectrum of action. Their use collides with hurdles associated with their biological availability, or with side effects. In the past, these problems were solved for example by preparation of different prodrugs. This paper presents briefly a selection of used strategies, last but not least with respect to the biotechnological reflections and methods on the field of preparation of the presented structures.

Keywords: Prodrugs, acyclic analogs, nucleosides, nucleotides, acyclic nucleoside phosphonates

MANUMYCINOVÁ ANTIBIOTIKA A JEJICH PERSPEKTIVY

Jan Kolek

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze, kolekj@vscht.czz

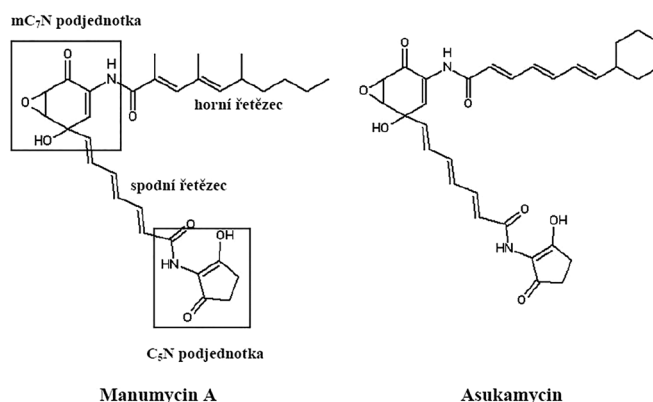
Úvod

Manumycinová antibiotika jsou malou skupinou sekundárních metabolitů, které jsou produkovány některými druhy bakterií rodu *Streptomyces*. Jedná se o skupinu nízkomolekulárních látek, řadících se dle způsobu biosyntézy mezi polyketidy. Vykazují různorodé, potenciálně využitelné, biologické aktivity. Ty jsou také důvodem jejich neustálého výzkumu. Kromě biologických aktivit jsou manumyciny zkoumány i jako významný model polyketidové biosyntézy, především potom iterativních polyketid-syntáz.

Skupina manumycinových antibiotik

Manumycinová antibiotika se řadí podle způsobu biosyntézy do velké skupiny polyketidových látek. Mezi ně patří i mnohá další, farmaceuticky významná antibiotika, jako jsou např. tetracykliny (chlortetracyklin, oxytetracyklin), makrolidy (erythromycin, klarithromycin) nebo polyethery (monensin). Kromě antibiotik můžeme mezi polyketidy nalézt také např. v současnosti používaná imunosupresiva (rapamycin) či látky s kancerostatickými účinky (doxorubicin). Všechny polyketidy jsou syntetizovány buněčnými multienzymatickými komplexy polyketid-syntáz (PKS).

Manumycinová antibiotika představují v rámci polyketidových metabolitů poměrně malou skupinu látek. V současnosti je známo okolo čtyřiceti zástupců. Manumyciny jsou si navzájem podobné chemickou strukturou i některými biologickými aktivitami. Všechny dosud popsané manumyciny jsou produkovány bakteriemi rodu *Streptomyces*, izolovaných zpravidla z půdy, popř. z vodního prostředí. Celá skupina dostala svůj název podle prvního objeveného zástupce, manumycinu A (Obr. 1), který byl poprvé izolován z producenta *Streptomyces parvulus* Tü64 již v roce 1963¹.

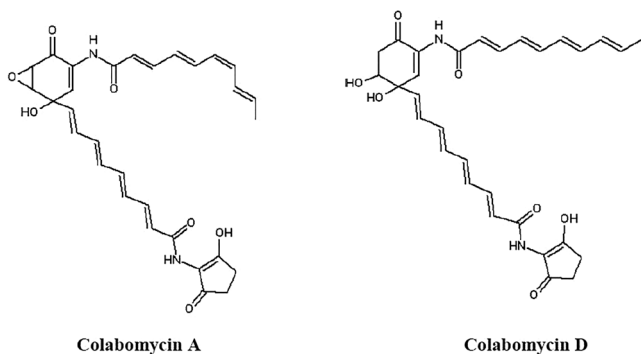


Obr. 1: Struktura manumycinu A a asukamycinu. Poloha mC₇N podjednotky, C₅N podjednotky a polyketidových řetězců.

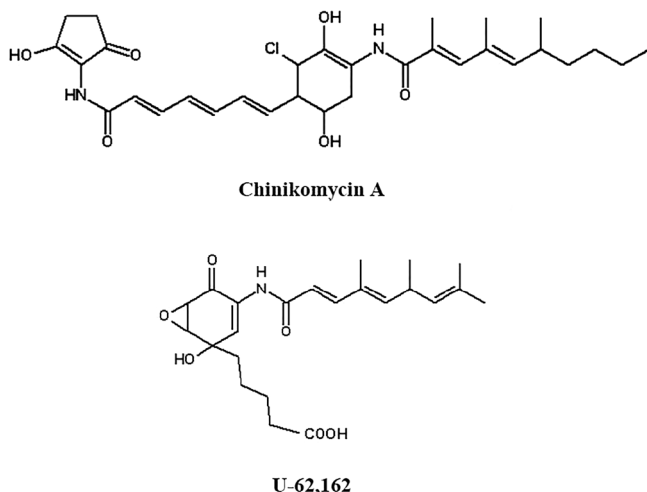
Struktura

Všechny manumyciny jsou tvořeny základní, tzv. mC₇N, podjednotkou, ke které jsou v pozicích C2 a C4 navázány dva krátké, lineární, polyketidové řetězce, označované jako horní a spodní (Obr. 1). Další součástí molekuly může být ještě tzv. C₅N podjednotka, kterou se velmi často zakončuje spodní polyketidový řetězec (Obr. 1). Podjednotka mC₇N (chemicky 2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxycyklohex-2-enon) je nejvíce konzervovanou strukturou mezi manumyciny. Nejčastěji se mezi jednotlivými izoláty mírně liší pouze v pozici C5 a C6. Tzv. manumyciny typu I nesou v pozici C5/C6 vázanou epoxydovou skupinu, zatímco manumyciny typu II nesou pouze hydroxylovou skupinu v pozici C5² (Obr. 2).

Ke konverzi mezi manumyciny typu I a II může docházet enzymatickou či samovolnou oxidací vázané epoxydové skupiny³. Větší možná rozmanitost ve struktuře mC₇N podjednotky byla popsána teprve v roce 2005 u jednoho z posledních objevených manumycinů,



Obr. 2: Struktura colabomycinu A a colabomycinu D. Rozdíl mezi manumyciny typu I a II v epoxydové nebo hydroxylové skupině vázané na mC₇N podjednotku.



Obr. 3: Struktura chinikomycinu A, který má výrazně odlišnou strukturu mC₇N podjednotky od ostatních známých manumycinů a struktura izolátu U-62,162, který má, jako jediný známý zástupce manumycinů, plně saturovaný spodní řetězec.

chinikomycinu A. Jeho mC₇N podjednotka nese navíc vázaný atom chlóru a má připojené polyketidové řetězce v pozici C2 a C5, na rozdíl od klasické pozice C2 a C4⁴ (Obr. 3).

Spodní polyketidový řetězec nabývá nejčastěji podoby trans-trienového, šestiuhlíkatého řetězce. Existují však manumyciny s delším, tetraenovým (colabomycin)⁵ nebo naopak kratším, dienovým řetězcem (např. U-62,162) (Obr. 2 a 3). Izolát U-62,162 má navíc, jako prozatím jediný objevený zástupce, plně saturovaný spodní řetězec⁶ (Obr. 3).

Horní polyketidový řetězec je nejméně konzervovanou strukturou manumycinových látek. Mezi jednotlivými izoláty se liší ve své délce, počtem a polohou dvojných vazeb, větvením či metylacemi. Dle způsobu biosyntézy horního řetězce může být zakončen nasycenou skupinou v rozmezí metylu až větveného hexylu. U několika izolátů (např. asukamycin) je horní řetězec zakončen cyklickou cyklohexanovou skupinou².

Biologické aktivity

Hlavním důvodem neustálého výzkumu manumycinových antibiotik a jejich biosyntézy jsou jejich biologické aktivity. Jako první bylo popsáno jejich antimikrobiální působení. Odtud také pochází zažitý název celé skupiny – manumycinová antibiotika. Manumyciny

typu I vykazují významnou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním bakteriím. Naopak vůči gram-negativním druhům nevykazují prakticky žádné baktericidní ani bakteriostatické účinky^{7, 8, 9, 10, 11}. Výjimkou jsou pouze manumycin E, F a G, u kterých byla popsána slabá bakteriostatická aktivita vůči gram-negativní bakterii *Escherichia coli*¹¹. Manumyciny typu II nevykazují žádné antimikrobiální účinky ani ve vysokých koncentracích¹².

Patrně nejprobádanější jsou jejich potenciální cancerostatické účinky. U manumycinu A byla popsána významná aktivita inhibice ras-farnesyltransferázy¹³. Jedná se o enzym, který je nezbytný pro funkčnost malého signálního G-proteinu ras. Ten má klíčovou úlohu v regulaci buněčného růstu a dělení. Odhaduje se, že mutace v genu pro ras protein je zodpovědná přibližně za 20 % všech nádorů a až 90 % nádorů pankreatu¹⁴. Zablokováním buněčné ras-farnesyltransferázy dochází k zastavení vzniklého nekontrolovatelného buněčného růstu. Velkou výhodou manumycinu A oproti ostatním cancerostatickým preparátům pracujícím na bázi blokády buněčné ras-farnesyltransferázy je jeho vysoká specifita. Bylo prokázáno, že manumycin A je takřka neaktivní vůči blízkce příbuznému enzymu geranyl-geranyltransferáze, který se účastní mnoha fyziologických buněčných procesů. Geranyl-geranyltransferáza je navíc schopna částečně suplovat některé klíčové buněčné pochody, ve kterých se za normálních okolností uplatňuje podaným inhibitorem blokována ras-farnesyltransferáza. Díky této vysoké specifitě vykazuje manumycin A výrazně menší cytotoxicitu vůči nenádorovým buňkám, oproti jiným potenciálním inhibitorům ras-farnesyltransferázy^{13, 15}. Dalším popsaným mechanismem cancerostatického působení manumycinů je např. indukce apoptózy tvorbou reaktivních forem kyslíku v nádorových buňkách^{16, 17}.

U některých manumycinových antibiotik byla popsána také významná protizánětlivá aktivita, která je zprostředkována inhibicí interleukin-1 β -konvertujícího enzymu nebo inhibicí I- κ B kinázy^{18, 19}.

V současnosti je asi největší pozornost věnována možnému využití manumycinových antibiotik v léčbě Alzheimerovy choroby. Manumyciny A, B a C jsou funkčními inhibitory enzymu acetylcholinesterázy, který katalyzuje rozpad acetylcholinu na cholin a acetát²⁰. V průběhu Alzheimerovy choroby dochází většinou k postupnému úbytku acetylcholinu, díky němuž dochází k nervovým vzruchům. Inhibicí acetylcholinesterázy klesá aktivita rozpadu acetylcholinu, a tudíž se zvyšuje jeho lokální koncentrace na synaptických spojeních. Při porovnávání inhibiční aktivity manumycinu A s klinicky používaným preparátem inhibitoru acetylcholinesterázy Tacrine® (Cognex 1993), bylo ukázáno nejen, že manumycin A vykazuje minimálně srovnatelnou účinnost, ale dokonce díky vyšší specifitě vykazuje méně vedlejších účinků²⁰.

Biosyntéza

Biosyntézu manumycinů lze rozdělit do několika hlavních úrovní: biosyntéza horního a spodního polyketidového řetězce, biosyntéza mC₇N podjednotky, C₅N podjednotky a finální sestavení molekuly z těchto částí.

Základním prekurzorem pro biosyntézu mC_7N podjednotky je kyselina 3-amino-4-hydroxybenzoová, pro C_5N podjednotku potom kyselina 5-aminolevulová²¹. Polyketidové řetězce jsou syntetizovány klasickou polyketidovou syntézou.

Biosyntéza polyketidů je obecně zprostředkována enzymatickými systémy polyketidsyntáz (PKS). Ve své podstatě se jedná o děj velmi podobný syntéze mastných kyselin. Tu v buňkách zajišťují enzymatické systémy syntáz mastných kyselin (FAS). PKS i FAS katalyzují opakovanou dekarboxylativní kondenzaci acyl-CoA substrátů za vzniku dlouhého acylového řetězce. Polyketidová syntéza se od FAS liší ve dvou hlavních bodech. Zatímco FAS využívá pro iniciaci reakce klasicky acetyl-CoA a jako prodlužovací jednotky malonyl-CoA, PKS může využívat pro iniciaci reakce i k prodlužování řetězce mnoho různých podjednotek²². Malonátová prodlužovací jednotka nese na svém β -uhlíku vázaný kyslík, který je v konečném produktu při syntéze mastných kyselin vždy odstraněn ve třech návazných enzymatických krocích (ketoredukce, dehydratace a enoyl-redukce). U PKS může na rozdíl od syntézy mastných kyselin proběhnout jen některý nebo také žádný z těchto kroků²³.

Řetězce manumycinových antibiotik jsou syntetizovány PKS typu II. Pro ně je typické, že se jedná o samostatné enzymy, které nejsou, jako v případě PKS typu I, spojeny v jeden velký, multidoménový enzym. Jednotlivé enzymatické aktivity mohou být navíc u PKS II použity během biosyntézy opakovaně²⁴. Je proto velice těžké odhadovat strukturu polyketidu např. podle genové nebo proteinové sekvence jeho PKS. V každém genovém shluku PKS II se nachází geny pro tři základní proteiny, které jsou nutné pro samotnou polyketidovou kondenzaci (tzv. minimální PKS). Jedná se o enzym β -ketoacylsyntázu, specifický vazebný ACP (Acy-Carrier-Protein) protein a další protein, který je označován jako tzv. CLF (Chain-Length-Factor). Během biosyntézy je nejprve startovací acyl-CoA jednotka navázána na β -ketoacylsyntázu a zároveň prodlužovací acyl-CoA na specifický ACP protein. Po navázání startovací i prodlužovací jednotky zprostředkuje β -ketoacylsyntáza kondenzaci mezi oběma jednotkami. Funkce proteinu CLF byla poměrně dobře popsána u polyketidů syntetizovaných PKS II s výrazně delšími polyketidovými řetězci, než nesou manumyciny (např. antibiotikum actinorhodin). V případě biosyntézy actinorhodinu tvoří CLF společně s β -ketoacylsyntázou heterodimer a účastní se regulace délky vznikajícího polyketidového řetězce²⁵. U manumycinů nebyla funkce CLF proteinu prozatím zcela objasněna. CLF se v tomto případě také uplatňuje v regulaci délky řetězců, ale patrně není jedinou složkou ovlivňující finální délku²⁶.

Nová manumycinová antibiotika

Nejvíce manumycinových antibiotik bylo objeveno v 80. a 90. letech 20. století a to především při vyhledávání nových, potencionálně využitelných antibiotik z přírodních zdrojů. Nové manumyciny pocházející z přírodních zdrojů, jsou neustále objevovány i v současnosti, avšak rozhodně ne v takovém měřítku. Od roku 2000 byly například izolovány pouze dva nové manumyciny – chinikomycin A a B⁴.

Vedle přírodních izolátů bylo již několik nových manumycinů připraveno záměrnou manipulací s produkčními kmeny. Nejjednodušším příkladem úpravy existujících manumycinových metabolitů je za použití klasického genového inženýrství delece genu, popř. genů, zapojených do určité části biosyntézy. Dojde tak k úplnému přerušení dané dráhy. Tímto způsobem byly připraveny např. manumyciny zcela postrádající C_5N podjednotku nebo horní polyketidový řetězec²⁷. Velmi často používanou metodou je tzv. „feeding“. Jedná se o podsouvání látky podobné určitému prekurzoru biosyntézy produkčnímu kmenu, který může být takto v určitém procentu inkorporován do molekuly. Touto metodou bylo připraveno např. několik analogů asukamycinu nesoucích různé zakončení horního polyketidového řetězce²⁸.

Velmi účinnou metodou pro přípravu modifikovaných přírodních látek je kombinatorní biosyntéza. Její podstatou je kombinace genů pro biosyntetické enzymy z více příbuzných nebo i zcela nepříbuzných biosyntetických drah. Podmínkou pro užití kombinatorní biosyntézy je však dokonalé pochopení všech těchto drah, včetně znalosti jejich genetického pozadí. Takto rozsáhle byla v případě manumycinových metabolitů popsána prozatím pouze biosyntéza asukamycinu²⁷. Spojováním různých genů z biosyntetických drah manumycinových látek by bylo při dokonalém pochopení jejich biosyntézy v budoucnu teoreticky možné skládat přesně definované látky (definovaná délka a struktura řetězců, struktura mC_7N podjednotky, přítomnost C_5N podjednotky, atd.).

Perspektivy manumycinových antibiotik

Molekuly manumycinových antibiotik, lišící se navzájem svojí strukturou, vykazují zpravidla rozdílné biologické aktivity. Např. manumyciny typu I a II vykazují různou antimikrobiální aktivitu, protinádorové účinky jsou zase určeny patrně především strukturou horního řetězce, atd. Většina dosud popsaných biologických aktivit byla však prozatím zkoumána pouze u manumycinu A nebo jen na několika dalších látkách (především asukamycinu). Pokud bychom v budoucnu byli schopni získat komplexnější představu o biologických aktivitách manumycinových látek, včetně uměle připravených derivátů, mohli bychom získat i přehled o hlavních strukturách, které výrazněji modulují dané biologické aktivity či toxicitu. Za předpokladu budoucího lepšího pochopení biosyntetických drah různých manumycinů a užití kombinatorní biosyntézy, by bylo tedy následně možné nejen sestavovat manumycinové látky s přesně definovanou strukturou, ale také s co nejvhodnějšími biologickými aktivitami. Takové látky by mohly být v budoucnu použity např. v lékařské či veterinární praxi.

Závěr

Manumycinová antibiotika vykazují mnoho biologických aktivit, které jsou potenciálně využitelné v praxi. Bohužel není neustále zcela vyjasněn vztah mezi strukturou molekuly a biologickou aktivitou ani není podrobně popsána biosyntéza většiny zástupců této skupiny. Budoucí výzkum zaměřený na tyto oblasti by mohl výrazně usnadnit vývoj aplikací manumycinových látek v praxi.

Literatura

1. Buzzetti F, Gaeumann E, Huetter R, et al.: *Pharm. Acta Helv.* 38, 871 (1963).
2. Sattler I, Thiericke R, Zeeck A.: *Nat. Prod. Rep.* 15, 221 (1998).
3. Hu Y.: Disertační práce. University of Washington Washington 2000.
4. Li F, Maskey RP, Qin S, et al.: *J. Nat. Prod.* 68, 349 (2005).
5. Grote R, Zeeck A, Beale JM.: *J. Antibiot.* 41, 1186 (1988a).
6. Slechta L, Cialdella JI, Mizesak SA, et al.: *J. Antibiot.* 35, 556 (1982).
7. Omura S, Kitao C, Tanaka H, et al.: *J. Antibiot.* 29, 876 (1976).
8. Brodsky TF, Stroman DW, Dietz A, et al.: *J. Antibiot.* 36, 950 (1983).
9. Zeeck A, Schroder K, Frobel K, et al.: *J. Antibiot.* 40, 1530 (1987).
10. Grote R, Zeeck A, Drautz H, et al.: *J. Antibiot.* 41, 1178 (1988b).
11. Shu YZ, Huang S, Wang RR, et al.: *J. Antibiot.* 47, 324 (1994).
12. Kohno J, Nishio M, Kawano K, et al.: *J. Antibiot.* 49, 1212 (1996).
13. Hara M, Akasaka K, Akinaga S, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2281 (1993).
14. Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE.: *Cell.* 77, 175 (1994).
15. Finegold AA, Schafer WR, Rine J, et al.: *Science.* 249, 165 (1990).
16. Pan J, Huang H, Sun L, et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3583 (2005).
17. Sears KT, Daino H, Carey GB.: *Int. J. Cancer, Suppl.* 122, 1496 (2008).
18. Tanaka T, Tsukuda E, Uosaki Y, et al.: *J. Antibiot.* 49, 1085 (1996).
19. Bernier M, Kwon YK, Pandey SK, et al.: *J. Biol. Chem.* 281, 2551 (2006).
20. Zheng ZH, Dong YS, Zhang H, et al.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22, 43 (2007).
21. Thiericke R, Zeeck A, Nakagawa A, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 112, 3979 (1990).
22. Staunton J, Weissman KJ.: *Nat. Prod. Rep.* 18, 380 (2001).
23. Bibb MJ, Biro S, Motamedi H, et al.: *EMBO J.* 8, 2727 (1989).
24. Xu Z, Schenk A, Hertweck C.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6022 (2007).
25. Keatinge-Clay AT, Maltby DA, Medzihradszky KF, et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 888 (2004).
26. Kolek J.: Diplomová práce, UK Praha 2013.
27. Rui Z, Petrickova K, Skanta F, et al.: *J. Biol. Chem.* 285, 24915 (2010).
28. Hu Y, Floss HG.: *Heterocycles.* 69, 133 (2006).

Souhrn

Kolek J.: Manumycinová antibiotika a jejich perspektivy

Manumycinová antibiotika jsou malou skupinou polyketidových látek, které se navzájem podobají svojí strukturou a vykazují výrazné antimikrobiální, protizánětlivé či protinádorové aktivity. Prozatím bohužel nebyl zcela prozkoumán vztah jednotlivých struktur molekul k těmto biologickým aktivitám ani nebyla popsána biosyntetická dráha většiny z těchto látek. Další výzkum v těchto oblastech by mohl v budoucnu vést k praktickému využití manumycinových antibiotik např. v lékařství.

Klíčová slova: manumycin, asukamycin, polyketidy, antibiotika, protinádorové látky

Summary

Kolek J.: Manumycin antibiotics and their perspectives

Manumycin antibiotics represent small group of polyketide metabolites. They have similar structure and possess significant antimicrobial, anti-inflammatory or antitumor activities. To date, relationships of structure and biological activities have not been fully investigated. Also biosynthetic pathways of most manumycins are still not clear. Their further research could lead to application of manumycins e.g. in human medicine.

Keywords: manumycin, asukamycin, polyketides, antibiotics, antitumor compounds

VAKCÍNY A VAKCINACE

Hana Langerová, Pavel Ulbrich

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, langeroh@vscht.cz

Vakcinace a variolace

Vakcinace (z lat. *vacca* = kráva) je proces, při kterém je organismu podáván antigen s cílem navodit jeho aktivní imunizaci a chránit ho tak před onemocněním. Antigen může být tvořen neživými nebo oslabenými mikroorganismy, příp. jejich částmi. V případě onemocnění vyvolaných toxiny pak i upraveným toxinem. Základním požadavkem je, aby imunizační agens nevyvolávalo ani mírné projevy onemocnění a jeho podání nevedlo k závažným nežádoucím vedlejším účinkům.

V lidské populaci má vakcinace dvě základní funkce – individuální a kolektivní. Na individuální úrovni chrání přímo každého očkovaného člověka před daným onemocněním. Pokud v populaci dochází k vysoké proočkovanosti, přerušuje se tím všeobecně šíření infekce mezi lidmi a tím se snižuje riziko přenosu infekce na neočkované jedince, kteří nemohou být očkováni (např. z důvodu přidružených onemocnění, útlumu imunity, nebo je to pro ně finančně nedostupné). Poté mluvíme o tzv. kolektivní imunitě.

Pojem vakcinace je spojen se jménem Edwarda Jennera (nar. 17. 5. 1749 – zemř. 26. 1. 1823), což byl britský vesnický lékař, který si všiml, že lidé, kteří pracovali často s dobytkem a onemocněli kravskými neštovicemi (způsobenými virem vakcinie), téměř nikdy neonemocněli pravými neštovicemi (způsobenými virem varioly). Proto se v roce 1796 rozhodl, že naočkuje malému chlapci hnis z vřídka způsobeného kravskými neštovicemi. Tento chlapec poté onemocněl kravskými neštovicemi, což je však u člověka onemocnění většinou s velmi mírným průběhem. Po uzdravení Jenner infikoval chlapce dávkou pravých neštovic, ale chlapec již neonemocněl, byl proti viru pravých neštovic chráněn. Tento pokus je dodnes považován za první cíleně provedenou vakcinaci. Nedlouho poté, v roce 1801, byly v Evropě očkovány proti pravým neštovicím tisíce lidí. V Čechách se začalo očkovat proti pravým neštovicím v roce 1821 na základě vydání císařského dokumentu. Očkování bylo ukončeno v roce 1980 v souvislosti s vymýcením tohoto onemocnění na celém světě.

V roce 1885 byla připravena Louistem Pasteurem vakcína proti vzteklině, kdy dlouhodobým pasážováním viru na zvířatech dosáhl jeho oslabení tak, že jej bylo možné použít k přípravě očkovací látky z míchy králíků nakažených vzteklinou. Vakcína se používala k očkování psů. V návaznosti na to byl v roce 1887 založen Pasteurův ústav v Paříži a byla zahájena příprava a výroba očkovacích látek založených na umrtvených patogeních mikroorganismech (většinou teplem usmrcených bakterií) ¹.

Vakcinaci předcházela variolace. Již ve staré Číně lékaři vkládali stroučky z pravých neštovic na vatovém smotku do nosních průduchů lidí, aby je chránili před tímto onemocněním a tedy tato tzv. „variolace“ byla metodou aktivní imunizace přímo virem způsobujícím pravé neštovice. Kromě Číny byla používána i v Indii

a Africe a poté se rozšířila po celém světě. Cílem variolace bylo vyvolat slabou místní infekci, která by vedla ke vzniku imunity, a která by bránila rozvinutí těžké celkové infekce. Tehdejšími metodami variolace bylo kromě vkládání tamponů s prachem z neštovičných strupů do nosu i šňupání tohoto prachu, oblékání košilek kontaminovaných hnisem po nemocných dětech, nebo tzv. skarifikace – vpravení infekčního materiálu (hnisu z neštovičných puchýřů) do cíleného poranění kůže. Nebezpečím variolace bylo, že často docházelo k propuknutí těžkého celkového onemocnění, které končilo zohyzdáním nebo i smrtí člověka ¹.

Klasifikace vakcín

Dle životaschopnosti původce onemocnění, proti němuž chceme imunizovat, rozdělujeme vakcíny na živé (oslabené) vakcíny, a na usmrcené (inaktivované) vakcíny. Podle toho, zda se k imunizaci používá celý mikroorganismus, nebo pouze jeho část, dělíme vakcíny na celobuněčné a subjednotkové.

Dále můžeme vakcíny dělit i podle toho, zda daná vakcína obsahuje pouze antigeny z jednoho původce onemocnění, či z více typů jednoho původce. Monovalentní vakcíny se používají k imunizaci proti jednomu původci (např. vakcína proti virové hepatitidě A), polyvalentní vakcíny jsou naopak účinné proti několika typům jednoho původce (např. vakcíny proti karcinomu děložního čípku, působící proti různým genotypům papilomavirů). Vakcíny mohou být i tzv. kombinované, to znamená, že jedna imunizační směs obsahuje antigeny z původců několika onemocnění (např. kombinovaná vakcína proti záškrtu, tetanu, černému kašli, obrně, hepatitidě B a *Haemophilus influenzae* typu B) ¹.

V následujícím textu jsou podrobněji popsány vakcíny, které jsou rozděleny podle typu antigenu či původce onemocnění, jeho životaschopnosti, velikosti a typu zpracování.

Živé (atenuované, oslabené) vakcíny

Živé (atenuované) vakcíny jsou tvořeny mikroorganismy v jejich nepatogenní formě. Ty se získávají většinou mnohonásobným pomnožením daného mikroorganismu (bakterie nebo viru) za specifických podmínek v určité buněčné kultuře tak, aby došlo ke snížení jejich patogenity a virulence, ale nezabránilo se schopnosti jejich replikace. K přípravě tohoto typu vakcín lze s úspěchem využít i moderních přístupů rekombinantních DNA technologií, kdy se vyražením určitých genů sníží patogenita mikroorganismu při zachování jeho imunogenicity. Také je možné přímo použít známý nepatogenní kmen daného mikroorganismu či mikroorganismus příbuzný, například vyvolávající onemocnění u zvířat a ne u člověka ².

Pro získání silné dlouhodobé imunitní odpovědi stačí člověku aplikovat pouze 1-2 dávky živé vakcíny. Největší nevýhodou těchto vakcín je možnost, že se vakcinač-

ní mikroorganismus může změnit z nepatogenní formy v patogenní. Dalším rizikem je použití živé vakcíny u imunosuprimovaných lidí, kdy hrozí propuknutí samotné nemoci. Mezi tyto typy vakcín patří například vakcína proti tuberkulóze, pravým neštovicím, spalničkám či zarděnkám ³.

Inaktivované (usmrčené) vakcíny

Inaktivované vakcíny jsou většinou připravovány usmrcením patogenního mikroorganismu chemicky, radiací, nebo teplem tak, aby nedošlo k narušení jeho antigenních vlastností. Tyto vakcíny jsou mnohem stabilnější a bezpečnější než živé vakcíny, protože usmrčený mikroorganismus již není infekční. Jelikož nedochází k replikaci mikroorganismu v člověku, tak je zde velmi krátký poločas retence použitého imunogenu. Z toho důvodu bývají inaktivované vakcíny často připraveny s minerálním nosičem, aby se zvýšila doba působení imunizačního agens, nebo lze pro dosažení vyšší účinnosti vakcíny podat vyšší dávku imunogenu. Tyto vakcíny stimulují imunitní odpověď organismu slaběji než živé vakcíny, a proto je nutné pro dosažení dlouhodobé imunizace podat více vakcinačních dávek ².

Za použití moderních metod lze geneticky modifikovat mikroorganismy tak, aby byla zcela inhibována jejich replikace v organismu. Takto připravený mikroorganismus by také mohl patřit do této skupiny inaktivovaných, i když ne zcela usmrčených, vakcín.

Inaktivované vakcíny nevyžadují pro zachování své stability zmrazení, proto se snadněji uchovávají a transportují, čehož se s výhodou využívá při jejich dopravě například do rozvojových zemí. Tím se pro tyto země stávají cenově dostupnější ². Příkladem tohoto typu vakcín jsou vakcína proti dávivému kašli, choleře, chřipce či vzteklině.

Zajímavým případem inaktivovaných vakcín jsou i tzv. autovakcíny. Ty se připravují z kmene mikroorganismu či směsi mikroorganismů (většinou bakterií) izolovaných přímo od nemocného. Pomnožené mikroorganismy se umrtví a použijí ve vhodném ředění jako imunizační agens. Používají se zejména v případech chronických onemocnění (akné, impetigo, chronické záněty močových cest, bronchiální astma), nebo byly testovány i k obecnému posílení imunity ⁴.

Subjednotkové vakcíny

Subjednotkové vakcíny obsahují pouze vybrané antigeny patogenního mikroorganismu, které dobře stimulují imunitní systém. Výskyt možných nežádoucích účinků vakcíny z důvodu přítomnosti mnoha dalších složek, jako je to v případě použití celého mikroorganismu, je proto mnohem nižší a tento typ vakcín patří pravděpodobně mezi nejbezpečnější. Zjištění, které antigeny mikroorganismu nejlépe stimulují imunitní systém, je však složitý a časově náročný proces. V některých případech je využívána pouze specifická část antigenu, tzv. epitop, který je rozpoznáván protilátkami nebo T-buňkami imunitního systému.

Pro přípravu tohoto typu vakcín se používají dva přístupy. Při prvním z nich se v laboratorních podmínkách připraví dostatečné množství patogenu, který je následně působením chemikálií rozložen a poté se izoluje

vhodný požadovaný antigen nebo antigeny. Na tomto principu jsou připravovány vakcíny proti pneumokokům, záškrtu nebo chřipce. V druhém případě je daný antigen připraven synteticky (v případě krátkého peptidu), nebo pomocí rekombinantní DNA technologie, kdy je plasmidová DNA kódující příslušný antigen vpravena do produkčního mikroorganismu, v němž jsou požadované antigeny produkovány a poté jsou z něj izolovány. Takto byly připraveny vakcíny proti choleře, záškrtu, hepatitidě B či dávivému kašli ².

Ve výše zmíněných případech přípravy antigenu je podobně jako u inaktivovaných vakcín velmi krátký retenční poločas imunogenu, a proto bývají antigeny obvykle konjugovány s vybraným nosičem. Jedná se buď o minerální nosič, či o biologický vektor proteinové povahy.

DNA vakcíny

DNA vakcíny, jejichž navržení a příprava je poměrně jednoduchá a levná, představují moderní přístup k vakcinacím. V experimentálních fázích jejich vývoje vykazují tyto vakcíny velmi slibné výsledky a několik je již testováno i na lidech. Připravit DNA vakcínu lze proti každému mikroorganismu, u něhož známe sekvenční jeho genomu, či sekvenční genů kódujících vhodné antigeny. DNA kódující daný antigen či antigeny je poté vpravena přímo do buněk hostitelského organismu, v nichž dojde k produkci antigenu a tedy i imunizaci hostitele. DNA vakcína nemůže vyvolat onemocnění, protože neobsahuje celý mikroorganismus, ale pouze jeho vybraný gen či geny. V organismu může tato vakcína vyvolat silnou protilátkovou odpověď na antigeny, které jsou vylučovány buňkami nebo jsou vystaveny na jejich povrchu. DNA se vpravuje do hostitele většinou její přímou injekcí, ale jsou testovány různé metody její dopravy, například pomocí tzv. genové pistole či vhodného vektoru, viz níže. Mezi testované DNA vakcíny patří vakcína proti hepatitidě typu C, HIV, viru západonilské horečky a další ².

Rekombinantní vektorové vakcíny

Princip přípravy rekombinantních vektorových vakcín je experimentálně velmi podobný jako u DNA vakcín a mohly by patřit i do výše zmíněné kapitoly, ale protože se jedná současně i o vakcíny živé, bývají řazeny do zvláštní kategorie. Tento typ vakcín je připraven tak, že se použije vhodná bakterie nebo virus v jejich nepatogenní formě a modifikuje se jejich genom tak, aby nesl gen či geny kódující vhodné antigeny. Jedná se tedy v zásadě o typ DNA vakcíny, kde je vektorem nepatogenní mikroorganismus. Protože se viry přirozeně dostávají do buňky a vpravují do ní svůj genetický materiál, může dojít v případě použití geneticky upraveného vhodně vybraného nepatogenního viru, nesoucího geny kódující vybrané antigeny jiného patogenního mikroorganismu, k produkci antigenů přímo v hostitelské buňce. Jako vektory mohou být použity také atenuované bakterie, které jsou intracelulárními parazity. Po vložení genetického materiálu (opět kódujícího vybraný antigen či antigeny) do vybrané bakterie může dojít k vystavení těchto antigenů na povrchu bakterie a tedy k účinné imunizaci. Jako vhodné vektory se používají například virus vakcinie, adenoviry nebo salmonely.

Tím, že rekombinantní vektorové vakcíny napodobují přirozenou infekci v organismu, velmi dobře stimulují imunitní systém. Na tomto principu jsou v přípravě vakcíny proti HIV, herpes simplex, vzteklině a spalničkám ².

Toxoidové vakcíny

Toxoidové vakcíny se používají pro imunizaci proti bakteriím produkujícím toxiny, které jsou hlavní příčinou vzniku onemocnění. Toxicita toxinů je snížena či úplně potlačena po jejich ošetření formaldehydem, kdy je ale zachována jejich imunogenita. Potom mluvíme o tzv. toxoidech. Ty jsou z hlediska použití pro přípravu vakcín bezpečné. V případě, že se imunitní systém organismu setká s tímto typem vakcíny, je vystaven upravenému toxinu v jeho přirozené antigenní podobě a začne proti němu úspěšně produkovat protilátky, aniž by hrozilo nebezpečí vyvolání onemocnění. K dosažení dostatečné imunizace je nutné pravidelné přeočkování a případně i vazba toxoidu na vhodné adjuvans, např. minerální nosič. Příkladem tohoto typu vakcín jsou vakcíny proti záškrtu a tetanu ².

Konjugované vakcíny

V některých případech vakcín jsou antigeny tvořeny pouze oligosacharidy nebo polysacharidy bez jakékoliv proteinové složky a pak může být imunitní odpověď velmi slabá, nebo dokonce žádná. Z toho důvodu se tyto antigeny mohou navázat na vhodný proteinový či polyproteinový nosič, který zajistí dostatečnou imunitní odpověď proti danému antigenu. Tento nosič sám o sobě nebývá imunogenní, ale je schopen stimulovat T buňky. Takto připravená (konjugovaná) vakcína proti patogením mikroorganismům byla na imunizaci lidí poprvé použita na konci 80. let. Velkým cílem bylo zkonstruovat účinnou vakcínu, která by chránila děti a dospělé před infekcí způsobenou bakterií *Haemophilus influenzae* typu B. Toto se opravdu podařilo a vakcína proti tomuto hemofilu je typickým příkladem konjugované subjednotkové vakcíny, používané v současnosti. V případě konjugovaných vakcín stačí pro dosažení účinné imunizace podat jedincům starším než jeden rok pouze jednu vakcinační dávku. U menších dětí účinnost konjugovaných vakcín není tak vysoká a je tedy potřeba dávek podat několik, nejlépe v rozmezí přibližně jednoho měsíce ².

Způsob aplikace očkovacích látek, jejich složení a možné nežádoucí účinky

Očkovací látky jsou podávány nejčastěji v injekční lékové formě. V současné době je však snaha o nalezení jejich co možná nejméně bolestivého podání a běžně již existují vakcíny, které mohou být podávány perorálně v tekuté formě (např. vakcíny proti rotavirovým průjmům nebo choleře), inhalačně, či použitím náplastí. Tyto lékové formy ovšem nejsou schváleny ve všech zemích ¹.

Z hlediska účinné imunizace je velmi důležité i vhodné složení vakcíny. Obecně jsou očkovací látky složeny z látek aktivně působících na imunitní systém a z neaktivních složek. Hlavní aktivní složkou vakcíny je vždy antigen. Většinou platí, že antigeny, které mají molekulovou hmotnost menší než 5 kDa, stimulují tvorbu proti-

látek po podání do organismu pouze tehdy, pokud jsou navázány na vhodný nosič, viz text výše. Do neaktivních složek vakcín patří stabilizátory prostředí (pufry), smáčedla (pro lepší rozpustnost biologicky účinné látky), stabilizátory antigenu (pro zachování jeho správné konformace), konzervační látky a antibiotika (pro zajištění aseptického prostředí). Jako stabilizátory se používají hlinité soli (hydroxid či fosforečnan), nebo lze použít i lidský albumin, laktózu či želatinu. Antibiotika se používají při přípravě atenuovaných vakcín, aby bylo zabráněno růstu jakýchkoli nežádoucích mikroorganismů. Vakcíny však mohou obsahovat i residuální látky, jejichž přítomnost může vést k negativním vedlejším účinkům po podání vakcíny. Jedná se většinou o produkty či kontaminanty pocházející z procesu přípravy vakcíny. Tyto látky mohou být také velmi často silnými alergeny, což je problém v případě citlivých jedinců ³.

Po podání očkovací látky do organismu tedy může dojít k projevení nežádoucích vedlejších účinků vakcinace, které mohou být očekávané (ty jsou popsány výrobcem vakcíny v příbalovém letáku vakcíny), nebo neočekávané (ty, které nebyly dosud výrobcem popsány). Nežádoucí účinky vznikají přímo i nepřímo, působením imunologicky „aktivních“ látek (antigenů) nebo přítomností přidaných výše zmíněných „pasivních“ látek. Mezi časté, očekávané vedlejší účinky vakcinace patří bolest, otok, zduření v místě vpichu nebo zvýšená teplota, únava a nevolnost. Ty přetrvávají většinou maximálně 3 dny a poté samovolně odezní. Jejich projev je závislý na individuální vnímavosti jedince a na konkrétní očkovací látce ³. Mohou se však vyskytnout i závažné nežádoucí účinky vakcinace, mezi něž patří výskyt alergických reakcí, neurologických obtíží nebo šokových stavů. O některých vedlejších účincích vakcín se často pouze spekuluje, ale dosud nebyly spolehlivě potvrzeny či vyvráceny. Jedná se například o souvislost očkování s projevy autoimunitních onemocnění či poškozením mozku. V případě zpochybňování bezpečnosti určitého očkování je však potřeba být velmi obezřetní. Ve světě bylo totiž zaznamenáno několik případů, kdy díky šíření ničím nepodložené poplašné informace o nebezpečí určité vakcinace došlo následně u tisíců neimunizovaných osob k propuknutí smrtelných či život ohrožujících onemocnění. Příkladem může být Velká Británie a aféra s očkováním proti dávivému kašli nebo Holandsko a epidemie dětské obrny v 80-tých letech ⁴.

Očkování na území České republiky a ve světě

V České republice existuje několik typů očkování. Mezi základní patří očkování povinná (plošná, pravidelná) a doporučená. Povinné očkování je plně hrazeno příslušnou zdravotní pojišťovnou a je stanoveno zákonem. Prvním, kdo uzákonil povinnost očkování, byl první československý prezident Tomáš G. Masaryk ⁵. Výraz „povinné“ očkování zde však není tak úplně na místě, protože očkování není vynutitelné proti vůli člověka. Existuje sice možnost pokuty, pokud dospělý člověk nechá očkovat svoje dítě, ale lze se i tomuto úspěšně vyhnout. Očkování je tedy povinné spíše v tom smyslu, že je pediatr povinen ho včas nabídnout. Na každém

člověku už je pak rozhodnutí, zda sebe nebo své děti nechá očkovat, proti jakým onemocněním a na základě jakého vakcinačního schématu. Nejedná se tedy o přímou povinnost, ale spíše nepřímou. Takto je to i ve většině vyspělých zemí, kde také existuje očkování plošné, nepřímo povinné a pouze v některých zemích jsou vybraná očkování zcela povinná. I přesto ale existují určité výjimky, za nichž se jedinec očkovat nemusí.

V současné době jsou často kladeny otázky, zda je nutné dítě očkovat brzy po narození, nebo zda je vůbec nezbytně nutné jej očkovat proti určitým onemocněním. Zkušenost z nedávné historie, kdy bylo např. ve Velké Británii i v jiných zemích pozastaveno povinné očkování proti dávivému kašli nebo i jiným onemocněním, naznačuje, že rozhodně není vhodné ukončit očkování proti infekční nemoci, která nebyla celosvětově eradikována. V těchto státech se totiž po ukončení vakcinace často začaly objevovat tisíce nových případů nakažení touto nemocí a kromě těchto případů lze obecně konstatovat, že potenciální celosvětová eradikace dané nemoci se tímto oddálí o mnoho let⁷.

Mezi „povinná“ očkování v České republice patří očkování proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli, proti onemocnění vyvolanému *Haemophilus influenzae* typu B, dětské obrně, spalničkám, zarděnkám, příušnicím a virové hepatitidě typu B. Jediným nepřímo povinným očkováním pro dospělé osoby je pravidelné přeočkování proti tetanu. Doporučená očkování jsou podávána dobrovolně, na žádost jedince a většinou si

je musí hradit každý sám. Mezi obecně často doporučovaná očkování patří vakcinace proti chřipce, klíšťové encefalitidě, pneumokokům a rotavirům (zejména malých dětí), planým neštovicím, papilomavirům (u mladých dívek), případně i tuberkulóze, meningokoků skupiny C či hepatitidě typu A. Jsou skupiny osob, které patří mezi rizikovější, a proto jim je určité očkování obecně doporučováno více, například malé děti nebo osoby starší 60-ti let, kteří jsou náchylnější k některým infekcím, anebo může být u nich průběh onemocnění mnohem závažnější. V těchto případech jsou vybraná očkování hrazena z povinného zdravotního pojištění. Patří sem například poskytnutí vakcíny proti vzteklině, proti chřipce u pojištěnců nad 65 let věku, proti pneumokokovým infekcím u dětí do sedmi měsíců věku anebo u dívek očkování proti papilomavirům, pokud se nechají očkovat mezi 13. – 14. rokem věku³.

Z dalších obecných typů očkování lze zmínit tzv. mimořádná očkování, očkování při úrazech, očkování doporučená pro osoby cestující do cizích zemí a očkování na vlastní žádost. Tyto typy očkování se často týkají výjimečných situací nebo pouze vybraných skupin lidí, jako jsou například laboratorní pracovníci, kteří se mohou setkat při své práci s určitým patogenem. Patří sem dále situace, kdy vzniká nebezpečí šíření epidemie, nebo případy, kdy dojde k závažnému poranění, kde hrozí riziko kontaminace patogenem a podobně¹. Mimořádná očkování jsou vyhlášována hlavním hygienikem České republiky, příp. krajským hygienikem.

Tabulka I: Dětský pravidelný očkovací kalendář platný v ČR od 1. 1. 2014, cit. ⁷.

věk dítěte	Pravidelné plošné očkování	Nepovinné očkování
	Nemoc	Nemoc
od 4. dne – 6. týdne	Tuberkulóza (pouze u rizikových dětí s indikací)	
od 6. týdne		Rotavirové nákazy (1. dávka)
od 9. týdne (2. měsíc)	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, žloutenka typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B (1. dávka)	Pneumokoková onemocnění (1. dávka) Rotavirové nákazy (přeočkování)
3. měsíc	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, žloutenka typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B (přeočkování)	Pneumokoková onemocnění (přeočkování) Rotavirové nákazy (přeočkování)
4. měsíc	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, žloutenka typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B (přeočkování)	Pneumokoková onemocnění (přeočkování)
11.–15. měsíc		Pneumokoková onemocnění (přeočkování)
15. měsíc	Spalničky, zarděnky, příušnice (1. dávka)	Plané neštovice, spalničky, zarděnky, příušnice (1. dávka)
do 18. měsíce	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, žloutenka typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B (přeočkování)	
21. až 25. měsíc	Spalničky, zarděnky, příušnice (přeočkování)	Plané neštovice, spalničky, zarděnky, příušnice (přeočkování)
5.–6. rok	Záškrt, tetanus, černý kašel (přeočkování)	
10.–11. rok	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna (přeočkování)	
13. rok (jen dívky)		Onemocnění lidským papilomavirem (karcinom děložního čípku)
14. rok (u neočkovaných v 10–11 letech)	Tetanus (přeočkování)	Záškrt, tetanus, černý kašel (přeočkování)

Pravidelná plošná očkování

Pravidelný očkovací kalendář, platný v České republice od 1. 1. 2014, je zobrazen v Tabulce I 7. V různých zemích světa se povinná či doporučená očkování a termíny vakcinace liší, a to i v rámci hospodářsky rozvinutých zemí. Například v USA je již od dětství doporučováno a plošně podáváno očkování i proti hepatitidě typu A, u něhož bylo v Čechách také zvažováno jeho zařazení do povinného očkovacího kalendáře, dále je v některých zemích běžné plošné očkování všech dětí proti pneumokokům (např. na Slovensku a v Německu), rotavirům (Německo či Velká Británie) nebo očkování proti planým neštovicím a pásovému oparu (Německo). Také očkování proti meningokokům skupiny B a C a chřipce patří mezi plošná pravidelná očkování ve Velké Británii. U nás jsou tyto vakcíny řazeny pouze mezi doporučená očkování³.

Poměrně kontroverzním tématem nedávné doby byla otázka nezbytnosti (a prospěšnosti) a naopak zbytečnosti (i rizika) očkování proti tuberkulóze. Toto očkování bylo v Čechách mnoho let povinné a bylo úplně prvním očkováním, se kterým se člověk v dětství (resp. pár dní po porodu) setkal. V roce 2010 od něj bylo ustoupeno a je nyní pouze doporučeno pro rizikové skupiny obyvatelstva. To, zda toto rozhodnutí bylo správné či ne, ukáže až budoucnost.

Na druhou stranu se čas od času zvažuje zavedení některých dalších očkování mezi pravidelná, nepřímá povinná. Jedná se o výše zmíněná očkování proti hepatitidě A, pneumokokům a planým neštovicím. Kromě posouzení všech kladů a záporů přidání dalších pravidelných očkování do očkovacího kalendáře zde však významnou roli hraje i finanční zátěž zdravotních pojišťoven, neboť tato očkování jsou hrazena z veřejného zdravotního pojištění.

Očkování do ciziny

Velký význam má i očkování z hlediska cestování do ciziny. Každá země může požadovat při vstupu cizinců na její území potvrzení o tom, že byli očkováni proti určitým onemocněním, zejména pokud se jedná o cestovatele ze zemí, kde se určitá infekční nemoc běžně vyskytuje. Na druhou stranu je ale důležité chránit i sami sebe proti onemocněním, která nám hrozí v dané zemi, do které cestujeme. Z hlediska cestovní medicíny stojí

za zmínku několik důležitých očkování. Poměrně běžné je nechat se očkovat proti břišnímu tyfu, což je onemocnění vyskytující se v mnoha zemích s nízkou úrovní hygieny. Jedná se zejména o Indii a jižní Asii obecně, o Afriku, Jižní Ameriku a Mexiko. Z podobných důvodů a v podobných oblastech je dobré zvážit i očkování proti hepatitidě typu A. Pokud cestujeme do subtropické a tropické Afriky nebo Střední a Jižní Ameriky, je dobré a někdy i povinné se nechat očkovat proti žluté zimnici. Dále je doporučováno očkování proti choleře a to zejména při cestování do Latinské Ameriky, Asie či Afriky. V zemích jižní, jihovýchodní a severovýchodní Asie hrozí onemocnění japonskou encefalitidou, proti níž také existuje účinná očkovací látka. Dalším očkováním, které občas bývá doporučeno při cestách do ciziny, je očkování proti moru. Týká se to ale spíše lidí, kteří se budou pohybovat mimo města a turistické oblasti v Jižní Americe, jižní Africe, Asii či dokonce i jihozápadě USA. Vakcína proti moru však není v České republice registrována a je tedy podávána jen ve výjimečných případech. Při cestování do některých oblastí světa lze zvážit i očkování proti vzteklině. V neposlední řadě je potřeba zmínit malárii. Proti této nemoci sice není vakcína, ale existuje účinná profylaxe – podávání antimalarik. Jelikož je malárie poměrně riziková ve více než sto zemích světa, zejména v oblastech Střední a Jižní Ameriky, Afriky, jižní Asie, Středního východu a Oceánie, je dobré na tuto prevenci nezapomínat³.

Závěr

Objev vakcinace byl jedním z nejvýznamnějších mezníků v historii medicíny. Díky němu došlo k velmi podstatnému snížení morbidit a mortalit u onemocnění, které byly způsobeny patogenními mikroorganismy. Díky vakcinaci se podařilo některé nemoci zcela vymýtit nebo snížit jejich výskyt v populaci na minimum. Za jeden z největších úspěchů v této oblasti se považuje celosvětové vymýcení pravých neštovic v 70. letech minulého století. Vakcinace zásadním způsobem ovlivnila vývoj lidstva v medicínské, ekonomické i sociální oblasti. Problémem však stále zůstává vakcinace v rozvojových zemích, kde často není zavedeno její plošné rozšíření, nebo je prováděna nedůsledně z důvodu nedostatku financí. Dalším úskalím je, že u některých typů infekčních onemocnění stále nikde na světě není dostupná účinná vakcína.

Literatura

1. http://www.vakcinace.eu/data/files/brozura_ockovani_aifp.pdf, staženo 15. května 2014.
2. <http://www.vaccines.gov>, staženo 9. června 2014.
3. <http://www.vakciny.net>, staženo 15. května 2014.
4. Votava M: Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno 2005.

5. Kramná L.: Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Brno 2006.
6. Beran J, Havlík J, Vonka V: Očkování – minulost, přítomnost, budoucnost. Galen, Praha 2005.
7. <http://www.vakcinace.eu/ockovani-v-cr>, staženo 15. května 2014.

Souhrn

Langerová H., Ulbrich P.: Vakcíny a vakcinace

Očkování je proces, při kterém je organismu podáván antigen s cílem navodit jeho imunizaci. Tento antigen může být podán v různých podobách a formách a dle toho lze rozdělit očkovací látky – vakcíny, na několik typů. Objev první vakcíny, proti pravým neštovicím, byl jedním z nejvýznamnějších výsledků lékařské vědy. V současné době existuje mnoho typů vakcín proti různým infekčním onemocněním a každá země má svůj harmonogram, kdy jsou jaké očkovací látky podávány, proti kterým infekčním onemocněním se očkuje plošně a která očkování jsou naopak pouze doporučována.

Klíčová slova: vakcinace, imunizace, vakcíny, očkovací kalendář

Summary

Langerová H., Ulbrich P.: Vaccines and vaccination

Vaccination is the process by which the antigen is administered to an organism in order to induce its immunization. This antigen can be delivered and presented in a variety of forms and types and thus we can categorize several types of vaccines. The discovery of the first vaccine against smallpox was one of the main achievements of medical science. Nowadays, there are many types of vaccines against various infectious diseases, and each country has its own schedule, that defines when the certain vaccine is delivered, which vaccines are necessary and which are only recommended.

Keywords: vaccination, immunization, vaccines, vaccination schedule

SAMČÍ ZNAČKOVACÍ FEROMON MODELOVÝCH DRUHŮ ČMELÁKŮ

Darína Prchalová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, dari.prchalova@email.cz

Úvod

Čmeláci jsou důležitými opylovači rostlin, dnes také komerčně využívanými především při pěstování plodin ve sklenících, a představují jeden z modelů pro studium komunikace sociálního hmyzu. Čmeláci patří do rozsáhlého a mimořádně úspěšného hmyzího řádu Hymenoptera (blanokřídlí), v rámci něho do čeledi včelovitých (přesné zařazení tab. I).

Tab. I: Systémové zařazení čmeláků

říše:	Animalia – živočichové
kmen:	Arthropoda – členovci
podkmen:	Hexapoda – šestinozí
třída:	Insecta – hmyz
řád:	Hymenoptera – blanokřídlí
čeleď:	Apidae – včelovití
podčeleď:	Apinae – včely
rod:	Bombus – čmelák

Komunikace mezi hmyzími jedinci je do značné míry zprostředkována chemicky pomocí feromonů, které ovlivňují řadu procesů v životě hmyzu, včetně hledání a výběru sexuálního partnera. Pojem feromon zavedli Peter Karlson a Martin Lüscher¹. Feromon je těkavá látka nebo směs látek uvolňovaná organismem a spouštějící specifické chování nebo fyziologickou reakci jedinců stejného biologického druhu.

Chování čmeláků je ovlivňováno několika typy feromonů. Jedná se o sekrety exokrinních žláz, jejichž složky jsou z chemického hlediska dosti jednoduché struktury². Feromony čmeláků se dělí do skupin podle funkce: stopovací feromony, feromony pro označení zdroje potravy, dominantní signály dělnic, sexuální feromon samiček, mateří látka a samčí značkovací feromon.

Bombus terrestris (čmelák zemní) a *Bombus lucorum* (čmelák hájový) (obr. 1) jsou modelovými druhy čmeláků z několika důvodů. Oba druhy jsou v Evropě hojně rozšířené. Jedná se o velmi blízké příbuzné druhy čmeláků a přesto je například složení jejich samčích značkovacích feromonů zásadně odlišné, stejně jako dynamika jejich produkce, což u tak blízké příbuzných druhů

nebývá zvykem. Oba druhy lze laboratorně chovat³, což umožňuje získávat experimentální materiál definovaného stáří během celého roku.

Chování samců při lákání samic k páření

Čmeláci se páří v létě a na začátku podzimu, jsou polygynní – sameček se může pářit s více samicemi, ale ty jen s jedním samečkem - výjimkou je *B. hypnorum* (čmelák rokytový), jehož samičky se páří více než jednou⁴⁻⁹ Apoidea, Bombinae.

Čmeláci samci vyhledávají panenské samičky třemi různými způsoby: číháním, vyčkáváním u hnízda nebo patrolováním a v rámci jejich předkopulačních strategií používají i samčí značkovací feromon.

Strategie patrolování u čmeláků převládá. Patrolování je typické i pro samce *B. terrestris* a *B. lucorum*. Samci si vytyčí letový okruh se stanovišti, který vždy ráno a v dopoledních hodinách označí svým značkovacím feromonem. Zbytek dne až do podvečerních hodin opakovaně tuto trasu prolétají. Na samičky feromon působí jako atraktant i arestant - má zdržet samičku na daném místě do přiletu samečka. Období letů i umístění značek závisí na druhu čmeláka. Čmeláci značkují vrcholy stromů, keře, byliny, povrch země. *B. terrestris* a *B. lucorum* umísťují své stopy na větve ve vrcholech stromů až do výšky 17 m^{10,11}. V dané lokalitě zpravidla patroluje několik čmeláčích druhů. Mezidruhová teritoria jsou většinou dobře oddělena, neboť jejich tzv. zastávky bývají buď v různých výškách, nebo čmeláci pro ně preferují různé druhy porostů. Trasy patrolujících čmeláků téhož druhu se mohou i křížit¹². Délka letových drah je také druhově specifická, pohybuje se od 50 do 300 m. Dráhy mívají tvar kruhů nebo nepravidelných čtyřúhelníků s 10 až 20 stanovišti. Čmeláci jim bývají věrní po delší dobu, někdy nezmění letovou dráhu i celou sezónu.



Obr. 1: Samci *Bombus terrestris* a *Bombus lucorum*

Číhání spočívá v tom, že si samci najdou vhodné vyvýšené místo – pozorovatelné, ze které sledují okolí a vyrazí za jakýmkoliv létajícím objektem připomínajícím velikostí samičku čmeláka. Dále si značí pozorovatelnou i vegetaci v jejím okolí značkovacím feromonem podobně jako patrolující čmeláci¹³.

Při vyčkávání se samci shromáždí u vchodů do hnízd, kde čekají na výlet mladých samiček. Bojují mezi sebou o výhodnou pozici, aby se k samičkám opouštějícím hnízdo dostali jako první. V tomto případě není zcela objasněno, jak samci využívají svůj feromon k nalákání samiček. Ukázalo se však, že samci před vchodem do hnízda víří křídly v určitých intervalech a vhání proud vzduchu do hnízda, pravděpodobně i s feromonem¹⁴.

Složení samčího značkovacího feromonu

Samčí značkovací feromon je uvolňován z hlavové části labiální žlázy¹⁵. Jeho složení bylo analyzováno u čmeláčích druhů ze Skandinávie, ze Severní Ameriky, Japonska i u druhů žijících v České republice a okolních zemích. Je složen převážně ze směsi derivátů mastných kyselin a terpenických alkoholů a esterů^{16–20}. Většina studií je zaměřena na identifikaci látek přítomných v čmeláčích labiálních žlázách. Bergman a Bergström¹⁷ potvrdili analýzou vonných stop zanechaných čmeláky na listech a analýzou těkavých látek ve vzduchu kolem listů, že se jedná o látky známé z čmeláčích labiálních žláz.

Samčí značkovací feromon je druhově specifická směs běžně s jednou nebo dvěma hlavními složkami^{21,22}, používá se pro taxonomické zařazení čmeláků do druhů a poddruhů^{23–26}. Tento feromon funguje spolu s behaviorálním lákáním samiček k páření i jako zábrana mezidruhového křížení^{27,28}.

B. terrestris patří mezi čmeláky, jejichž hlavní složkou sekretu labiální žlázy je isoprenoid. V tab. II je uvedeno složení extraktu labiální žlázy čtyřdenního samce (kompletní složení v Šobotník et al.²⁹). Dominantní složky sekretu jsou 2,3-dihydrofarnesol, geranylcitronellol a ester mastné kyseliny ethylododekanoát.

Tab. II: Seznam nejvíce zastoupených sloučenin v extraktu labiální žlázy 4denního samce *B. terrestris* (kompletní složení v Šobotník et al.²⁹).

sloučenina	relativní zastoupení (%; N=4)	
	průměr	směrodatná odchylka
2,3-dihydrofarnesol	57,9	4,6
ethylododekanoát	14,4	1,2
geranylcitronellol	13,3	4,5
ikosenol	6,1	3,4
oktadekatrienol	1,8	0,5
hexadekanol	1,6	0,3
nonakosen	1,1	1,9
trikosan	0,9	0,9

Sekret labiální žlázy *B. lucorum* je směs obsahující převážně ethylestery mastných kyselin (tab. III, kompletní složení v Urbanová et al.¹⁶). Její hlavní složkou je ethyl-(Z)-tetradec-9-enoát.

Tab. III: Seznam nejvíce zastoupených sloučenin v extraktech labiálních žláz samců *B. lucorum* (kompletní složení v Urbanová et al.¹⁶).

sloučenina	relativní zastoupení (%; N=26)	
	průměr	směrodatná odchylka
ethyltetradec-9-enoát	52,9	20,9
ethylododekanoát	5,9	3,1
trikosan	5,4	2,5
hexadecyltetradecenoát	5,3	5,8
hexadekanol	3,6	4,1
ethylhexadec-9-enoát	3,6	1,4
ethyltetradekanoát	1,8	1,5
ethylotadec-9-enoát	1,8	1,0

Biosyntéza samčího značkovacího feromonu *B. terrestris* a *B. lucorum*

Kde a jak probíhá biosyntéza jednotlivých složek samčího značkovacího feromonu čmeláků zatím není plně objasněno. Uvažuje se o několika možnostech průběhu biosyntézy feromonových složek: 1) feromonové složky obsažené v sekretu labiální žlázy jsou syntetizovány *de novo* ze základních prekurzorů, jako je například acetát, přímo v labiální žláze, 2) biosyntéza prekurzorů složek probíhá v tukovém tělese, ty jsou následně transportovány hemolymfou do labiální žlázy a tam pozměněny do konečné podoby, 3) probíhají oba uvedené způsoby.

Hypotéza 2) se týká biosyntézy alifatických feromonových složek (derivátů mastných kyselin), lipidy v tukovém tělese samců by mohly sloužit jako jejich prekursory³⁰. Deriváty mastných kyselin by mohly vznikat následujícím způsobem: triacylglyceroly (TAG) jsou v tukovém tělese štěpeny na diacylglyceroly (DAG) a monoacylglyceroly (MAG), DAG jsou pak vázány na lipoforiny a přenášeny hemolymfou k labiální žláze. Zde jsou mastné kyseliny odštěpeny z DAG lipasou a modifikovány dalšími enzymy.

Studium biosyntézy bývá založené na identifikaci metabolitů, které vzniknou z izotopově značených prekurzorů aplikovaných *in vivo* do hmyzí tkáně nebo inkubovaných *in vitro* s vypreparovanými tkáněmi. Kromě toho se analyzují metabolické dráhy a zkoumají vlastnosti enzymů, podílejících se na přeměně některých metabolitů.

Aplikace značených mastných kyselin do hlavy a do zadečku *B. lucorum* a *B. terrestris* a následná analýza produktů pomocí GC-MS prokázala přítomnost nově syntetizovaných značených ethylesterů mastných kyselin, které odpovídaly složkám feromonové směsi^{30,31}. Výsledky těchto pokusů potvrdily, že alifatické složky feromonu vznikají modifikací mastných kyselin.

Kromě toho byla provedena analýza složení přirozeně se vyskytujících lipidů v tukovém tělese a v labiální žláze³¹. U *B. terrestris* bylo zjištěno, že profil mastných kyselin v TAG v tukovém tělese je až na několik rozdílů podobný profilu mastných kyselin v alifatických složkách sekretu labiální žlázy. Což podpořilo biosyntetickou hypotézu číslo 2. Avšak pro *B. lucorum* nebyla pozorována tato podobnost profilů mastných kyselin. Prekurzor hlavní feromonové složky *B. lucorum*, kyseli-

na tetradec-9-enová, byl v TAG tukového tělesa nalezen pouze v malém množství.

Byla také testována možnost biosyntézy alifatických feromonových složek *de novo*. Byly provedeny *in vitro* inkubace labiálních žláz s izotopově značenými [1,2-¹⁴C]acetátem a [D₃]acetátem³². Výsledky experimentů ukázaly, že se značený substrát zabudoval do terpenických alkoholů, mastných kyselin, esterů a uhlovodíků, což jsou sloučeniny přirozeně se vyskytující v labiální žláze. Výsledky *in vitro* pokusů potvrdily možnost *de novo* biosyntézy alifatických i terpenických feromono-

vých složek v labiální žláze, ale nevyvrátily možnost průběhu biosyntézy oběma navrhovanými cestami.

Závěr

Výsledky biosyntetických studií potvrdily možnost *de novo* biosyntézy jednotlivých složek samčího značkovacího feromonu *B. terrestris* a *B. lucorum*. Nevyvrátily však možnost vzniku feromonových složek z prekursorů transportovaných z tukového tělesa. Ve výzkumu se nadále na pracovištích ÚOCHB AV ČR pokračuje.

Literatura

1. Karlson P, Lüscher M: *Nature* 183, 4653 (1959).
2. Duffield RM, Wheeler JW, Eidworth GC: Sociochemicals of Bees. In Chemical Ecology of Insects; Bell, W. J.; Cardé, R. T., Eds.; Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc., 1984; pp. 387–428.
3. Ptáček V, Pernová E, Borovec R: *Pčelnicze Zesz. Nauk.* 44 (2000).
4. Röseler PF: *Apidologie* 4, 3 (1973).
5. Estoup A, Scholl A, Pouvreau A, Solignac M: *Mol. Ecol.* 4, 1 (1995).
6. Crozier RH, Pamilo P: Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection. Oxford University Press, Oxford USA 1996.
7. Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P: *Insectes Soc.* 47, 1 (2000).
8. Paxton RJ, Thorén P A, Estoup A, Tengö J: *Mol. Ecol.* 10, 10 (2001).
9. Payne CM, Lavery TM, Lachance MA: *Insectes Soc.* 50, 4 (2003).
10. Awram WJ: Flight Route Behaviour of Bumblebees. University of London, London 1970.
11. Haas A: *Z. Vgl. Physiol.* 31 (1949).
12. Svensson B: *Acta Univ. Uppsala.* 549 (1980).
13. Hovorka O, Urbanová K, Valterová I: *J. Chem. Ecol.* 24, 1 (1998).
14. Lloyd JE: *Florida Entomol.* 64, 1 (1981).
15. Kullenberg B: *Zoon Suppl.* 1 (1973).
16. Urbanová K, Valterová I, Hovorka O, Kindl J: *Eur. J. Entomol.* 98, 1 (2001).
17. Bergman P, Bergström G: *J. Chem. Ecol.* 23, 5 (1997).
18. Kubo R, Ono M: *Entomol. Sci.* 13 (2010).
19. Bertsch A, Schweer H, Titz A: *J. Chem. Ecol.* 34, 10 (2008).
20. Valterová I, Urbanová K, Hovorka O, Kindl J: *Z. Naturforsch. C.* 56, 5 (2001).
21. Kindl J, Valterová I, Hovorka O: *Živa* 4, 4 (1998).
22. Valterová I, Urbanová K: *Chem. List.* 91, 10 (1997).
23. Bellés X, Galofré A, Ginebreda A: *Apidologie* 18, 3 (1987).
24. Coppée A, Terzo M, Valterová I, Rasmont P: *Chem. Biodivers.* 5, 12 (2008).
25. Rasmont P, Coppée A, Michez D, De Meulemeester T: *Ann. la Soc. Entomol. Fr.* 44, 2 (2008).
26. Bertsch A, Schweer H: *Biochem. Syst. Ecol.* 40 (2012).
27. Bergström G, Bergman P, Appelgren M, Schmidt JO: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 3 (1996).
28. Free JB: Pheromones of Social Bees. Chapman and Hall, London 1987.
29. Šobotník J, Kalinová B, Cahlíková L, Weyda F, Ptáček V, Valterová I: *J. Insect Physiol.* 54, 1 (2008).
30. Luxová A, Valterová I, Stránský K, Hovorka O, Svatoš A: *Chemoecology* 13 (2003).
31. Luxová A: Disertační práce. VŠCHT, Praha 2004.
32. Žáček P, Prchalová-Horňáková D, Tykva R, Kindl J, et al.: *Chembiochem* 14, 3 (2013).

Souhrn

Prchalová D.: Samčí značkovací feromon modelových druhů čmeláků

Při lákání samic k páření používají čmeláci různé strategie spojené s uvolňováním samčího značkovacího feromonu z hlavové části labiální žlázy. Je to druhově specifická směs běžně s jednou nebo dvěma hlavními složkami. U *B. terrestris* je hlavní složkou sekretu labiální žlázy 2,3-dihydrofarnesol, u *B. lucorum* ethyltetradec-9-enoát. Složení značkovacího feromonu je známo u mnoha druhů čmeláků, ale jak probíhá jeho biosyntéza ještě není plně objasněno.

Klíčová slova: *Bombus*, samčí značkovací feromon, biosyntéza

Summary

Prchalová D.: The male marking pheromone of model species of bumblebees

Bumblebee males attract females for mating with different behavioural strategies and with a male marking pheromone released from the cephalic part of the labial gland. It is a species specific blend containing usually one or two main components. The main component of *B. terrestris* labial gland secretion is 2,3-dihydrofarnesol, while ethyl tetradec-9-enoate is the main pheromone component in *B. lucorum*. Composition of the male marking pheromone is known for many bumblebee species, but its biosynthesis has not been fully clarified.

Keywords: *Bombus*, male marking pheromone, biosynthesis

O B S A H

Úvodník	21
Zpráva z konference	22
Gratulace k jubileu	23
Blažek J.: Biologická dostupnost a proléčiva acyklických analog nukleosidů a acyklických nukleosidfosfonátů	24
Kolek J.: Manumycinová antibiotika a jejich perspektivy	28
Langerová H., Ulbrich P.: Vakcíny a vakcinace	32
Prchalová D.: Samčí značkovací feromon modelových druhů čmeláků	37

C O N T E N T S

Editorial	21
Conference Report	22
Congratulations on the jubilee	23
Blažek J.: Bioavailability and prodrugs of acyclic nucleoside analogs and acyclic nucleoside phosphonates	24
Kolek J.: Manumycin antibiotics and their perspectives	28
Langerová H., Ulbrich P.: Vaccines and vaccination	32
Prchalová D.: The male marking pheromone of model species of bumblebees	37

REDAKČNÍ RADA

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. Martina Nováková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (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, Albrechtov 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., Vídeňská 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. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
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.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT 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 platnému pro rok 2014.

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (www.bts.vscht.cz)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).