

Bio

Ročník 26 • Číslo 4/2016

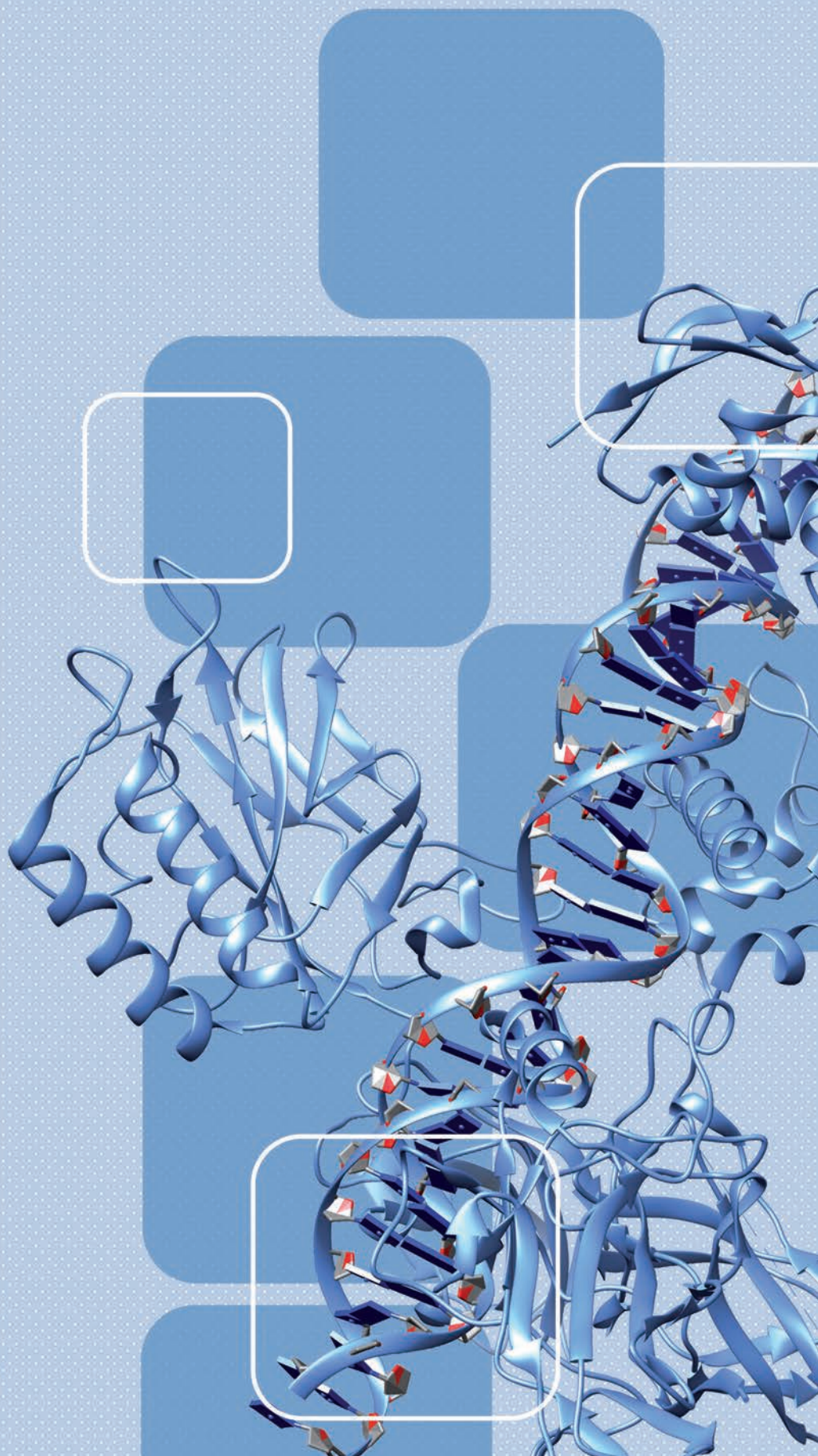
prospect

**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,

Úvodem bychom Vás rádi opětovně pozvali k účasti na našem symposiu Biotech 2017 (www.biotech2017.cz), které se bude konat ve dnech 13. – 17. června 2017 v Národní technické knihovně v Praze. Znovu připomínáme, že na tomto webu již byla otevřena registrace. Pro přípravu vědeckého programu je důležité, abyste neotáleli se zasláním abstrakt, a pokud uvažujete s publikací přehledného článku pro speciální číslo časopisu *Biotechnology Advances*, abyste na něm začali pracovat a poslali co nejdříve návrh v podobě abstraktu. Samozřejmě, že kapacita tohoto speciálního čísla je omezená. Prosíme Vás, abyste k účasti pozvali i své spolupracovníky a známé z ČR i ze zahraničí a využili účasti na symposiu k setkání se svými partnery, se kterými máte společné projekty nebo je připravujete. Stále je otevřená možnost požádat v rámci symposia různé semináře nebo workshopy. Připravili jsme také velmi zajímavý sociální program, který jistě zaujme především Vaše zahraniční současné či potenciální spolupracovníky. Těšíme se na Vaši účast a přejeme Vám úspěšné prezentace, získání nových podnětů pro Vaši další práci a navázání nových kontaktů.

Rádi bychom Vás také upozornili na novou knihu, která letos vyšla v nakladatelství Caister Academic Press. O celkem mladé laboratorní technice MALDI-TOF a možnostech její praktické aplikace jsme Vás již informovali před více jak dvěma lety v článku R. Hynka „Není hmoták jako hmoták aneb porovnání MALDI-TOF/TOF MS a LC-Q-TOF MS (*Bioprospect* 24, 6-8, 2014, č. 1). Od té doby velmi vzrostl zájem o techniku MALDI-TOF MS v mikrobiologii. Je široce využívána pro nejrůznější diagnostické účely v klinické a veterinární medicíně, ve farmaceutické, potravinářské i environmentální mikrobiologii. Je to technika, která umožňuje nahradit mnohé časově náročnější techniky identifikace mikroorganismů, včetně biochemické, imunologické a dokonce i sekvenční metodologie. Zájemcům o tuto techniku doporučujeme prostudovat si knihu „MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology“, kterou editovali Markus

Kostrzeva a Sören Schubert, ISBN 978-1-910190-42-5, Caister Academic Press.

Na letošní rok připadá 20. výročí komercializace geneticky modifikovaných plodin. K tomuto výročí připravila mezinárodní organizace ISAAA (International service for Acquisition of Agri-Biotech Application – <http://www.isaaa.org>) velmi zajímavé a přehledné video „Global Status of Commercialized Biotech Crops and 2015 Highlights“. Jeho shlédnutím můžete získat stručný informativní přehled o nesporných úspěších této technologie. Jak jistě víte, většímu rozšíření využití geneticky modifikovaných plodin, zejména v Evropě, brání přísná legislativa a permanentní vytváření negativních postojů různých organizací a sdělovacích prostředků. Zdá se, že vědecký pokrok v posledních letech přinesl určité řešení tohoto sporu tím, že objevil nové přístupy umožňující dosažení obdobných cílů, o které se snažily genetické modifikace. Positivní vlastnosti hospodářsky významných plodin lze zásadně ovlivnit nejen vložením cizích genů (genetické modifikace), ale i ovlivněním fungování původních genů („gene editing“). Klíčem k těmto novým technologiím bylo stále lepší porozumění vzájemného vztahu mezi genomem a jeho fungováním, t.j. zejména pochopení jak lze inhibovat funkci genů a měnit jejich expresi. Za posledních 20 let byla vyvinuta řada technik umožňujících ovlivnit funkci genů, z nichž největší pozornost si zasloužila technologie CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (např. www.genscript.com/CRISPR-handbook.html). Tato technologie nalezla postupně uplatnění v řadě vědeckých disciplín (neurovědy, virologie, vakcíny, výzkum rakoviny, mikrobiologie, imunologie, biologie aj.). V oblasti přípravy hospodářských plodin s novými vlastnostmi byla úspěšná např. u rýže (Mikami M et al.: Comparison of crispr/cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Bio*. 2015: 88(6); 561).

Koncem listopadu letošního roku byla publikována studie naznačující, že zvýšené riziko onemocnění diabetem druhého typu je spojeno se zvýšenými hladinami rozvětvených aminokyselin (isoleucinu, leucinu a valinu) v lidském metabolismu. Léčiva

odbourávající tyto aminokyseliny by popřípadě mohla snížit riziko vzniku diabetu. Výzkumy ukázaly, že existuje pět genetických variant v lidském genomu, které ovlivňují vysoké hladiny uvedených cirkulujících aminokyselin.

Doufáme, že i v tomto letošním posledním čísle našeho *Bioprospectu* jsme pro Vás připravili zajímavé čtení a těšíme se na vzájemný kontakt pomocí našeho bulletinu i v příštím roce. Přejeme Vám příjemné prožití vánočních svátků a po celý příští rok pevné zdraví, pohodu, mnoho radosti a úspěchů.

Srdečně Vás zdraví
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová

PF 2017

KRÁSNÉ VÁNOCE
A
ÚSPĚŠNÝ NOVÝ ROK



Biotechnologická společnost a redakce *Bioprospectu*

GATE2BIOTECH – UNIKÁTNÍ PORTÁL NEJEN O ČESKÝCH BIOTECHNOLOGIÍCH

Gate2Biotech je portál spojující biotechnologickou komunitu ve střední Evropě, zaměřený na oblast biotechnologií a jejich použití. Díky portálu mohou firmy podnikající v oboru biotechnologií vyhledávat vhodné partnery z řad výzkumných i dalších organizací, nebo zde mohou prezentovat nabídku svých služeb a oslovit tak potenciální partnery z celé České republiky i ze zahraničí.

Portál Gate2Biotech slouží jako most spojující vědecký a komerční sektor zahrnující kromě firem i organizace podporující přenos inovativních technologií. Je určen zájemcům o moderní biotechnologie a jejich aplikace.

Činnost portálu byla zahájena v roce 2005 Jiho-moravským inovačním centrem v Brně. V roce 2011 převzala správu portálu Jihočeská agentura pro podporu inovačního podnikání, o. p. s. se sídlem v Českých Budějovicích. Ta se kromě správy portálu zabývá podporou a rozvojem inovací v Jihočeském kraji, uplatněním výsledků výzkumu a vývoje v praxi a podporou inovativních podnikatelských subjektů. Zároveň spravuje I. etapu vědeckotechnického parku v Českých Budějovicích.

Portál existuje ve dvou na sobě nezávislých jazykových verzích: české, která je určena domácím návštěvníkům (www.gate2biotech.cz) a anglické, určené návštěvníkům ze zahraničí (www.gate2biotech.com). Obě verze portálu jsou rozděleny do několika sekcí, v nichž si návštěvníci mohou najít potřebné informace.

Z české verze portálu stojí za zmínku především následující sekce:

Autorské články a zajímavosti ze světa biotechnologií – články na aktuální téma zpracované od vybraných vědeckých pracovníků, zpravidla vycházejí ze zahraničních zdrojů.

Zpravodajství – odborné články na různá biotechnologická témata převzatá ze zahraničního tisku.

Zaměstnání – pracovní nabídky i poptávky v oblasti biotechnologií.

Akce a konference – přehled o plánovaných biotechnologických konferencích, seminářích, workshopech a dalších odborných akcích z ČR i ze zahraničí.

Informujeme Vás, doporučujeme – aktuality z oblasti biotechnologií, blížící se akce určené pro širokou veřejnost.

Katalog firem – unikátní databáze výzkumných pracovišť a biotechnologických firem v ČR.

Nabídky ke spolupráci – (bio)technologické nabídky a poptávky spolupráce od potenciálních partnerů ze zahraničí, partnerem této sekce je síť Enterprise Europe Network.

Zájemci, kteří chtějí být pravidelně informováni o novinkách z portálu, mají možnost se zaregistrovat k odbírání newsletteru. Zpravodaj je rozesílán na registrované kontakty vždy začátkem měsíce a shrnuje všechny nově uveřejněné články za předchozí měsíc. Biotechnologické aktuality nejen z portálu lze sledovat také na Facebooku Gate2Biotech.

Portál spolupracuje s celou řadou zajímavých partnerů (např. Biotrin, Biopropect, Nasdaq GlobeNewswire, Jiho-moravské inovační centrum, aj.) a je mediálním partnerem vybraných biotechnologicky zaměřených akcí.

V případě zájmu o spolupráci či navázání partnerství je možné kontaktovat Terezu Pišovou na emailu **pisova@jaip.cz**.

www.Gate2Biotech.cz

- Biotechnologický portál
- Vše o biotechnologiích na jednom místě.

© 2006 - 2016 Jihočeská agentura pro podporu
inovačního podnikání o.p.s.

TECHNOLOGIE PRODUKCE OMEGA-3 MASTNÝCH KYSELIN POMOCÍ MIKROŘASY *JAPONOCYTRIUM* SP. ZÍSKALA CENU VIZIONÁŘI 2016

Petr Kaštánek^{1,2}, Tomáš Brányík²

¹EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha, ²Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; kastanek@ecofuel.cz

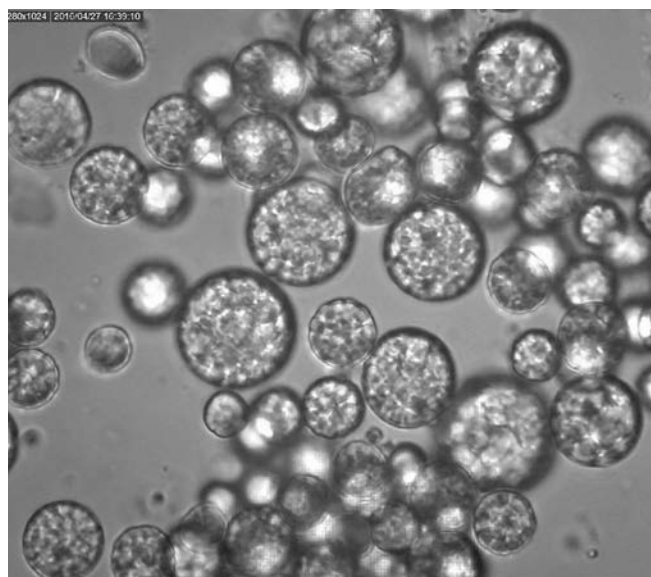
Z nutričního hlediska jsou vysoce ceněné nenasycené mastné kyseliny s dlouhými řetězci (s obsahem C > 18), které nejsou vyšší rostliny schopné syntetizovat, jako jsou kyseliny ARA (struktura 20:4 omega 6, 9, 12, 15), DHA (struktura 22:6 omega 3, 6, 9, 12, 15, 18) a EPA (struktura 22:5 omega 3, 6, 9, 12, 15), které jsou nepostradatelné jako korektory vývoje mozku a očí u dětí, resp. jako doplňky pro kardiovaskulární péči u dospělých. Klinické studie potvrzují též účinky při léčbě aterosklerózy, rakoviny, revmatoidní artritidy a degenerativních onemocnění spojených s věkem, jako makulární degenerace či Alzheimerovy choroby (Simopoulos, A. P., R. R. Kifer, R. E. Martin, and S. M. Barlow (eds.), *Health Effects of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids*, S. Karger AG, Basel, Switzerland, 1991; Nettleton, A. J. (ed.), *Omega-3 Fatty Acids and Health*, Chapman and Hall, New York, 1995; Drevon, C. A., I. Baksaas, and H. E. Krokan (eds.), *Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1993). Průmyslově využívaným zdrojem omega-3 mastných kyselin je rybí olej, obsahující až 30 % EPA a DHA (Galli, C., and A. P. Simopoulos (eds.), *Dietary ω 3 and ω 6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality*, Plenum Press, New York, 1989). Využití rybího oleje je však spojeno s řadou problémů, zejména nepříjemnou chutí a vůní, problémy se stabilitou produktu, vysokými náklady na izolaci ze směsi s jinými mastnými kyselinami. V neposlední řadě hrají významnou roli faktory environmentální, riziko kontaminace rybích tuků toxickými látkami, např. PCB a snižování stavu populací mořských ryb.

Tyto faktory, spolu s faktem, že ryby získávají nenasycené mastné kyseliny konzumací primárních producentů – zooplanktonu – vedly k intenzivnímu výzkumu možností produkce nenasycených mastných kyselin pomocí mořských mikroorganismů, zejména jednobuněčných řas (Yongmanitchai, W., and O. P. Ward, *Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production*, *Process Biochem.* 24:117–125 (1989)).

Tým výzkumníků společnosti EcoFuel Laboratories s.r.o. a Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod vedením Ing. Petra Kaštánka PhD. se proto vypravil do hlubin oceánů pátrat po alternativním zdroji těchto, pro lidský organismus nezbytných, látek. Nalezli jej v řasám podobným mikroorganismech rodu *Japonochytrium*, které izolovali z listů mangrovníků spadlých na mořské dno a posléze identifikovali jako *Japonochytrium marinum* kmen AN4 z rodu Thraustochytriales (zástupci řádu Thraustochytriales), což jsou saprofytické druhy vyskytující se ve slaných vodách na povrchu řas, organickém detritu či cévna-

tých rostlinách. Produkční kmen byl následně připraven mutagenézí přírodního izolátu – ozáření buněk v exponenciální fázi růstu UV zářením a následnou selekcí klonů s vysokou růstovou rychlostí a produktivitou DHA, kdy obsah DHA může za vhodných kultivačních podmínek a limitace klíčovými nutrieny dosahovat až 16 – 25 hm % sušiny biomasy.

Produkce kmene se může provádět např. vsádkovým postupem, fed-batch či kontinuálně, v médiu o vhodné salinitě odpovídající cca 50 – 100 % mořské soli. Produkční kmen se kultivuje v kapalném médiu obsahujícím organický uhlík, načež po kultivaci se oddělí biomasa obsahující kyselinu dokosaheptaenovou. Jako zdroj organického uhlíku může kapalně médium obsahovat glukózu, glycerol, kyselinu octovou či její estery nebo etanol. Vypěstovanou biomasu je možno využít přímo vlhkou (např. jako krmné aditivum pro ryby, drůbež či hospodářská zvířata), popř. po odvodnění (např. vysušením na sprejové sušárně). Výroba kyseliny dokosaheptaenové dále může pokračovat separací lipidů obsahujících DHA či volné DHA z kultivačního média nebo vlhké či suché biomasy pomocí fyzikálně-chemických separačních metod, jako je lisování, extrakce rozpouštědly, superkritická extrakce CO₂, působení ultrazvuku a/nebo mikrovlnného záření, extrakce spojená s chemickou reakcí atd. Takto extrahované lipidy či frakce lipidů mohou být dále rafinovány s cílem oddělení jiných mastných kyselin a získání DHA o vyšší čistotě. Takovýto produkt pak může být využit jako surovina ve speciálních potravinářských, farmaceutických a kosmetických aplikacích.



Obr. 1: Mikroskopická fotografie buněk *Japonochytrium* sp.

Produkční kmen i postup jeho kultivace jsou chráněny několika českými i mezinárodními patenty. Vyvinutý biotechnologický postup je unikátní mimo jiné využitím nečištěné glycerínové frakce z enzymatické trans esterifikace odpadních olejů na bio diesel (další technologie vyvíjená v rámci centra BIORAF) jako substrátu pro růst mikroorganismu, dále pak použitím odpadního solného roztoku z demineralizace sladké mléčné syrovátky jakožto součásti kultivačního média k účelu produkce biomasy, kdy tento odpadní solný roztok může tvořit 50 až 95 % obj. kultivačního média. To dále umožňuje efektivně využít problematický odpad z mléčného průmyslu (Humhal, T., Kastanek, P. et al. Use of saline waste water from demineralization of cheese whey for cultivation of *Schizochytrium limacinum* PA-968 and *Japonochytrium marinum* AN-4. Bioprocess Biosyst Eng (2016)).

Technologie byla vyvinuta v rámci Centra kompetence pro výzkum biorafinací BIORAF, ve spolupra-

cí firmy EcoFuel Laboratories a VŠCHT Praha. Na vývoji technologie se za VŠCHT Praha dále podílejí prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., prof. Ing. Tomáš Brányik, Ph.D., Ing. Dana Savická, Ing. Tomáš Humhal a Ing. Olga Kronusová. Výzkum finančně podpořila Technologická agentura České republiky TA ČR a vznikl tak jedinečný produkt, který představuje ekologickou alternativu k rybímu tuku, šetrnou k životnímu prostředí a vhodnou i pro vegetariány. Dne 8. 12. 2016 byla technologii produkce Omega-3 mastných kyselin z mikrořasy *Japonochytrium* za její technologický a společenský přínos v oblasti potravinářství, zdravotnictví a farmacie udělena cena Vizionáři 2016 společností CzechInno, která v rámci projektu Vizionáři oceňuje výjimečné inovační počiny v českém podnikání s významným technologickým, sociálním a/nebo ekonomickým přínosem.



VZPOMÍNKA NA PANÍ PROF. RNDR. DANUŠI SOFROVOU, CSC.



V pondělí 15. srpna 2016 odešla po dlouhém boji se zákeřnou chorobou ve věku 78 let paní profesorka Danuše Sofrová. A tak ji již nebudeme moci potkávat v prostorách katedry biochemie, s jejím jakoby „stále trvajícím“ úsměvem.

Profesorka Sofrová (roz. Bartková) pocházela z Písku, kde se narodila 25. dubna 1938, a kam se také ráda vracela, a to nejen ve svých vzpomínkách. Po studiu na jedenáctileté střední škole v rodném městě byla v roce 1956 přijata ke studiu na katedru biochemie, tehdy spadající pod Fakultu matematicko-fyzikální UK. Po ukončení svého studia na této katedře, která po reorganizaci v roce 1959 příslušela již pod Přírodovědeckou fakultu UK (kde pod vedením prof. RNDr. PhMr. Sylvy Leblkové, CSc. v roce 1961 obhájila diplomovou práci „Studie enzymových aktivit spojených s tvorbou alkaloidů v durmanu“), byla na tomtéž pracovišti také zaměstnána. Od ledna 1961 nejprve jako asistentka, dále jako pedagogická asistentka, od roku 1964 jako odborná asistentka, od roku 1991 jako docentka a od roku 1994 jako profesorka biochemie. A svou práci zůstala katedře biochemie věrná až do roku 2012, kdy jí již její zhoršující se zdravotní stav neumožnil pokračování v práci ani na částečný úvazek. Přesto jsme se s ní rádi setkávali i v dalších letech. Bylo od ní milé, že i přes své zdravotní komplikace udržovala stálý kontakt s pracovníky katedry biochemie a katedru také ráda navštěvovala.

Více než padesátiletá pedagogická práce paní profesorky zahrnovala nejen vedení řady praktických kurzů a výuku biochemie (např. praktická cvičení z biochemie, přednáška Biochemie pro učitelské kombinace nebo přednáška Bioenergetika), ale nepřehlédnutelnou stopou je také příprava učebních textů pro studenty (např. skripta Biochemie – Základní kurz, D. Sofrová a kolektiv autorů, 2009, Nakladatelství Karolinum). Nedílnou součástí její činnosti na katedře biochemie bylo uvedení řady studentů do oboru biochemie jako vědní disciplíny, tedy školení závěrečných studentských diplomových a disertačních prací. Z velkého zástupu 37 obhájených diplomových prací školených od konce 60. let (první obhájená diplomová práce v roce 1967, R. Mikšanová), lze jmenovat J. Hladíka, J. Komendu, F. Váchu, V. Vilíma, J. Wilhelma a řadu dalších. Nejenže paní profesorka stála na startovní čáře vědecké dráhy řady odborníků, ale zajímala se také o jejich další vědeckou kariéru a udržovala s nimi stále kontakt a přátelské vztahy. To byl také jeden z nepřehlédnutelných rysů paní profesorky.

Ačkoli se katedra biochemie stala klíčovým pracovištěm také pro vědeckou činnost paní profesorky, a to především na poli procesu fotosynthesy, respirace, stavby fotosyntetického aparátu autotrofních organismů, vlivu minerálů či těžkých kovů při jeho tvorbě a funkci, spolupracovala s řadou českých laboratoří (např. VŠZ – Praha, VÚ obilnářský – Kroměříž, MFF UK, MBU – Třeboň). Kromě toho v letech 1969 – 1970 úspěšně reprezentovala katedru při svém vědeckém pobytu na universitě v Cambridge (roční stáž podpořená Britskou biochemickou společností stipendiem Unilever European Fellowship). V roce 1980 pracovní pobývala v Aténách a v roce 1988 v Regensburgu (dvouměsíční stáž). Kromě toho byla v letech 1976 – 1986 zapojena do mezinárodního vědeckého projektu „Přeměna sluneční energie a fotosyntetická produktivita“ podporovaného v rámci zemí RVHP. Paní profesorka byla i členkou řady odborných společností: např. Československé společnosti biochemické (dnes ČSBMB) a v 80. letech Americké společnosti pro fotobiologii. Kromě pedagogické a vědecké činnosti se věnovala i redakční práci v tematice svého odborného zájmu. Od roku 1991 byla členkou redakční rady časopisu *Photosynthetica*, a to až do minulého roku, kdy ze zdravotních důvodů byla nucena i tuto svou aktivitu ukončit.

Kdykoli si vzpomeneme na paní profesorku v jakémkoli zmíněném pohledu, ať osobním (milovala vážnou hudbu a operu), tak pracovním (jako lektorku či školičku), nechť je tato vzpomínka provázena jejím úsměvem.

Za pracovníky katedry biochemie,

Miroslav Šulc a Marie Stiborová

MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADŮ Z POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU A ZEMĚDĚLSTVÍ V BIOTECHNOLOGIÍCH

Lucia Gharwalová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; gharwall@vscht.cz

Úvod

U levných produktů biotechnologické výroby je žádoucí hledat levné substráty pro jejich produkci. U těchto materiálů je důležitá řada charakteristik, jako je nízká cena, vysoká rychlost utilizace substrátu, vysoká výtěžnost produktu, malá nebo žádná tvorba vedlejších produktů a dostupnost substrátu po celý rok.

Celosvětově, je každoročně vyprodukováno 140 miliard metrických tun biomasy jako vedlejšího produktu zemědělské a potravinářské výroby. Hlavní zdroje biomasy lze rozdělit do několika kategorií¹:

- zemědělský odpad: zemědělská biomasa obecně zahrnující zbytky po separaci zrna, jako například stonky, sláma, listy, kořeny, lusky či skořápky.
- živočišný zemědělský odpad z chovu hospodářských zvířat
- odpad ze zpracování potravin: výlisky z ovoce (kůra, semínka, dužina), kaly z odpadních vod, pivovarský odpad (mláto, výstřelky, odpadní kvasinky), odpady z vinařské výroby (výlisky, stonky), odpady ze škrobářského průmyslu, odpad z mlékářského průmyslu (syrovátka), odpad ze zpracování masa
- lesnický odpad: štěpky ze dřeva, kůra, piliny, úlomky dřeva
- městský odpad: tuhý odpad z domácností, kal z čistíren odpadní vody, odpadní papír
- mořské odpady: odpad z průmyslu zpracování ryb (šupiny, kůže, vnitřní orgány, hlavy, ploutve), skořápky korýšů, odpad z měkkýšů (hlavy a krunýře)
- odpad z biotechnologické výroby: odpadní biomasa vláknitých hub/bakterií/kvasinek/řas
- odpad z výroby biopaliv: glycerol z výroby biodieselu

Přesto, že utilizace těchto odpadních materiálů na energii a jiné průmyslové produkty zaznamenává rostoucí trend, je biomasa nadále do velké míry nevyužita, především v rozvojových zemích, které nemají silné regulační zákony. Častokrát se tak stává, že je biomasa jenom spálena, což má za důsledek znečištění ovzduší. Biomasa je obnovitelným zdrojem energie, avšak může způsobovat značné ekologické problémy, pokud není využita. Je tedy i výzvou konvertovat biomasu na zdroj energie a další produkty¹.

Správná strategie k využití odpadní biomasy je v zlepšení účinnosti konverze produktu, recirkulaci technologických ztrát a optimalizaci tvorby vedlejších produktů. Navíc je důležité, aby předúprava vstupního materiálu nebyla příliš ekonomicky náročná, čímž by se z relativně levného materiálu rázem stal substrát drahý.

Lignocelulosové odpady

Lignocelulosa je hlavní strukturní složka dřevnatých i nedřevnatých bylin. Velké množství lignocelulotického odpadu je produkováno při lesnických a zemědělských postupech (sláma, oklasky, otruby), či při výrobě papíru². Lignocelulosa je složená z ligninu, celulosy a hemicelulosy³. Vzhledem k obtížnosti rozpuštění ligninu, aniž by byly některé z jeho podjednotek zničeny, je jeho přesná chemická struktura neznámá. Obecně obsahuje lignin tři aromatické alkoholy, a to koniferylalkohol, sinapyl, *p*-kumaryl alkohol. Poměr těchto tří složek je variabilní podle zdroje, z nichž byl lignin izolován⁴. Hemicelulotické makromolekuly jsou často polymery pentos, zejména xylosy a arabinosy, hexos, většinou manosy, a několik cukerných kyselin. Celulosa je homogenní polymer složený z glukosových jednotek. Po rozkladu jsou tyto materiály zdrojem hexos i pentos².

Lignocelulosové materiály je nutné před fermentací upravit, aby se narušily vazby mezi ligninem, celulosou a hemicelulosou. Tento proces je dvoustupňový, nejprve se rozruší kompaktní struktura a pak se enzymově rozloží celulosa. Předúprava substrátu předchází jeho enzymatické hydrolyze a samotné fermentaci. Může být fyzikální (záření), chemická (roztoky kyselin či zásad) nebo fyzikálně-chemická (předúprava pomocí zvýšené teploty, tlaku a chemických činidel) a napomáhá rozpustnosti hemicelulosy a ligninu. Kromě toho zvyšuje dostupnost celulosy enzymům⁵.

Lignocelulosové hydrolyzáty, zejména hydrolyzáty připravené kyselou hydrolyzou materiálu, mohou obsahovat i inhibitory jako furfural, fenoly a karboxylové kyseliny. Tyto inhibitory se nacházejí většinou v kapalně fázi po kyselé hydrolyze. Pro enzymový rozklad se bere pevná fáze obsahující celulosu, která ovšem může také obsahovat inhibitory. Jejich koncentrace se dá snížit promytím. Problémem jsou inhibitory ve chvíli, kdy se neseperuje kapalná a pevná frakce po předúpravě. Detoxifikace média před fermentací je časově i ekonomicky náročný proces. Je výhodné, když jsou mikroorganismy schopné růst na hydrolyzátech s vysokým obsahem sušiny⁶.

Lignocelulosové médium musí obsahovat dostatečné množství uhlíku, dusíku, fosfátu, síry a solí pro udržení růstu mikroorganismů a tvorbu produktů. Optimální koncentrace živin je závislá na povaze substrátu a výběru produkčního organismu. Mnohé z těchto živin se přirozeně nevyskytují v lignocelulosových hydrolyzátech a proto musí být do média přidány.

Syrovátka

Syrovátka je vedlejší produkt výroby sýru, kdy je odstraněn tuk a kasein. V mlékárenském průmyslu je produkován v množství 9 kg na 1 kg sýru nebo 6 kg na 1 kg tvarohu. Syrovátka je bohatým zdrojem minerálů, vápníku, fosforu, draslíku, sodíku a železa. Zároveň je zdrojem vitaminů skupiny B – riboflavinu a kyseliny pantothenové. Syrovátkový permeát je vyráběn odstraněním 99 % proteinů a téměř 100 % tuků přítomných v syrovátce. Typické složení syrovátky a syrovátkového permeátu je v uvedeno v Tab. 17.

Tab. 1: Složení syrovátky a syrovátkového permeátu

	Syrovátka	Syrovátkový permeát
pH	4,7- 6,1	6,1
Sušina (%)	6,58 – 6,88	5,7
Laktosa (%)	4,5 – 6	5
Proteiny (%)	0,4 – 0,6	0,01
Tuk (%)	0,05 – 0,25	< 0,01
Laktát (%)	0,15 – 0,61	0,15
Popel (%)	0,05 – 0,8	
Minerály (mg/100 g)		
Vápník	45 – 103	140
Fosfor	40 – 80	103
Hořčík	8 – 10	–
Draslík	140 – 145	–
Železo	600 – 800	–
Sodík	40 – 60	50
Vitamíny (μg/100 g)		
Vitamín C	850 – 950	–
Thiamin	30 – 40	–
Pentotenát	340 – 370	~ 360
Riboflavin	140 – 150	–
Vitamín B ₆	40 – 50	–
Vitamín B ₁₂	240 – 250	–
Biotin	40 – 50	–
Kyselina listová	4	–

Nejčastější druh syrovátky pochází z výroby sýru, kde je zpracování mléka založeno na koagulaci kaseinu pomocí syřidla, obsahujícího chymozin nebo jiný kasein-koagulující enzym. Syřidlem indukované srážení kaseinu nastává při přibližném pH 6,5 a tento typ syrovátky se označuje jako sladká syrovátka. Druhým typem syrovátky je takzvaná kyselá syrovátka vznikající z procesů využívajících fermentaci nebo po přidavku organických či anorganických kyselin. Kyselá syrovátka má pH nižší než 5 a je vedlejším produktem výroby sýrů jako ricotta a cottage sýr. Hlavní rozdíl mezi oběma typy je v obsahu minerálních látek, kyselosti a složení frakce syrovátkového proteinu. Při srážení kaseinu syřidlem je do syrovátky uvolňován glykomakropeptid, který tvoří 20 % celkového obsahu proteinů. Při nízkém pH (<5)

je koloidní vápník obsažený v micelách kaseinu rozpouštěn a přechází do syrovátky⁷.

S odstraňováním nebo opětovným využíváním syrovátky je spojeno několik problémů. Je neekonomické transportovat syrovátku na větší vzdálenosti kvůli velkému obsahu vody. Zároveň je tento materiál i náchylný na bakteriální kontaminaci a nemůže být dlouhodobě skladován bez speciálních opatření. Zařízení na sušení syrovátky vyžaduje velké vstupní investice, je náročné na energii a je často neekonomické. I když bylo zkoumáno několik možností využití syrovátky, hlavní část světové produkce syrovátky je nadále likvidována jako odpadní voda. Její likvidace jako odpad představuje vážný problém znečištění okolního prostředí, protože to má vliv na fyzikální a chemickou strukturu půdy, což vede ke snížení výnosu plodin. Při uvolnění do vodních nádrží, ohrožuje vodní život vyčerpáním rozpuštěného kyslíku. Většina průmyslově rozvinutých zemí má přísné předpisy upravující likvidaci odpadních vod. Biologické čističky odpadních vod mohou pomoci při likvidaci syrovátky, tato je ovšem často finančně náročná⁷.

Přítomnost laktosy a jiných základních živin pro růst mikroorganismů je lákavá z hlediska využití syrovátky jako média v biotechnologických procesech.

Lihovarské výpalky

Lihovarské výpalky vznikají jako sekundární produkt destilace lihu. Výpalky jsou jedním z nejvýznamnějších odpadních materiálů lihovarského průmyslu. Během procesu jich vzniká velké množství, z procesu výroby tak získáváme přibližně 13 hl výpalků na 1 hl vyprodukovaného etanolu⁸.

Jedná se o řídkou tekutinu s viditelnými jemnými až hrubšími částicemi. Její barva je závislá na použité surovině, podle ní se výpalky dělí na bramborové, melasové, obilné či ovocné. Nejvýznamnější složkou výpalků jsou dusíkaté látky. Aminokyselinové a bílkovinné složení výpalků je zvýšené obsahem kvasinek. K jejich výživové hodnotě přispívá i vysoký obsah vitaminů, a to zejména skupiny B, enzymů a růstových látek, které kvasinky během fermentačního procesu syntetizovaly. Lihovarské kvasinky lze využít i samostatně jako krmné droždí nebo ve farmaceutickém průmyslu jako doplněk stravy⁸.

Přesné složení výpalků ovšem vždy závisí na vstupním materiálu, a proto mohou být koncentrace daných látek proměnlivé. Výpalky obsahují málo vápníku, jsou však bohatým zdrojem draslíku. U výpalků z cukrové třtiny je hlavním zdrojem uhlíku a energie sacharosa (0,2 g/l), u kukuřičných výpalků je to především glukosa. Obsah zdrojů uhlíku, především zkvasitelných cukrů, není vysoký kvůli předchozí alkoholové fermentaci. Nicméně, výpalky mohou být dobrým zdrojem dusíku, vitaminů a minerálů, které pocházejí jak ze samotné suroviny, tak i z kvasinek. Podle konkrétního složení výpalků se do média musí přidávat kromě zdrojů uhlíku i zdroje hořčíku nebo manganu⁹.

Melasa

Melasa je hlavním vedlejším produktem výroby cukru. Při výrobě 3 t rafinovaného cukru vzniká přibližně

ně 1 t melasy. Kvalita melasy je závislá na výchozím materiálu použitém při výrobě (cukrová třtina nebo řepa), na metodě a efektivnosti extrakce cukru. Obecně tvoří zkvasitelné cukry 48 – 50 %, avšak se zlepšením rafinačních technik se může toto číslo pohybovat i pod 42 %. Třtinová melasa obsahuje zpravidla více invertních cukrů (glukosu a fruktosu), sodíku a vápníku. Oba typy melasy obsahují nečistoty, které mohou inhibovat fermentaci. Melasa se využívá jako médium při výrobě etanolu, kyseliny citrónové a droždí¹⁰.

Glycerol

Glycerol, také nazývaný glycerin, je jednoduchá polyolová sloučenina. Jedná se o bezbarvou, viskózní kapalinu bez zápachu, která se běžně používá ve farmaceutické či kosmetické výrobě¹¹.

Glycerol je v poslední době levným a bohatým zdrojem uhlíku proto, že vzniká jako vedlejší produkt z výroby bionafty, oleo-chemických sloučenin a bioetanolu. Bionafta je odvozena z transesterifikačních reakcí triglyceridu s alkoholem za vzniku esteru a glycerolu. Produkce 10 t bionafty vytváří přibližně 1 t glycerolu¹². Kromě toho, se nabízejí i možnosti pro ještě větší množství vyrobeného glycerolu vzhledem k syntéze a intracelulární akumulaci vysokých koncentrací glycerolu v některých druzích řas.

Odpad z pivovaru

Pivovary se snaží zaměřit se na recyklaci všech odpadních materiálů a vedlejších produktů, které jsou generovány během pivovarských postupů. Tam, kde je to možné, mohou pivovary také prodávat tyto materiály a vedlejší produkty, a tím eliminují potřebu likvidace. Nakládání s odpady a vedlejšími produkty může být také poháněno sekundární tržní hodnotou vedlejších produktů¹³.

Vzhledem k velkému počtu kroků v procesu přípravy piva, a jeho vsádkovému charakteru, je vyprodukováno

enormní množství odpadní vody. Množství a charakteristika takové odpadní vody se může lišit podle ročního období a typu procesu. Pivovarské výstřelky jsou jedním z nejvýznamnějších odpadních produktů vznikající během pivovarského procesu.

Jako výstřelky se označuje horká voda použitá k vyslazení extraktu z mláta. Cukernatost výstřelků postupně klesá, mláto se vyluhuje a mění se jeho konzistence. Vyslazování se zastaví při 0,5 % až 1,5 % extraktu. Voda zbylá po vyslazení v mlátě se nazývá patoky. Výstřelky obsahují roztok cukrů, a to především nez cukřený škrob, pak maltosu, glukosu a celulosu. Výstřelky mají charakteristickou vysokou biochemickou spotřebu kyslíku¹⁴.

Mláto je nejhojnější vedlejší produkt pivovarství, odpovídá přibližně 85 % z celkového počtu vyprodukovaných vedlejších produktů. Vyprodukuje se přibližně 20 kg mláta na 100 l piva.

Mláto je lignocelulosový materiál, bohatý na proteiny, které tvoří 20 až 70 % jeho sušiny. Kromě toho je mláto složeno z celulosy, arabinoxylanu, ligninu, tuků a popela. Minerály, vitamíny a aminokyseliny jsou v něm obsaženy také. Minerální prvky zahrnují vápník, kobalt, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, selen, sodík a síru, vše v koncentracích nižších než 0,5 %. Vitamíny zahrnují: biotin, cholin, kyselinu listovou, niacin, kyselinu pantothenovou, riboflavin, thiamin a pyridoxin; proteiny vázané v aminokyselinách zahrnují v největším množství leucin, valin, alanin, serin, glycin, kyselinu glutamovou a kyselinu asparagovou¹⁵.

Závěr

Čistý cukr a komplexní zdroje dusíku jsou obvykle drahé a proto je snaha hledat levnější alternativy. Právě odpadní materiály z potravinářské a zemědělské výroby mohou být díky svému složení dále využity jako zdroj uhlíku či dusíku v biotechnologické výrobě.

Literatura

1. Brar S, Dhillon G, Fernandes M: Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. Springer Science & Business Media, New York (2013).
2. Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, et al.: *Afr. J. Biotechnol.* 2, 602 (2013).
3. Chen H: Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice. Springer, Beijing (2014).
4. Kuhad R, Singh A: Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects. I. K. International Pvt Ltd, New Delhi (2007).
5. Singh OV, Harvey SP: Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy. Springer Science & Business Media, London (2009).
6. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K: *J. Biotechnol.* 156, 286 (2011).
7. Martin AM: Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. Springer Science & Business Media, New York (2012).
8. Dominik P: Diplomová práce, VŠCHT Praha (2008).
9. Dowd MK, Johansen SL, Cantarella L, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 283 (1994).
10. Hacking A: Economic Aspects of Biotechnology. CUP Archive, New York (1987).
11. da Silva GP, Mack M, Contiero J: *Biotechnol. Adv.* 27, 30 (2009).
12. Kurosaka T, Maruyama H, Naribayashi I, et al.: *Catal. Commun.* 9, 1360 (2008).
13. Mathias T, de Mello P, Sérvulo E: *J. Brew. Distill.* 5, 1 (2014).
14. Basařová G, Čepička J: Sladařství a pivovarství. SNTL-Nakladatelství technické literatury, Praha (1985).
15. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC: *J. Cereal Sci.* 43, 1 (2006).

Souhrn

Gharwalová L.: Možnosti využití odpadů z potravinářského průmyslu a zemědělství v biotechnologiích

Odpadní suroviny mají velký potenciál v biotechnologiích, kde mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie nebo dusíku v produkčních médiích. U odpadních materiálů je důležité, aby splňovaly několik podmínek, jako je nízká cena, lehká utilizace substrátu a tvorba co nejméně vedlejších produktů. I z ekologického hlediska je žádoucí konvertovat odpad z potravinářského a zemědělského průmyslu na zdroj energie nebo na jiné produkty.

Klíčová slova: biomasa, odpadní produkty, lignocelulosa, syrovátka, mláto

Summary

Gharwalová L.: Possibilities of using waste from food industry and agriculture in biotechnologies

Waste materials have great potential in biotechnologies, as they can serve as a source of carbon and energy in production medium. Waste materials have to meet several requirements such as low cost, easy substrate utilization, and creating of as little by-products as possible. Even from an ecological perspective, it is desirable to convert waste from food and agricultural industry into energy source or other products.

Keywords: biomass, waste products, lignocellulose, whey, draff

NANOMECHANICKÉ BIOSENSORY

Petr Skládal, Jan Příbýl, Martin Pešl, Vladimír Rotrekl

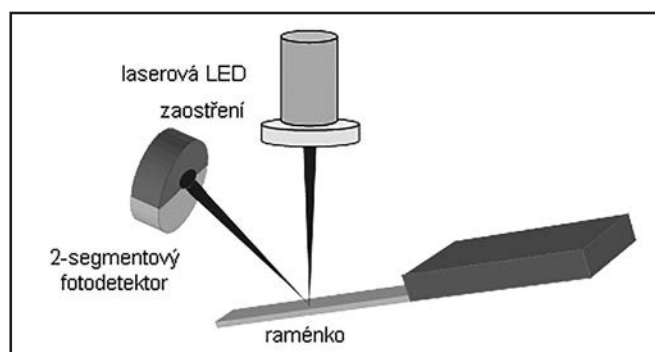
Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno; skladal@chemi.muni.cz

Úvod

Biosensory jsou analytická zařízení sestávající z biorekogničního prvku v kombinaci s vhodným fyzikálně-chemickým převodníkem; poskytují signál úměrný koncentraci stanovené látky ve vzorku. Historicky první převodníkem byl kyslíkový sensor vynalezený L. C. Clarkem v roce 1956 a z něj pak vyšel glukosový biosensor. Dnes nejčastější jsou elektrochemické převodníky jako základ enzymových elektrod. Další pestrou skupinou jsou optické systémy od světlovodných vláken až po sofistikované varianty na bázi povrchové plasmonové resonance (SPR). Svou úlohu sehrávají také piezoelektrické (někdy uváděny jako akustické) a termistorové systémy. Historicky nejmladším zástupcem jsou zřejmě nanomechanické převodníky vycházející z mikroskopie atomárních sil (AFM) a reprezentující jednu z možností uplatnění nanotechnologií na poli biosensorů¹. Nanomechanické (nanometrové ohyby raménka) či mikromechanické (mikrometrové rozměry raménka) jsou alternativní názvy. Tento příspěvek shrnuje naše zkušenosti s nanomechanickými převodníky při konstrukci imunoafinitních a buněčných biosensorů.

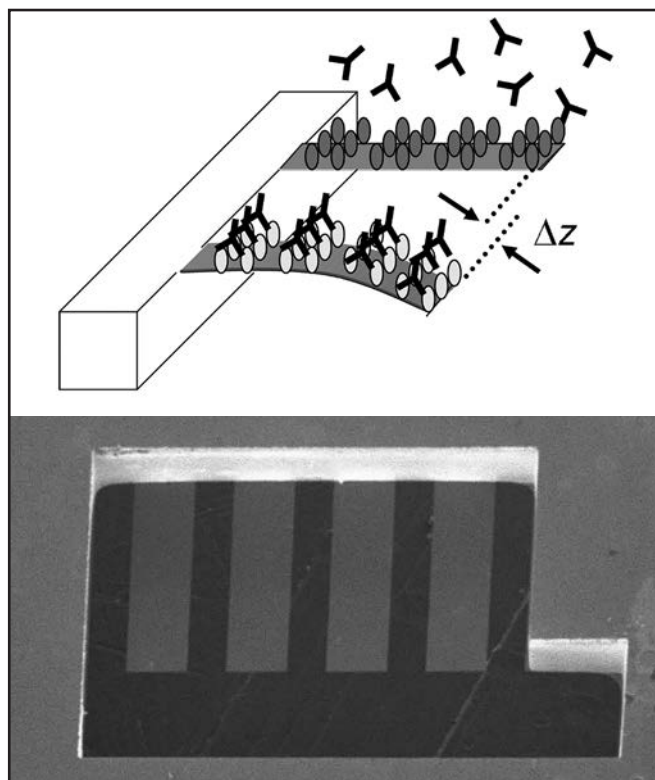
Mikroraménko jako převodník

Mikroskopie na bázi atomárních sil dnes mimo fyziku a materiálový výzkum slouží jako nástroj v biologii pro detailní studium topografie a dalších vlastností



Obr. 1: Schématické znázornění optického vyhodnocování výchylky mikroraménka pomocí dvousegmentové fotodiody.

biostruktur až zobrazování jednotlivých biomolekul. Zkoumaný vzorek je skenován miniaturním hrotem na konci flexibilního raménka (také nazýváno nosník či mikrokantilevr) a vyhodnocuje se ohyb raménka v důsledku působení meziatomových sil vznikajících při přiblížení atomů na konci hrotu s atomy na povrchu vzorku. Subnanometrové výchylky se vyhodnocují pomocí optického mechanismu na bázi vychýlení laserového paprsku odraženého povrchem raménka na dvou- (nebo čtyř-) segmentovou fotodiodu (Obr. 1 vlevo); rozlišení výchylky je lepší než 0,1 nm.



Obr. 2: Nahoře diferenciální uspořádání pro sledování afinitní interakce (vazba protilátky na raménko s tmavě znázorněným ligandem) a korekci na rušivé vlivy a nespecifickou vazbu (raménko se světle znázorněnou inertní biomolekulou). Signálem je rozdíl prohybů mezi oběma raménky Δz . Dole mikroskopické znázornění čipu pro průtočné měření se 4 nezávislými raménky.

Pokud se použije modifikovaný hrot nesoucí imobilizované biomolekuly, lze měřit velikost sil v komplexu s komplementárním afinitním partnerem přítomným na povrchu vzorku². Technika se nazývá silová spektroskopie, změřené velikosti síly F při přibližování a oddalování hrotu (vzdálenost z) umožní charakterizovat jevy jako konformační změny proteinů při deformaci nebo roztrhávání složek biokomplexu.

Avšak raménko samo o sobě (i bez hrotu) nabízí použití jako (bio)sensorový převodník – jeho ohyb nastává v důsledku rozdílného povrchového napětí σ (stres) na různě modifikovaných stranách (Obr. 2)^{3,4}. Novou možností je pak pomocí raménka sledovat mechanické změny pohybujících se biologických struktur. Obě varianty jsou dále podrobněji popsány.

Sledování afinitních interakcí

Obvykle se biorekogniční element naváže pouze na jednu stranu raménka. Díky miniaturním rozměrům se výhodně používají dvě různě modifikované raménka pro kompenzaci rušivých jevů (nespecifická adsorbce molekul, teplotní fluktuace, proudění okolní kapaliny, Obr. 2). Množství ramének na nosném čipu je možné zvýšit (dnes až 10 není problémem), imobilizovat na každé různé biorekogniční molekuly (protilátky, oligonukleotidy) a tak zvýšit počet detekovaných analytů ve vzorku. Pro rozdíl povrchových napětí vyvolaný biointerakcí – vznikem biokomplexů na jedné straně – pak prohnutí raménka (poloměr prohybu R) závisí na tloušťce raménka d , Youngově modulu pružnosti E jeho materiálu (křemík, oxid křemičitý, nitrid křemíku) a Poissonovu poměru ν :

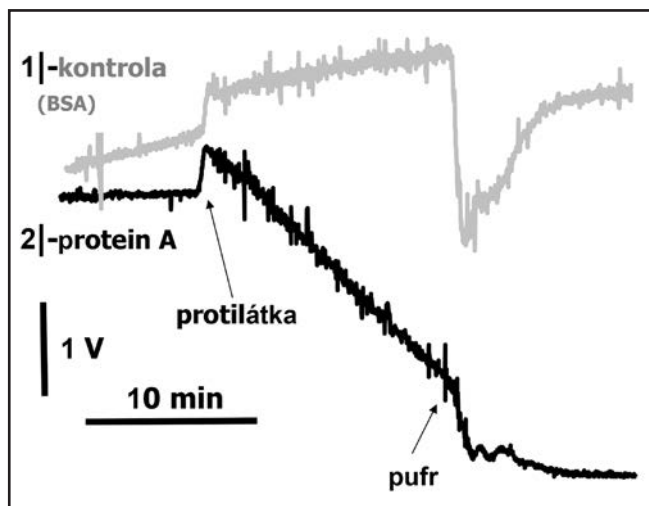
$$\frac{1}{R} = 6 \left(\frac{1-\nu}{Ed^2} \right) \Delta(\sigma_1 - \sigma_2)$$

Pro představu, při saturaci imobilizovaného antigenu navázáním odpovídající protilátky (IgG) bylo na konci prohnutí kolem 100 nm (raménko délky $L = 190 \mu\text{m}$, $d = 600 \text{ nm}$, materiál Si_3N_4)¹. Výchylku raménka na jeho konci Δz lze přibližně vyjádřit jako:

$$\Delta z = 3L^2 \left(\frac{1-\nu}{Ed^2} \right) \Delta(\sigma_1 - \sigma_2)$$

Citlivost se tedy zlepšuje s poměrem délky raménka k jeho tloušťce L/d a obecně jsou vhodnější měkčí varianty materiálu raménka (nízká hodnota konstanty tuhosti K)⁵. Vyhodnocování je opět možné opticky, alternativní jsou raménka obsahující piezoelektricky aktivní vrstvu a nebo se sledují kapacitní změny; to je technicky jednodušší, i když částečně na úkor citlivosti. Při optickém sledování výchylky raménka se v čase sleduje přímo rozdílový signál z dvousegmentové fotodiody (Obr. 1); na Obr. 3 je pro ilustraci porovnán průběh vazby protilátky na specifickém (imobilizovaný protein A) a kontrolním (modifikace albuminem) raménku.

Jiným způsobem je využití raménka jako rezonátoru (obdobu ladičky)⁶. Po rozkmitání raménko osciluje s charakteristickou rezonanční frekvencí f_0 (typicky 30 až 200 kHz), ta se sníží na f_1 po zatížení navázáním



Obr. 3: Příklad záznamu z diferenciálního měření – rozdíl signálů z obou segmentů fotodiody (uspořádání dle Obr. 2). Je znázorněna odezva na IgG protilátku na raménku s proteinem A (černě) a kontrolním raménku s albuminem (šedě), čip s raménky v průtočné cele. U kontrolního měření vazba protilátky nenastává, je ale patrný stálý drift raménka.

biomolekul – princip je obdobný piezoelektrických křemenným mikrováškám⁷. Změna hmotnosti Δm také závisí na konstantě pružnosti K daného raménka, citlivost roste s tuhostí použitého materiálu:

$$\Delta m = \frac{K}{4\pi} \left(\frac{1}{f_1} - \frac{1}{f_0} \right)$$

Bohužel v kapalině jsou oscilace raménka tlumeny a mimo povrchovou hmotnost se uplatní také viskoelastické změny v těsném okolí a na povrchu a také hustota okolního prostředí.

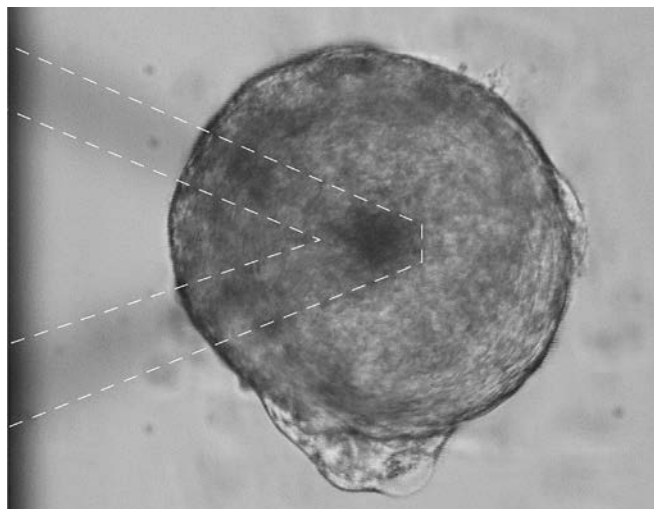
Nanomechanický převodník tedy umožňuje přímé sledování bioafinitních interakcí v reálném čase a bez potřeby značení². Pro bioanalytické využití je podstatnou výhodou možnost miniaturizace celého systému a současné stanovení mnoha analytů ve vzorku⁸. Přes tyto nesporné perspektivy jsme mikroraménka kolem roku 2005 jako převodníky opustili a soustředili se pouze na využití AFM pro zobrazování a studium biomolekul a buněk. Pro uživatele z biochemického prostředí nebyly dostupné dostatečně robustní a v kapalném prostředí spolehlivě fungující komerční mikroraménkové systémy; tato situace se zlepšuje až v poslední době.

Spojení s biomechanickými systémy

Fungování živých systémů je podmíněno nejen strukturní komplementaritou při vzniku afinitních komplexů, ale v současnosti se ukazuje také důležitost dynamiky proteinů a dalších biologických komponent, konformační změny, realizace rotačních a lineárních pohybů od jednotlivých biomolekul až po buněčnou úroveň⁹. Zde se tedy opět nabízí možnost spojení s nanomechanickými převodníky¹⁰. S pokrokem v oblasti AFM instrumentace a adaptací měřicích systémů pro čistě biologické problémy jsme se nedávno pokusili využít mikroraménko ke studiu buněčných kultur. Byly zvoleny kardiomyocyty, které vykonávají tepavé pohyby a jsou téměř ideálním buněčným modelem¹¹, často studova-

ným jak z hlediska topografického, tak biomechanického mapování¹². Unikátní komplexní pohled na jejich chování je možný v kombinaci s paralelním sledováním elektrické aktivity pomocí nosiče s mikroelektrodovým polem¹³.

V těchto studiích funguje raménko jako převodník a jako kontrolní a záznamový systém se zatím využívá standardní AFM sestava. Zcela unikátní možností je zde přímé a jednoduché sledování síly stahů tepajících kardiomyocytů, což je pomocí jiných technik velmi obtížně realizovatelné. Ukazuje se, že to je důležitá charakteristika pro kardiomyocyty odvozené z pluripotentních kmenových buněk získaných od pacientů postižených kardiomyopatickými a dystrofickými poruchami^{14,15}.



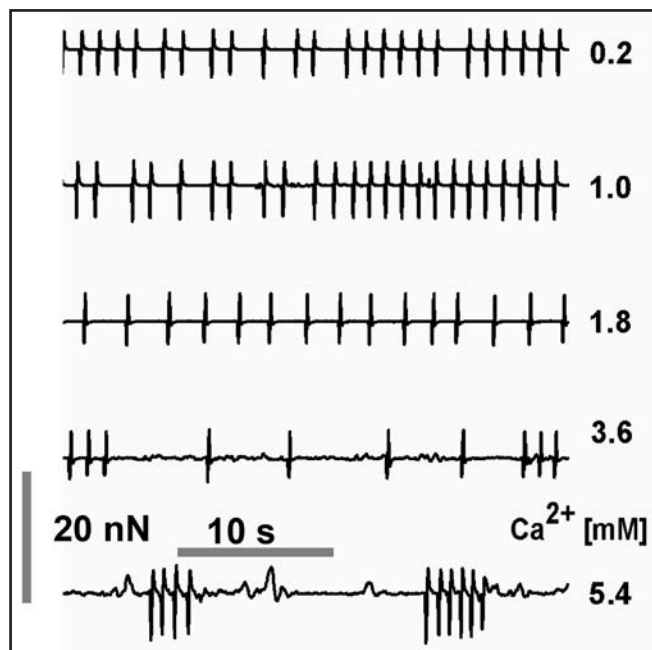
Obr. 4: Mikrofotografie raménka (triangulární varianta, obrys zdůrazněn přerušovanou čarou) po jeho umístění na shluk buněk kardiomyocytů (tzv. „embryonic body“ odvozené z pluripotentních lidských kmenových buněk).

Při vlastním použití se mikroraménko pomocí AFM skenovacího systému nechá nasadit nad jednotlivou buňku nebo klastrem buněk (Obr. 4), nastaví se požadovaný přítlak, který pak zpětná vazba AFM systému automaticky udržuje. Poté se vypne horizontální skenovací část a sledují se pouze vertikální výchylky raménka, na které působí tepající buňky. Výsledný záznam – mechanokardiogram – zaznamenává změnu síly působící na raménko v čase; jednoduše lze samozřejmě vyhodnotit i tepovou frekvenci (Obr. 5), viz také video na webu¹⁶.

Takto se získá buněčný biosensor na bázi kardiomyocytů¹⁷, umožňující v reálném čase studium efektů regulačních látek, existujících nebo nově vyvíjených léčiv či testování kardiotoxicity. Z hlediska robustnosti a funkčnosti zařízení jako biosensoru se ukázalo klíčovým neměřit s jednotlivými buňkami rozprostřenými na nosném povrchu (2D vrstva), ale použít shluk (klastr)

Literatura

- Goeders KM, Colton JS, Bottomley LA: *Chem. Rev.* 108, 522 (2008).
- Steffens C, Leite CL, Bueno CC, Manzoli A, De Paula Herrmann PS: *Sensors* 12, 8278 (2012).
- Raiteri R, Nelles G, Butt HJ, Knoll W, Skládal P: *Sens. Actuators B* 61, 213 (1999).



Obr. 5: Mechanokardiogram – časový záznam síly, kterou působí tepající shluk kardiomyocytů (dle Obr. 4) na mikroraménko. Ukázka vlivu koncentrace vápenatých iontů v měřicím médiu na chování kardiomyocytů. Pro vyšší nefyziologické koncentrace Ca^{2+} je dobře patrné zpomalení stahů a nástup chaotického chování typického pro arytmie.

mnoha set buněk (3D objekt). Kontakt s raménkem je mnohem méně rušivý, protože ovlivní jen pár blízkých buněk, experimenty lze typicky realizovat celý den i v zcela sterilním prostředí AFM zařízení. Je nutné udržování kultivační teploty a vlhkosti, výměna kultivačního média za čerstvé pak umožní provést i více experimentů s jedním klastrem buněk.

Závěr

Mikroraménko jako miniaturní mechanický převodník dokáže v reálném čase a bez nutnosti značení sledovat afinitní interakce na svém povrchu. Díky malým rozměrům, produkci pomocí standardních technologií z mikroelektroniky je možné na jednom měřicím čipu integrovat několik nezávislých převodníků a tak zefektivnit bioanalytické stanovení. Přes řadu demonstračních prací však tato technologie do praxe zatím nepronikla. Velmi nadějně je ale spojení raménka s biologickými rekogničními systémy, které samy o sobě vykonávají pohyb, ať už na molekulární či buněčné úrovni. Skoro ideálně se chovala kombinace raménka a srdečních buněk – kardiomyocytů, u kterých frekvence a síla tepání umožňuje jak lepší charakterizaci onemocnění pacientů poskytujících použité buňky, provádění různých fyziologických studií, tak testování řady látek používaných pro léčbu srdečních onemocnění.

- Lavrik NV, Sepaniak MJ, Datskos PG: *Rev. Sci. Instruments* 75, 2229 (2004).
- Ziegler C: *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 946 (2004).
- Raiteri R, Grattarola M, Butt HJ, Skládal P: *Sens. Actuators B* 79, 115 (2001).
- Skládal P: *Trends Anal. Chem.* 79, 127 (2016).

Literatura (pokračování)

8. Dahlin AB: *Sensors* 3, 3018 (2012).
9. Ji HF, Gao HY, Buchapudi KR, Yang X, Xu XH, Schulte, MK: *Analyst* 133, 434 (2008).
10. Tamayo J, Kosaka PM, Ruz JJ, San Paulo A, Calleja M: *Chem. Soc. Rev.* 42, 1287 (2013).
11. Domke J, Parak WJ, George M, Gaub HE, Radmacher M: *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 28, 179 (1999).
12. Zhu J, Sabharwal T, Kalyanasundaram A, Guo LH, Wang GD: *J. Biomechanics* 42, 2143 (2009).
13. Cogollo JFS, Tedesco M, Martinoia S, Raiteri R: *Biomed. Microdev.* 13, 613 (2011).
14. Liu JW, Sun N, Bruce MA, Wu JC, Butte MJ: *PLOS ONE* 7, e37559 (2012).
15. Pesl M, Acimovic I, Pribyl J, Hezova R, Vilotic A, Fauconnier J, Vrbsky J, Kruzliak P, Skladal P, Kara T, Rotrekl V, Lacampagne A, Dvorak P, Meli AC: *Heart Vessels* 29, 834 (2015).
16. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566316305036>
17. Pesl M, Pribyl J, Acimovic I, Vilotic A, Jelinkova S, Salykin A, Lacampagne A, Dvorak P, Meli AC, Skladal P, Rotrekl V: *Biosens. Bioelectron.* 85, 751 (2016).

Souhrn

Skládal P., Příbyl J., Pešl M., Rotrekl V.: Nanomechanické biosensory

Mikroraménka, používaná jako flexibilní nosič hrotu u AFM skenovacích technik, jsou představena jako nanomechanický převodník vhodný pro konstrukci biosensorů. Pro afinitní reakce se využívá ohyb raménka v důsledku změny povrchového napětí po vazbě komplementárních biomolekul na jedné straně nesoucí ligand; postup je demonstrován na vazbě protilátky na protein A. Jinou možností je přímé kontaktní snímání pohybu biologických systémů. Tento přístup byl velmi efektivní ve spojení s tepajícími kardiomyocyty pro vývoj buněčného biosensoru vhodného pro testování látek ovlivňujících srdeční činnost.

Klíčová slova: Mikromechanický biosensor, Afinitní interakce, Kardiomyocyty, Mikroskopie atomárních sil

Summary

Skládal P., Příbyl J., Pešl M., Rotrekl V.: Nanomechanical biosensors

Microcantilevers, used as flexible support for the scanning tip in AFM techniques, are introduced as nanomechanical transducer suitable for construction of biosensors. For affinity interactions, the deflection of the cantilever due to the change of surface stress following the binding of complementary biomolecules on one side with immobilised ligand; this approach is demonstrated on the interaction of antibody with protein A. An alternative application is the direct contact monitoring of mechanically active biological systems. This method was quite effectively linked with beating cardiomyocytes in order to develop cellular biosensor suitable for testing of drugs modifying heart activity.

Keywords: Micromechanical biosensor, Affinity interaction, Cardiomyocytes, Atomic force microscopy

ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA CHITOSANU

Martina Paldrychová, Lucía Gharwalová

Ústav Biotechnologie, VŠCHT v Praze; paldrycm@vscht.cz

Úvod

Tendence mikroorganismů adherovat k biotickým či abiotickým povrchům a vytvářet na nich strukturované a vysoce organizované společenství – biofilmy, je spojena se změnou fenotypu jednotlivých buněk, jejich zvýšenou virulencí a rezistencí k antibiotikům¹. Z tohoto důvodu je v současné době značné množství pozornosti věnováno nástrojům, které mohou specificky ovlivnit tvorbu biofilmu, jeho stabilitu, či strukturu.

Výzkum zaměřený na použití přírodních látek zaujímá v této problematice jednu z předních příček². Přírodní látky mohou ovlivňovat tvorbu biofilmu ve všech jeho fázích a mohou interagovat také se zralým biofilmem. Jsou schopné měnit fyzikálně-chemické vlastnosti životního prostředí (např. povrchové napětí), zasahovat do struktur obalových vrstev podílejících se na adhezi nebo modulat tvorbu biofilmu na úrovni regulačních mechanismů³.

Živočišná říše není tak bohatá na syntézu přírodních produktů s anti-biofilmovou aktivitou, jako je tomu u mikroorganismů a rostlin. Přesto takové sloučeniny nalezneme, např. solenopsin A, alkaloid z mravence *Solenopsis invicta* narušuje tvorbu biofilmu *P. aeruginosa*⁴. Živočišným produktem je i med z kaštanovníku, který má schopnost degradovat N-acyl-homoserinové

laktony (signální molekuly gram-negativních bakterií) a je zodpovědný za inhibici tvorby biofilmu u *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica* a *Aeromonas hydrophyla*⁵.

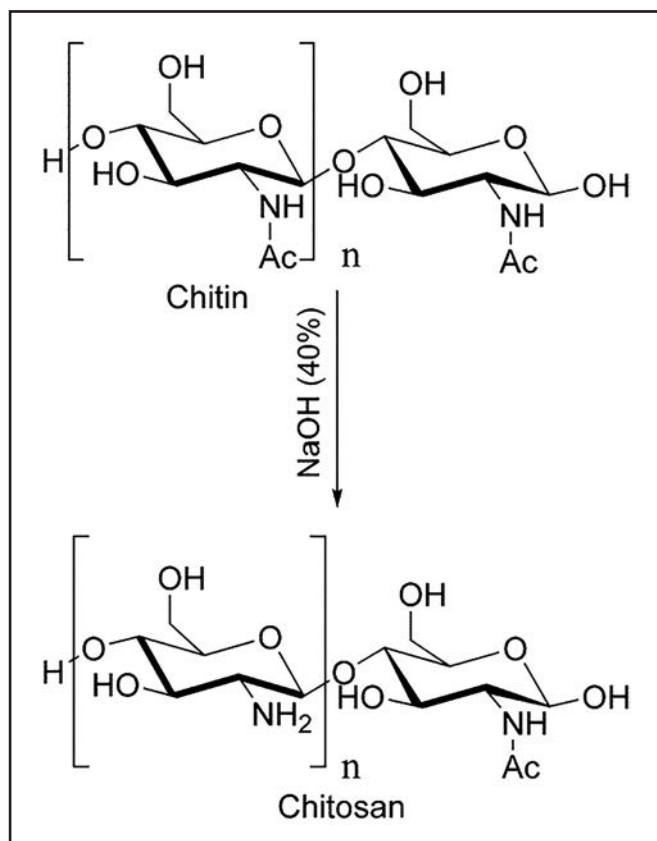
Farmaceuticky velice zajímavým přírodním biopolymerem je chitosan, pro objasnění jeho anti-biofilmové aktivity bylo doposud publikováno jen velice omezené množství studií⁶.

Chitosan

Chitosan ((1→4)-2-amino-deoxy-β-D-glukan) je polykationtový polymer se specifickou strukturou a vlastnostmi. Obsahuje více než 5000 glukosaminových jednotek a komerčně se získává alkalickou deacetylací chitinu (Obr. 1), obsaženého ve schránkách koryšů⁷. Deacetylace je vždy uskutečněna jen do určitého stupně (typický stupeň acetylce je menší než 0,35) a ve výsledku se tedy jedná o kopolymer složený z glukosaminu a N-acetylglukosaminu⁸.

Chitin, druhý nejrozšířenější polysacharid hned po celulóze, je strukturální biopolymer, který má obdobnou funkci jako kolagen u vyšších živočichů a celulóza u suchozemských rostlin. Buněčné stěny a septa ascomycetních, zygomycetních, basidiomycetních a deuteromycetních hub také obsahují chitin udržující tvar buněk

a jejich integritu. Nedávné pokroky v oblasti fermentačních technologií naznačují, že kultivace některých plísní např. *Aspergillus niger*, mohou poskytnout alternativní zdroje chitinu, respektive chitosanu¹⁰.



Obr. 1: Příprava chitosanu z chitinu⁹

Chitosan je nerozpustný ve většině rozpouštědel, ale je rozpustný ve zředěných organických kyselinách (např. kyselině mravenčí, octové, jantarové, mléčné nebo jablečné). Použití chitosanu je omezeno právě kvůli jeho nerozpustnosti ve vodě, vysoké viskozitě a tendenci ke srážení s proteiny při vysokém pH, proto je nyní značné úsilí věnováno přípravě jeho funkčních derivátů chemickou modifikací⁹.

Vyznačuje se jak vynikajícími biologickými vlastnostmi, tak svou netoxičností, biokompatibilitou a biodegradací, možností cíleného podávání léčiva (aplikace jako biodegradabilního nosiče léčiva), protinádorovými účinky a podporou absorpce vápníku a železa. Jsou mu přisuzovány také hypocholesterolemické a hypolipidemické účinky¹¹. Kvůli jeho schopnosti odvádět tuky ze zažívacího traktu ještě před jejich zpracováním jsou mu přisuzovány redukční účinky, které dosud nebyly vědecky prokázány¹².

Chitosan může podstoupit mnoho reakcí, jako je esterifikace, etherifikace, zesíťování, kopolymerizace apod. Přítomné aminoskupiny podléhají chemickým reakcím jako je acetylace, kvarternizace, reakce s aldehydy a ketony, alkylace, štěpení, chelatace kovů a poskytují celou řadu produktů⁸. Tyto deriváty chitosanu a enzymatické produkty mají díky rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem různou bioaktivitu a žádný z nich nevykazuje všechny výše uvedené biologické vlastnosti současně¹¹.

Farmaceutické aplikace chitosanu

Chitosan se ve farmaceutickém průmyslu využívá nebo využíval jako prostředek pro přímo lisované tablety, dezintegrační činidlo, pojivo, granulační prostředek nebo nosič léčiv s retardovaným uvolňováním.

Vzhledem k tomu, že má schopnost vytvářet filmy byl navržen také jako biopolymer pro výrobu kontaktních čoček sloužících jako bandáž oka po chirurgických zákrocích¹³. Membrány vyrobené z chitosan-poly(ethylen oxidu) mají vhodnou propustnost a vysokou pevnost v tahu, proto se nabízí možnost jejich využití při hemodialýze¹⁴. U chitosanu byly mimo jiné prokázány též mukoadhezivní vlastnosti v důsledku molekulární přitažlivé síly vzniklé elektrostatickou interakcí mezi pozitivně nabitou molekulou chitosanu a negativně nabitými slizničními povrchy¹³.

Antimikrobiální aktivita chitosanu

Antibakteriální aktivitu chitosanu poprvé popsali v roce 1979 Allan a Hadwinger¹⁵. Závisí na molekulové hmotnosti a rozpouštědle, a je nepřímo ovlivněna pH, antibakteriální účinky chitosanu se projeví především v kyselém prostředí z důvodů jeho špatné rozpustnosti nad pH 6,5¹¹. Vzhledem k tomu, že molekula chitosanu je pozitivně nabitá disponuje vyšší antimikrobiální aktivitou než chitin.

Mechanismus antimikrobiálního působení doposud nebyl podrobněji popsán, ale předpokládá se, že pozitivně nabitý chitosan interaguje s buněčnými membránami, což vede k jejich narušení a úniku intracelulárních složek z buňky. Chitosan také působí jako chelatační činidlo, které selektivně váže stopové množství kovů (např. Zn, Cu, Co, Mn, Ni, Cd, Pb, Cr) a inhibuje tak produkci toxinů (např. aflatoxinů) a mikrobiální růst¹⁶, aktivuje obranné procesy v hostitelské tkáni, váže vodu a interferuje se syntézou mRNA a proteinů⁹.

Chitosan vykazuje vyšší antibakteriální aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), než proti bakteriím gram-negativním (*P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) v 0,1 % koncentraci. Minimální inhibiční koncentrace zjištěné na různých pracovištích se liší v závislosti na použité metodě, typu chitosanu nebo pH¹¹. Nicméně Zheng a Zhu (2003) studiem antimikrobiálních účinků chitosanů o různých molekulových hmotnostech zjistili, že chitosany s nižší molekulovou hmotností (<300 kDa) jsou více účinné při aplikaci na *S. aureus*, zatímco jejich antimikrobiální účinek na *E. coli* je oslaben. *E. coli* je totiž schopna nízkomolekulární chitosan využít¹⁷.

Chitosan je výjimečný širokým spektrem svého působení, jelikož vykazuje antimikrobiální aktivitu nejen proti bakteriím ale také proti plísním a kvasinkám.

Antibiofilmová aktivita chitosanu

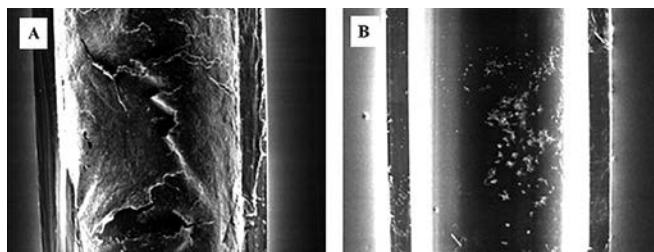
Ve studii Martineze a kol. (2010)¹⁸ bylo prokázáno, že aplikace chitosanu na biofilm *Cryptococcus neoformans* významně snižuje metabolickou aktivitu buněk a zabraňuje jejich adhezi k polystyrenovému povrchu. Mechanismus účinku chitosanu může u této kvasinky spočívat v efektivním rozkladu melaninu, barviva kte-

rým se kvasinky brání vůči působení širokého spektra antimikrobiálních látek. Aplikací chitosanu se tedy buňky stanou k těmto látkám více citlivé.

Ve studii Silva-Dias a kol. (2014)⁶ bylo po aplikaci chitosanu, prokázáno snížení metabolické aktivity předem připraveného biofilmu *Candida* spp. až o 90 %. SMIC (minimální inhibiční koncentrace přisedlých buněk) úzce koreluje s citlivostí planktonních buněk, což naznačuje identický mechanismus působení. Je možné, že kladně nabitá chitosanová částice interagují s negativně nabitými buněčnými membránami kvasinek. Snížení buněčného metabolismu kvasinek poté v konečném důsledku vede k buněčné smrti.

Citlivost kvasinek rodu *Candida* k chitosanu je v přímé korelaci s jejich povrchovým nábojem. Kupříkladu *C. albicans* a *C. glabrata* vykazují menší citlivost k chitosanu vzhledem ke sníženému výskytu negativních nábojů na buněčném povrchu. Tuto teorii potvrzují obrazy biofilmu ošetřených chitosanem pořízené rastrovací elektronovou mikroskopií: kvasinky mají vrásčitý povrch zhroucený směrem dovnitř oproti hladkému povrchu pozorovanému u kontrolních kvasinek⁶.

Druhá teorie možného mechanismu ovlivnění biofilmu chitosanem zahrnuje jeho pronikání do jádra kvasinky, jeho vazbu na DNA a inhibici syntézy RNA se zjevnými následky na buněčný metabolismus a rozpad biofilmu. Předpoklad zachycení chitosanu v matrici biofilmu vedoucího k zpomalení penetrace, může vysvětlit rozdíly mezi SMIC, nicméně koncentrace 1000 mg/l nízkomolekulárního chitosanu výrazně snižuje přilnavost *C. albicans* a *C. parapsilosis* k polystyrenovému povrchu a narušuje biofilm⁶.



Obr. 2: Biofilm *C. parapsilosis* zobrazený rastrovací elektronovou mikroskopií – povrch katétru 7. den po implantaci *in vivo*. Snímek (A) zobrazuje katétr hustě pokrytý biofilmem před expozicí chitosanem, snímek (B) zobrazuje katétr exponovaný nízkomolekulárním chitosanem, kde se na povrchu katétru nevytvořil souvislý strukturovaný biofilm⁶.

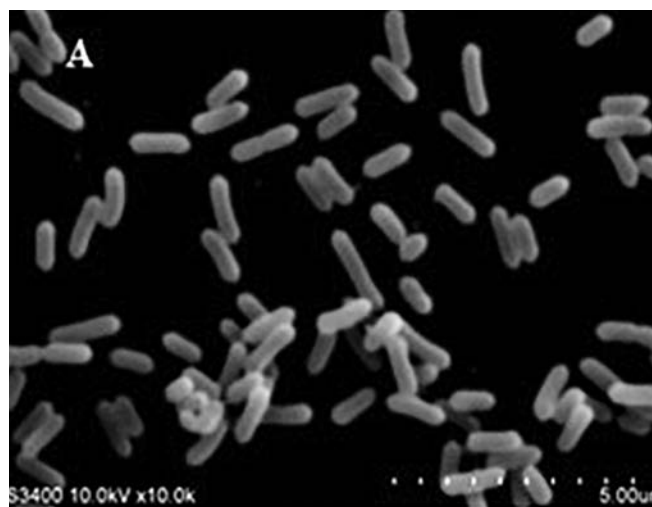
Nízkomolekulární chitosan je vážným kandidátem pro biomateriálové aplikace. Vrstvy chitosanového biopolymeru na lékařských zařízeních, která jsou dlouhodobě zavedena do těla pacienta (katétr apod.) napomáhají zabránění nástupu nejen mykotické infekce⁶.

Literatura

1. Watnick P, Kolter R: *J. Bacteriol.* 182, 2675 (2000).
2. Řezanka T, Masák J, Čejkova A: *Stud. Nat. Prod. Chem.* 38, 269 (2012).
3. Richards JJ, Melander C: *Chem. Bio. Chem.* 10, 2287 (2009).

Mu a kol. (2014) ve své studii demonstrovali použití chitosanu v kombinaci s aminoglykosidovým antibiotikem amikacinem při inhibici biofilmu *Listeria monocytogenes* a dalších druhů rodu *Listeria*^{19a}. Jak již bylo řečeno, antibiofilmový účinek chitosanu do značné míry závisí na stupni deacetylce a molekulové hmotnosti.

Mu a kol. (2014) sledovali také vliv molekulové hmotnosti chitosanu na míru antibiofilmové aktivity v kombinaci s gentamicinem. Biofilmy *L. monocytogenes* byly vystaveny působení chitosanu o molekulové hmotnosti 3000, 13000 a 18000 Da. Všechny tři směsi chitosan-gentamicin účinně snížily obsah vytvořené biomasy biofilmu bakterie, přičemž směs obsahující chitosan s molekulovou hmotností 13000 byla nejúčinnější. Fyzikálně-chemické vlastnosti tohoto chitosanu umožňují lepší průnik gentamicinu do biofilmu *L. monocytogenes*^{19b}.



Obr. 3: Bakterie *Listeria monocytogenes* zobrazená rastrovací elektronovou mikroskopií²⁰.

Závěr

Chitosan a jeho deriváty mají silné antimikrobiální a antibiofilmové účinky a skýtají tak možnost využití nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale také v oblasti biomedicíny a potravinářském průmyslu. Chitosan je výjimečný nejen širokým spektrem svého působení, ale také komplexním mechanismem účinku, z nichž nejzásadnější dílčí mechanismus spočívá ve schopnosti penetrace do biofilmů potenciálně patogenních mikroorganismů, jejich narušení a zpřístupnění působení dalších antimikrobiálních látek.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysok školský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2016) a GAČR grantu 14-23597S.

4. Park J., Kaufmann G. F., Bowen J., et al.: *J. Infect., DiS.* 198, 1198-1201 (2008).
5. Truchado P, Gil-Izquierdo A, Tomas-Barberan F, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 11186 (2009).

Literatura (pokračování)

6. Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda IM, et al.: *Med. Microbiol. Immunol.* 203, 25 (2014).
7. Han L, Kimura Y, Okuda H: *Int. J. Obes.* 23 (1999).
8. Pillai C, Paul W, Sharma CP: *Prog. Polym. Sci.* 34, 641 (2009).
9. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, et al.: *Bio-macromolecules* 4, 1457 (2003).
10. Pochanavanich P, Suntornsuk W: *Lett. Appl. Micro-biol.* 35, 17 (2002).
11. Xia W, Liu P, Zhang J, et al.: *Food Hydrocolloids*, 25, 170-179 (2011).
12. Vavříková E., Vinšová J.: *Chem. listy* 103, 56-65 (2009).
13. Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., et al.: *Int. J. Pharm.* 274, 1-33 (2004).
14. Amiji M. M.: *Biomaterials* 16, 593-599 (1995).
15. Allan CR, Hadwiger LA: *Exp. Mycol.* 3, 285 (1979).
16. Cuero RG, Osuji G, Washington A: *Biotechnol. Lett.* 13, 441 (1991).
17. Zheng L-Y, Zhu J-F: *Carbohydr. Polym.* 54, 527 (2003).
18. Martinez LR, Mihu MR, Han G, et al.: *Biomaterials* 31, 669 (2010).
- 19a. Mu H, Zhang A, Zhang L: *Food Control.* 38, 215 (2014).
- 19 b. Mu H, Guo F, Niu H, et al.: *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 22296 (2014).
20. Chen X, Zhang X, Meng R, et al.: *Food Control* 66, 100 (2016).

Souhrn

Paldrychová M., Gharwalová L.: Antibiofilmová aktivita chitosanu

V současnosti se značná část výzkumu věnuje nástrojům specificky ovlivňujícím tvorbu biofilmu, zejména poté aplikaci přírodních látek. Živočišná říše není nikterak bohatá na přírodní produkty s anti-biofilmovou aktivitou, přesto takové látky nalezneme. Přírodní biopolymer chitosanu disponuje řadou zajímavých vlastností, mezi které patří také antimikrobiální a antibiofilmová aktivita. Mechanismus účinku chitosanu spočívá v jeho interakci s negativně nabitými buněčnými membránami, schopností jeho penetrace do mikrobiálních biofilmů a jejich zpřístupnění působení jiným látkám s antimikrobiální aktivitou, proto se nabízí také možnost jeho kombinace s antibiotiky.

Klíčová slova: chitosan, chitin, antimikrobiální aktivita, antibiofilmová aktivita

Summary

Paldrychová M., Gharwalová L.: Antibiofilm activity of chitosan

Currently, a considerable part of research is devoted to tools which specifically influence biofilm formation, in particular the application of natural substances. Animal kingdom is not too rich in natural products with anti-biofilm activity, but such substances can be found. Natural biopolymer chitosan has a variety of interesting properties, which include also antimicrobial and anti-biofilm activity. Chitosan mechanism of action is represented by interaction with negatively charged cell membranes, ability of penetration into microbial biofilms and make them available to action of other substances with antimicrobial activity. Therefore the possible combination of chitosan with antibiotics is also offered.

Keywords: chitosan, chitin, antimicrobial activity, anti-biofilm activity

BIOTECHNOLOGICKÉ ASPEKTY SVĚTLEM INICIOVANÉHO SÍŤOVÁNÍ – PIXL (Z ANGL. PHOTO-INDUCED CROSS-LINKING): NOVÉ ALTERNATIVNÍ TECHNIKY PRO STUDIUM 3D STRUKTURY PROTEINŮ ČI VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ

Miroslav Šulc, Renata Ptáčková

Mikrobiologický ústav AVČR, v. v. i.; msulc@biomed.cas.cz

Úvod

V každém organismu hrají proteiny mnoho důležitých a nezastupitelných rolí (např. katalýza, buněčná signalizace, uskladnění a transport živin, imunita, buněčný skelet). Funkce těchto biologických makromolekul vždy úzce koresponduje s jejich prostorovou (3D) strukturou, která je mimo jiné určena sekvencí polypeptidového řetězce tvořeného z 20 standardních proteino-genických aminokyselin a v jistých organismech rozšířena o několik dalších (např. pyrolysin, selenocystein či selenomethionin)¹. Translační aparát každého organismu zabudovává při proteosyntéze jednotlivé aminokyseliny do řetězce proteinu podle předem daného pořadí a nascentní protein může být dalším post-translačním

procesem upravován či modifikován, nebo potřebuje pro tvorbu své 3D nativní a funkční struktury pomocný aparát. Pro řadu proteinů je pro vznik nativní strukturu postačující primární sekvence, a proto s pomocí běžných molekulárně genetických metod a bakteriálních expresních systémů lze získat DNA templát a následně rekombinantní protein o požadované aminokyselinové sekvenci.

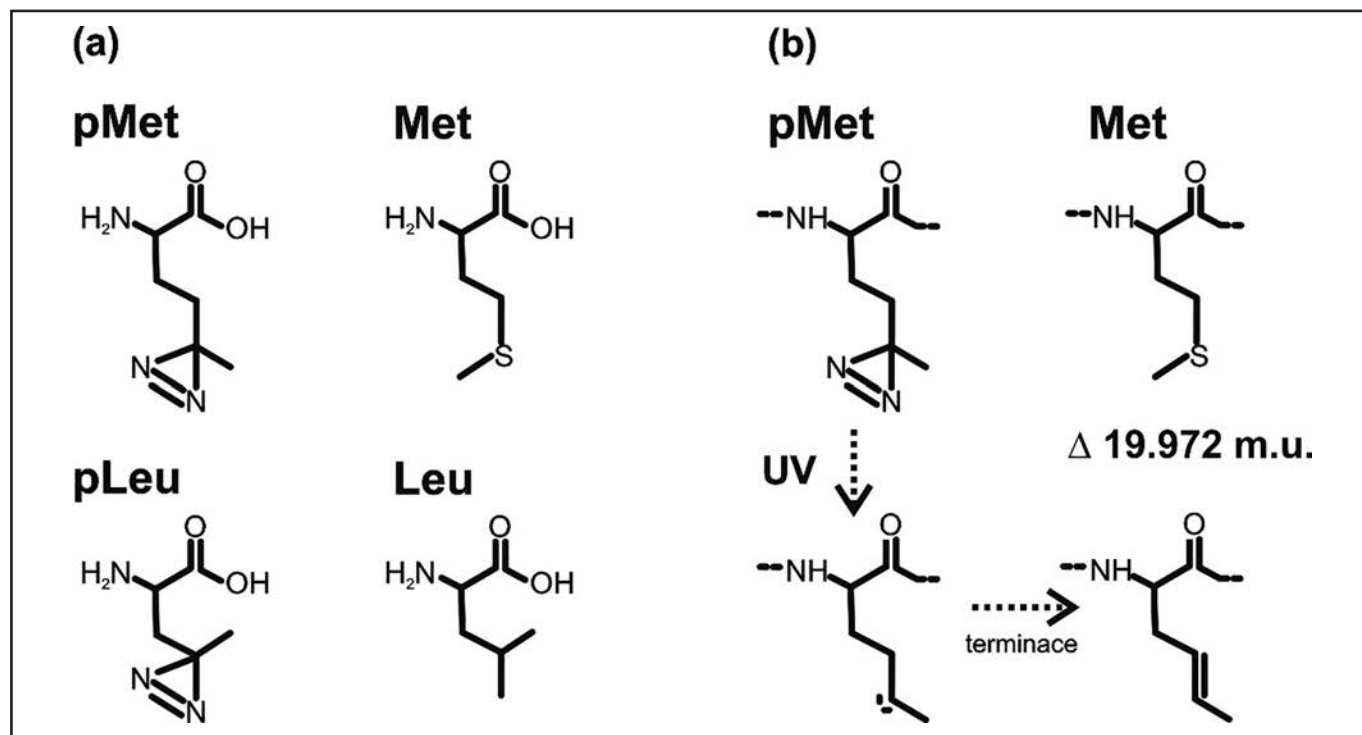
Pro studium 3D struktury proteinu pomocí alternativních metodik, např. chemických síťovacích technik, nabízí 20 standardních aminokyselin ve svých postranních řetězcích pouze omezený počet chemicky kompatibilních/aktivních skupin/možností, které jsou navíc omezeny reakčními podmínkami (pH kompatibilní

s aktivním proteinem) použitých síťovacích technik, které jsou často inkompatibilní s fyziologickými podmínkami a stavem studovaného proteinu. Díky inkorporaci strukturních analogů aminokyselin do sekvence rekombinantních proteinů je nejen možné rozšířit spektrum postranních řetězců a jejich počet ve studovaném proteinu, ale návrh a tvorba arteficiálních proteinů přináší nové možnosti a vlastnosti těmto proteinům (např. zvýšení stability, proteolytické odolnosti, modifikace enzymové/katalytické aktivity, efektivní regulaci, vnesení biologicky aktivních skupin, stabilizační funkce, vnesení nových proteolytických míst, nebo možnosti světlem iniciovaných reakcí). Mezi posledně zmíněné techniky studia 3D proteinové struktury a strukturně-funkčních stavů s využitím vnesení strukturních analogů aminokyselin do proteinové sekvence patří např. světlem iniciované síťování – PIXL (z angl. Photo-Induced Cross-Linking) nebo FRET (z angl. Fluorescence Resonance Energy Transfer)^{2,3,4}. Zmíněná metodika PIXL je v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) experimentální technika schopná určení vzájemné orientace proteinových komplexů v nativním stavu v dostatečně krátkém čase a s relativně nízkým množstvím proteinů. Cílem techniky je příprava studovaného proteinu s inkorporovaným strukturním analogem aminokyselin, který po indukci UV-světlem tvoří reaktivní intermedii schopný tvorby nové kovalentní vazby s interakčním proteinem (kvantita tvořených kovalentních komplexů statisticky odpovídá přítomnosti daných transienčních interakcí v reakční směsi). Po separaci komplexů od monomerů (např. SDS-PAGE elektroforesou) a proteolýze síťovaných komplexů (např. trypsinem) analyzuje-

me směs peptidů pomocí LC-MS s vysokým rozlišením (umožňuje identifikaci unikátní kombinace dvou síťovaných peptidů vyhovujících reakčnímu mechanismu síťovacího činidla a specifitě použité proteasy). Identifikaci dvou aminokyselinových postranních řetězců v kontaktu u nalezených dvou síťovaných peptidů je provedena následnou fragmentační MS/MS analýzou (sekvenční informace).

Funkce aminoacyl-tRNA-synthetas v procesu proteosyntesy

Molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je nositelkou genetické informace transkribované do informační ribonukleové kyseliny (mRNA), která dále slouží jako templát pro syntézu proteinů v translačním aparátu. Přesnost sekvence rostoucího peptidového řetězce je zaručena a kontrolována pomocí dvou procesů: (i) esterifikace aminokyseliny při její aktivaci (dvoustupňový proces přes aminoacyladenylát) a následná vazba na odpovídající molekulu transferové ribonukleové kyseliny (tRNA) za vzniku aminoacyl-tRNA katalyzovaná odpovídající aminoacyl-tRNA-synthetasou (aatRS)⁵, (ii) párování tripletů kodonů mezi mRNA a komplementárními antikodony příslušných molekul aminoacyl-tRNA za katalýzy ribosomálních komplexů (v případě stop kodonu interakce s terminačním faktorem)⁶. První krok je klíčovým bodem inkorporace analogů (nepřirozených) aminokyselin do sekvence proteinu. Pro každou proteinogenní aminokyselinu existuje ve většině buněk jedinečná aatRS. Všechny tyto aatRS můžeme rozdělit do dvou jasně oddělených strukturních skupin: (a) Skupina I – aminoacyluje 2'-OH skupinu koncové-



Obr. 1: Chemické struktury aminokyselin (a): methioninu (Met), leucinu (Leu) a jejich strukturních analogů pMet a pLeu s diarizinovou skupinou. Mechanismus fotoaktivace UV světlem pMet a následná tvorba vysoce reaktivního karbéniového biradikálu schopného tvořit novou kovalentní vazbu nebo terminační produkt, který poskytuje v MS spektru m/z signál o 19.972 m.u. nižší hodnoty než vlastní aminokyselina Met (b).

ho adenosin nukleotidu na 2'-OH konci korespondující tRNA, (b) Skupina II – aminoacyluje korespondující 3'-OH skupinu⁷. Tyto aatRS obsahují: (i) vysoce selektivní vazebné místo pro daný postranní řetězec, a (ii) větší povrchovou strukturu zprostředkovávající unikátní kontakt a interakci se souborem analogických tRNA kodujících dané residuum (díky degeneraci genetického kodu je většina aminokyselin kodována více jak jedním kodonem)⁸. Chybovost dané reakce je pouze 1:10000. Některé aatRS (např. L-Ile:tRNA^{Ile}-ligasa (AMP-tvořící) mají kromě vlastní katalytické aktivity také kontrolní schopnost s možností editace a odstranění tRNA v případě chybné acylace (např. menší aminokyselinový postranní řetězec valinu je schopen vazby do aktivního centra a způsobovat vysokou chybovost 1:150, a proto druhé přítomné aktivní centrum s hydrolytickou aktivitou je menší bez schopnosti vázat správně vázaný izoleucin, ale schopné vázat a odštěpovat chybně vázaný valin a menší zbytky a tak provádět korekci případné špatné acylace tRNA. Tímto postupem je zajištěno snížení míry chybovosti až k hodnotě 1:3000⁹. Některé aatRS (např. methionin-tRS) mají více relaxované vazebné místo pro aminokyseliny, což umožňuje vazbu strukturně podobných analogů aminokyseliny na korespondující tRNA¹⁰. V našich experimentech jsme využívali dva fotoreaktivní analogy aminokyselin – foto-methionin (pMet, L-2-amino-5,5-azi-hexanová kyselina, Pierce Biotechnology, USA) a foto-leucine (pLeu, L-2-amino-4,4-azi-pentanová kyselina) (Obr. 1a) – poprvé syntetizované a použité pro studii interaktomu v savcích buňkách¹¹.

Postupy inkorporace analogů aminokyselin do proteinové sekvence

Dosud byly vyvinuty dva hlavní přístupy inkorporace analogů aminokyselin do proteinové sekvence s využitím *in vivo* translačního systému buněčných systémů: (i) s využitím promiskuity translačního systému a přidělení analogu kodujícímu tripletu jedné ze standardních aminokyselin (např. Met, Pro, Tyr, Phe, Leu, Val)¹² externě poskytovanému analogu aminokyseliny, který částečně nahrazuje přirozenou aminokyselinu v proteinové sekvenci a je jí dostatečně strukturně podobný¹³, (ii) využití extra kodonu pro pyrrolisin (výskyt u rodu *Methanosarcina*), a inkorporace analogu do sekvence proteinu přes orthogonální aatRS a korespondující tRNA jenž je komplementární k terminačnímu kodonu (UAG)¹⁴. Pro první přístup je možné použít běžný expresní kmen *E. coli*¹⁵, ale inhibice (přídavkem specifických aminokyselin) nebo inaktivace (použitím auxotrofního kmene s deficiencí) biosyntetické dráhy inkorporované aminokyseliny výrazně snižují aktuální koncentrace přirozené aminokyseliny v buňce a zvyšují inkorporaci strukturního analogu této aminokyseliny² (obecně přirozené aminokyseliny mají řádově vyšší afinitu k přirozeným aatRS). Proto se rekombinantní exprese provádějí v limitním minerálním mediu (LM) doplněným strukturním analogem. Díky tomu dochází k pomalejšímu růstu a nižšímu výtěžku exprimovaného proteinu (cca 10-100 mg/L), naproti tomu je vyšší míra inkorporace strukturního analogu aminokyseliny^{2,16}.

Další nespornou výhodou kromě vyššího výtěžku oproti využití extrakodonu pro pyrrolisin je jednoduchost, kterou lze operativně přenést do exprese ve větším měřítku s vyšší mírou inkorporace, kterou lze dosáhnout úpravou protokolu, složení limitního media či strukturního analogu aminokyseliny^{17,18}.

Strukturní biologie – využití metody PIXL (z angl. Photo-Induced Cross-Linking)

Jak již bylo řečeno, v minulosti byly syntetizovány strukturní analogy dvou přirozených aminokyselin, methioninu a leucinu, s přítomnou diazirinovou skupinou v postranním řetězci (pMet a pLeu), která UV světlem (350 nm, cca minuty) indukovanou aktivací poskytuje reaktivní intermediáty s krátkým poločasem (vysoce reaktivní karbénové biradikály) a schopností síťovacích reakcí v blízkém okolí (tvorba nové kovalentní vazby do vzdálenosti cca 5Å) nebo v krátkém čase tvořící terminační produkt (Obr. 1 b). Tyto analogy byly použity pro komplexní kvalitativní studii řady protein-proteinových interakcí v savcích buňkách¹¹. Naproti tomu v naší laboratoři byla tato metodika adaptována pro rekombinantní expresi v prokaryontním systému *E. coli* a použita pro strukturní *in vitro* studii protein-proteinových interakcí savčích proteinů. Expresí proteinových nanosond, které ve své proteinové sekvenci měly inkorporován strukturní analog aminokyseliny (pMet nebo pLeu) umožnilo tvorbu kovalentních protein-proteinových komplexů metodikou PIXL a po rozdělení dle molekulové hmotnosti (např. SDS-PAGE elektroforesou) hmotností spektrometrie (MS) bylo schopná po proteolytickém štěpení odpovídajícího kovalentního proteinového komplexu identifikovat místa tvorby nové kovalentní vazby pMet v interakčním rozhraní (interagující peptidy či přímo aminokyselinové zbytky). Tímto způsobem byla úspěšně řešena nejen interakce v lipidické membráně mezi cytochromem b₅ a cytochromem P-450 2B4, ale i homodimerického solubilního regulačního proteinu 14-3-3^{18,19}.

Biotechnologické aspekty PIXL s využitím strukturních analogů aminokyselin

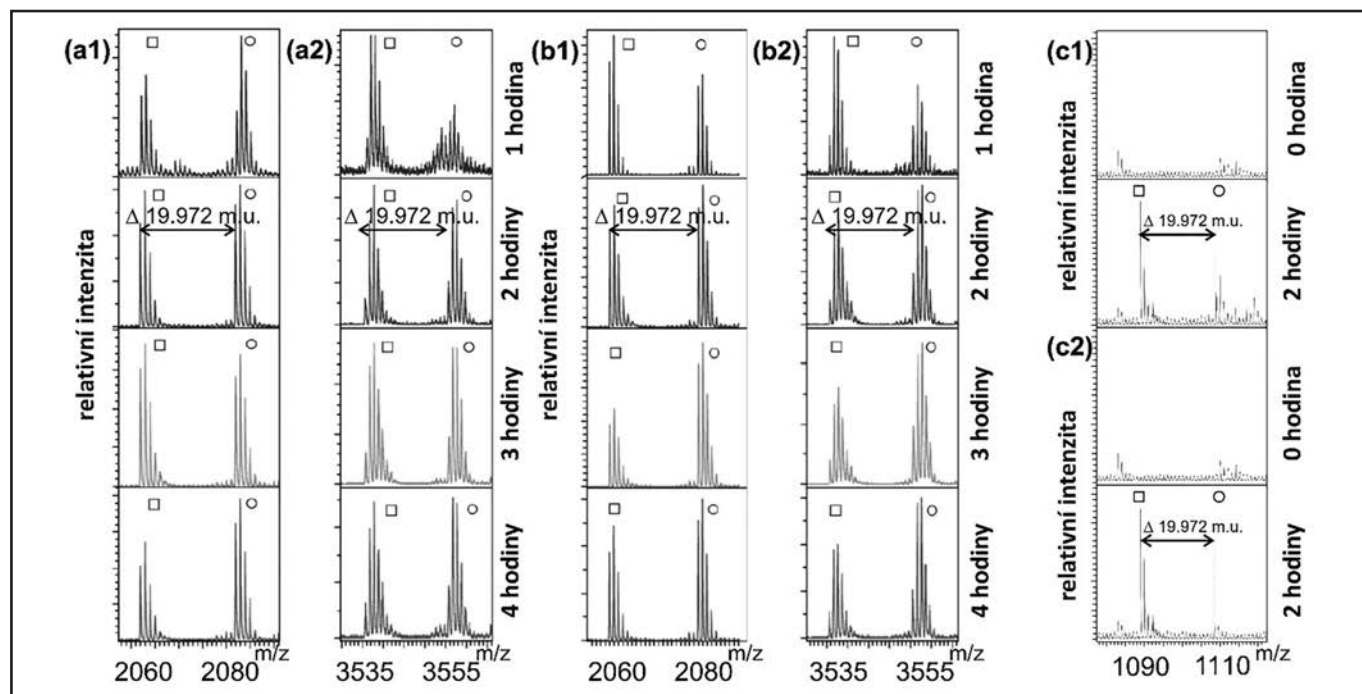
Pokusme se srovnat několik dosud studovaných systémů inkorporace pMet z biotechnologického pohledu: využití expresního systému (*E. coli* BL-21 (DE3) GOLD, auxotrofní kmeny), zvolených podmínek exprese (LM medium, LM medium s přídavkem aminokyselin *E. coli*) a použitého strukturního analogu aminokyseliny (pMet či pLeu). Jako míru úspěšnosti můžeme zvolit poměr inkorporace strukturního analogu ku vlastní aminokyselině, který lze s úspěchem detekovat po proteolytickém štěpení na úrovni peptidů pomocí MALDI-TOF MS analýzy (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) jak ilustruje schéma mechanismu fotoaktivace diazirinových analogů aminokyselin, která s úspěchem probíhá kvantitativně pomocí použitého laseru (N₂ laser o vlnové délce 337 nm) v iontovém zdroji MS za vzniku terminačního produktu (indukce světlem probíhá ve vysokém vakuu iontového zdroje MALDI). Míra inkorporace je pak určena jako poměr ploch pod píky *m/z* v MS spektru korespondujících

peptidů (s Met či terminační produkt s pMet), jejichž hodnota m/z se liší o 19.972 m.u. (z angl. mass unite).

V prvním systému, cytochrom P-450 2B4:cytochrom b_5 (studovaném v minulosti klasickým přístupem chemického síťování)²⁰, byl připraven cytochrom b_5 s částečně inkorporovaným pMet. Tento cytochrom b_5 obsahuje čtyři Met residua v pozicích 1, 96, 126 a 131, kdy právě residua methioninu ve dvou posledně zmíněných pozicích se nacházejí v transmembránové doméně a tak poskytují jedinečnou možnost studia interakce v lipidickém prostředí, které je pro běžně užívaná síťovací činidla nepřístupná a případná protein-proteinová interakce tedy „neviditelná“. Heterologní expresi v *E. coli* BL-21 (DE3) Gold použitím plasmidu pET22b s počátečním růstem v LB mediu při 37 °C do $A_{600} \sim 0,6$. Po důkladném promytí buněk a následném přenosu do LM media s přidavkem pMet (finální koncentrace 0,5 – 2,0 mM) a přidavkem kyseliny 5-aminolevulové (0,5 mM) před iniciací exprese proteinu induktorem isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (1 mM) nebylo po dobu 4 hodin dosaženo více jak 10 – 20 % inkorporace pMet. Pokud je do LM media přidáno šest aminokyselin, které jsou schopny inhibovat biosyntetickou dráhu Met (Leu, Ile, Val, Thr, Lys, Phe) výsledek MALDI-TOF měření inkorporace pMet překvapivě značně vzroste (po 1 hodině exprese je přibližně 70 %) a pak s časem postupně klesá k hodnotě 30 – 40 % po 4 hodinách exprese jak ilustruje obrázek časového průběhu MALDI-TOF MS dvou monitorovaných peptidů (Obr. 2a a 2 b). Pokles míry inkorporace indikuje růst celulární hladiny endogenního Met schopného soutěžit s pMet o aktivní místo L-Met:tRNA^{Met}

ligasy (AMP-tvořící) a průběh tohoto poklesu časově koresponduje s časem aktivace biosyntetických drah (cca 1,5 hodiny), které jsou „suprimovány“ v nutričně bohatém mediu²¹. Přičemž je míra inkorporace strukturního analogu úměrná jeho koncentraci v LM mediu (Obr. 2a odpovídá koncentraci pMet 0,5 mM a Obr. 2 b koncentraci 2,0 mM).

Druhým studovaným systémem byl lidský regulační protein 14-3-3 ζ , který vytváří homodimerický komplex studovaný řadou přístupů v minulosti²². Při rekombinantní expresi tohoto proteinu, který obsahuje 7 methioninových a 24 leucinových residuí ve své proteinové sekvenci, bylo srovnáno použití strukturních analogů pMet a pLeu, a také použité expresní systémy: *E. coli* BL-21 (DE3) Gold a dvou auxotrofních kmenů *E. coli* B834 Δ met a *E. coli* K-12 Δ leu. Téměř 60 % inkorporace pMet bylo dosaženo v LM mediu s přidavkem šesti aminokyselin (Leu, Ile, Val, Thr, Lys, Phe) po dvouhodinové expresi, obdobně jako v případě cytochromu b_5 . Naproti tomu použití auxotrofního kmene zajistilo téměř kompletní inkorporaci pMet (Obr. 2c). Zdálnivě překvapivé výsledky byly získány při produkci 14-3-3 ζ proteinu s inkorporací pLeu v analogických podmínkách (produkční organismus auxotrofní kmen *E. coli* K-12 Δ leu). Byly získány velice nízké výtěžky exprimovaného rekombinantního proteinu a hodnota inkorporace pLeu nedosahovala ani v jednom případě více jak 5 %²³. Tento výsledek může souviset pravděpodobně s katalytickou podobností L-Leu:tRNA^{Leu} ligasy (AMP-tvořící) a popsáním chování L-Ile:tRNA^{Ile}-ligasy (AMP-tvořící), kde kromě katalytického místa existuje i druhé aktivní místo s hydrolytickou opravňovací aktivitou,



Obr. 2: Hmotnostní spektrum chymotryptických peptidů cytochromu b_5 , znázorňující závislost poměru intenzit peptidů obsahujících pMet/Met na době exprese proteinu 1-4 hodiny, při koncentraci pMet v mediu 0.5 mM (a) a 2.0 mM (b). Signály peptidů Ser⁹³-Trp¹¹⁰ (a1,b1) o hodnotě m/z 2081.9854 a Ile⁸⁰-Trp¹¹⁰ (a2,b2) o hodnotě m/z 3555.7794 cytochromu b_5 , obsahující pMet nebo Met odpovídají zobrazeným signálům m/z a jejich rozdíl hodnot je 19.972 m.u. (□ – peptid obsahující pMet a ○ – peptid obsahující Met). Hmotnostní spektra tryptického peptidu Glu¹⁵⁹-Arg¹⁶⁷ proteinu 14-3-3 ζ o hodnotě m/z 1108.5568 (□ – peptidy obsahující pMet a ○ – peptidy obsahující Met) před indukci (0 hodina) a po 2 hodinách exprese proteinu a jejich závislost na použitém produkčním kmenu v LM mediu: *E. coli* BL-21 (DE3) Gold (c1) a auxotrofního kmene *E. coli* B834 Δ met (c2).

kteřá může být zodpovědná za nízkou míru inkorporace a tedy odlišným chováním a katalytickými schopnostmi než methionyl-tRS⁹.

Závěr

Presentované výsledky inkorporace strukturních analogů do proteinové sekvence během rekombinantní exprese v prokaryontním systému *E. coli* reprezentují příklad úspěšné aplikace biotechnologického postupu, který je schopný poskytnout optimální nástroj pro studium proteinové struktury nebo protein-proteinových interakcí pomocí metodiky PIXL. Tato unikátní a řádově rychlejší metodika je skvělou alternativou klasickému chemickému síťování, protože není determinována reakčním mechanismem a velikostí použitého síťovacího činidla, reakčními podmínkami síťovací reakce, reakce může probíhat i v prostředí lipidické membrány v krátkém čase a v případě žádné interakce reaktivní intermediát rychle terminuje na stabilní produkt.

Literatura

1. Creighton TH: Proteins: structures and molecular properties. San Francisco: W. H. Freeman 1993.
2. Ječmen T, Ptáčková R, Černá V, et al.: *Methods*. 89, 28 (2015).
3. Dougherty DA: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 645 (2000).
4. Voloshchuk N, Montclare JK: *Mol. Biosyst.* 6, 65 (2010).
5. Berg P, Bergmann FH, Ofengand EJ, et al.: *J. Biol. Chem.* 236, 1726 (1961).
6. Crick FH, Barnett L, Brenner S, et al.: *Nature*. 192(4809), 1227 (1961).
7. Eriani G, Delarue M, Poch O, et al.: *Nature*. 47, 203 (1990).
8. Nureki O, Vassilyev DG, Tateno M, et al.: *Science*. 280(5363), 578 (1998).
9. Silvan LF, Wang J, Steitz TA: *Science*. 285(5430), 1074 (1999).
10. Deniziak MA, Barciszewski J.: *Acta Biochim. Pol.* 48(2), 337 (2001).
11. Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C: *Nat. Methods*. 2(4), 261 (2005).
12. Hendrickson TL, de Crécy-Lagard V, Schimmel P: *Annu. Rev. Biochem.* 73, 147 (2004).

Souhrn

Šulc M., Ptáčková R. : Biotechnologické aspekty UV-světlem iniciovaného síťování – PIXL (z angl. Photo-Induced Cross-Linking): nové alternativní techniky pro studium 3D struktury proteinů či vzájemných interakcí

Studium proteinů a zvláště jejich 3D struktury či protein-proteinových interakcí hraje v dnešním biochemickém výzkumu nezanedbatelnou roli. Řada alternativních metod tohoto výzkumu (např. PIXL, FRET) využívá biotechnologické postupy pro zavedení nepřírodních aminokyselin či jejich strukturních analogů do proteinové sekvence během jejich rekombinantní přípravy. Předkládaná práce uvádí několik biotechnologických přístupů inkorporace foto-methioninu (pMet, L-2-amino-5,5-azi-hexanová kyselina) do sekvence dvou modelových savčích proteinů.

Klíčová slova: světlem iniciované síťování, foto-methionin, diaziriny

Summary

Šulc M., Ptáčková R. : Biotechnological aspects UV-light induced cross-linking – PIXL (Photo-Induced Cross-Linking): novel alternative technique to study 3D protein structure or their mutual interactions

The study of proteins and especially their 3D structure or protein-protein interactions plays significant role in contemporary biochemical research. Many alternative methods of the research (e.g. PIXL, FRET) employing different biotechnology techniques to introduce the non-natural amino acids or their structural analogues within protein sequence during its recombinant expression. This study presents several biotechnology approaches to introduce photo-methionine (pMet, L-2-amino-5,5-azi-hexanoic acid) into the sequence of two model mammalian proteins.

Keywords: Photo-Induced Cross-Linking, photo-methionine, diazirines

Naše výsledky ukazují, že oba testované strukturní analogy se v míře inkorporace do proteinu značně liší (pMet >> pLeu). Současně použitím různých podmínek a expresních systémů lze úspěšně dosáhnout různé míry inkorporace pMet do proteinové struktury (auxotrofních kmenů *E. coli* B834 Δmet v LM mediu > *E. coli* BL-21 (DE3) Gold s přítomnými aa (Leu, Ile, Val, Thr, Lys, Phe) v LM mediu > *E. coli* BL-21 (DE3) Gold v LM mediu). Nicméně pro detailní pochopení všech regulačních mechanismů a další biotechnologické využití bude potřeba ještě dané systémy dále studovat a testovat, tak abychom byli schopni využít potenciál vnesení nejen jednoho strukturního analogu aminokyseliny (pMet) do proteinové sekvence během rekombinantní exprese.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory poskytovatele (MŠMT) v rámci projektu LO1509.

13. Cowie DB, Cohen GN: *Biochim. Biophys. Acta* 26, 252 (1957).
14. Srinivasan G, James CM, Krzycki JA: *Science*. 296(5572), 1459 (2002).
15. Koberova M, Ječmen T, Sulc M, et al.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 113 (2013).
16. Link AJ, Tirrell DA: *Methods*. 36(3), 291 (2005).
17. Wang A, Nairn NW, Marelli M, et al.: Protein Engineering with Non-Natural Amino Acids, in: Protein Engineering. InTech, Rijeka, Croatia 2012.
18. Ptáčková R, Ječmen T, Novák P, et al.: *Int. J. Mol. Sci.* 15(6), 9224 (2014).
19. Ječmen T, Ptáčková R, Kavan D, et al.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35(Suppl2), 114 (2014).
20. Šulc M, Ječmen T, Šnajdrová R, et al.: *Neuro Endocrinol Lett.* 33(Suppl3), 41 (2012).
21. Zaslaver A, Mayo AE, Rosenberg R: *Nat. Genet.* 36(5), 486 (2004).
22. Haladová K, Mrázek H, Ječmen T, et al.: *J. Struct. Biol.* 179, 10 (2012).
23. Mazurová M: Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity Praha 2015.

METABOLOMICKÉ MAPOVÁNÍ JAKO NÁSTROJ K POROZUMĚNÍ MOLEKULÁRNÍ PODSTATY ZÁVISLOSTI A KE ZJIŠTĚNÍ ADIKTOLOGICKÉHO POTENCIÁLU NOVÝCH SYNTETICKÝCH DROG

Libor Uttl^{a,b}, Kateřina Vondráková^{b,c}, Eliška Zlámalová^a, Grygoriy Tsenov^{b,d}, Petr Kačer^a

^aVysoká škola chemicko-technologická Praha, ^bNárodní ústav duševního zdraví, Klecany, ^cOddělení Vývojové epileptologie, Fyziologický ústav AVČR, v. v. i., ^dOddělení neurověd, biomedicíny a pohybových věd, Sekce Anatomie a Histologie, Lékařská fakulta, Univerzita ve Veroně, Verona; Petr.Kacer@vscht.cz

Úvod

Zpráva českého národního monitorovacího střediska pro drogy a závislost (NMS) pro rok 2014 ukazuje, že počet uživatelů drog je v rozmezí roku 2003 až 2014 stabilní¹. Nicméně užívání drog je spojeno s vážnými zdravotními a sociálními důsledky a často bývá spojeno s navazující trestnou činností. Jen přímé výdaje na protidrogovou politiku v České republice¹ činily v roce 2014 1,25 mld Kč. Alarmující je fakt, že tato problematika se netýká pouze aktivních uživatelů drog, ale v některých případech také dětí, které byly vystaveny drogám v prenatálním období.

V posledních letech také dochází na drogové scéně ke zvýšenému výskytu nových syntetických drog (NSD). Nárůst NSD je patrný od roku 2010 a vyšší míra zkušenosti s těmito látkami se objevuje především u účastníků tanečních "párty" a problémových uživatelů. NSD jsou látky, které napodobují účinky běžně užívaných drog, nicméně mají odlišnou chemickou strukturu. Jejich účinky mohou být velmi různé, nicméně velmi často se jedná o látky stimulační či halucinogenní, syntetické kanabinoidy, či látky se sedativním účinkem. Dle dostupných informací bylo v roce 2014 registrováno 22 různých NSD, z toho 13 látek se v ČR objevilo vůbec poprvé a v případě 2 látek šlo vůbec o první zachycení v zemích EU¹.

Významným problémem provázejícím nárůst výskytu NSD je nedostatečně známý účinek těchto látek, velmi malé povědomí o možných interakcích s dalšími látkami běžně užívanými společně s NSD (alkohol, marihuana, extáze a další), či zhodnocení jejich adiktivního potenciálu. Jako klíčová oblast pro rozvoj závislosti je popsán mezolimbický dopaminergní systém a to především *nucleus accumbens*², kdy v rámci odměny dochází ke zvýšení dopaminergní transmise (např. při sexuální aktivitě či při příjmu potravy). Jako příklad ovlivnění dopaminergní transmise a její vliv na chování lze uvést morfinem indukovaný nárůst dopaminu v *nucleus accumbens*³. Nicméně na systému odměn se mohou částečně podílet také jiné dráhy v CNS jako nigrostriální a mesokortikální⁴.

Z důvodů již dříve zmíněných tedy vyplývá, že je nutné pokračovat ve výzkumu s důrazem na využití citlivých metod, schopných měřit rychlé změny metabolitů v širším časovém horizontu zahrnujícím jak akutní fázi po podání drogy, tak i chronické změny po chronickém opakovaném užívání a případně i v průběhu rozvoje závislosti. Mimo jiné dlouhodobým cílem má být zdoko-

načení metodických přístupů a rozšíření poznatků s využitím animálních modelů drogové závislosti, což může výrazně přispět k pochopení účinku NSD na následné strukturální i funkční změny.

Experimentální část

Experimentální zvířata

Samice potkanů Wistar (AnLab, Praha; stáří 4 měsíce, váha 250-300 g) byly připuštěny na počátku estrogenního cyklu. Březi samice byly rozděleny do dvou skupin: MA exponované skupině byl po celou dobu gestace podáván MA (5 mg/kg/den); kontrolní skupině byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok. Z potomků samic obou skupin byli vybráni jen samci a v 90. den po narození byl započat mikrodialyzační experiment.

Veškeré manipulace se zvířaty byly prováděny podle směrnice Evropské unie (86/609/EU) a Národní komise pro chov laboratorních zvířat. Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí.

Mikrodialýza

Ve věku 90 dnů byli potkani uvedeni do celkové anestezie injekcí ketamin/xylazin (2 mg/kg; 0.5 mg/kg) a pomocí stereotaktického aparátu (o souřadnicích AP-1.6, ML $\pm$ 1.5, DV-7.3) jim byla chirurgicky implementována mikrodialyzační kanyla MAB 4.15 IC (Agn Tho's AB, Švédsko). Po 7 dnech, když se zahojila rána na hlavě, byli potkani uvedeni do halotanové anestezie a do kanyly byla zavedena mikrodialyzační sonda MAB 4. 15. 2.Cu s polopropustnou kuprofánovou membránou (délka membrány: 2 mm, propustnost membrány: látky do velikosti 6 kDa). Sonda nacházející se v NAc byla promývána umělé cirkulací tekutinou (ACSF) o průtoku 2 μ l/min. Vzorky byly odebrány v 20 minutových intervalech do mikrozkrumavek obsahujících 15 μ l 0,1 M HCl a 10 pg vnitřního standardu (deuterovaný standard – DA.HCl-d₄).

HPLC-ESI-MS/MS analýza

Odebrané vzorky byly primárně koncentrovány lyofilizací (Labconco Free Zone (USA)) po dobu 12 hodin při teplotě -47 °C a tlaku 9 kPa. Lyofilizovaný vzorek byl rozpuštěn v 10 μ l methanolu.

Pro HPLC separaci látek byla použita kolona Gemini C18 (zrnitost stacionární fáze 5 μ m, rozměry kolony 150 x 2 mm; Phenomenex USA) s předkolonkou Gemini C18 a gradientové složení mobilní fáze (fáze A – vodný roztok kyseliny octové o pH 2; fáze B – methanol) o průtoku 150 μ l/min. Gradient měl následující průběh:

Tabulka I: Parametry hmotnostně spektrometrické analýzy pro dopamin a jeho metabolity

Analyt	Ionizace	Kvadrupól Q1 <i>m/z</i> (Da)	Energie CID (eV)	Kvadrupól Q3 <i>m/z</i> (Da)
DA.HCl	ESI ⁺	137	24	120
DA.HCl- <i>d</i> ₄	ESI ⁺	141	24	123
3-MT.HCl	ESI ⁺	168	21	151
HVA	ESI ⁻	181	17	122
DOPAC	ESI ⁻	167	15	122

5 % B (3 min) → 30 % B (lineární nárůst během 2 min) → 30 % B (10 min) → 5 % B (lineární pokles během 1 min) → 5 % B (4 min). Objem vzorku nastříkovaný na kolonu byl 5 µl. Byla použita elektrosprejová ionizace v pozitivním (pro detekci DA a 3-MT) i negativním módu (pro detekci HVA a DOPAC). Analýza látek⁷ byla prováděna v SRM módu (Selective Reaction Monitoring). Kolizně indukované reakce (Tabulka 1) byly monitorovány na hmotnostním spektrometru TSQ Vantage. Podmínky hmotnostního spektrometru byly optimalizovány na následující parametry: tlak kolizního plynu (argon) 1 mTorr, napětí na sprejovací jehle ±3000 V, teplota nosného plynu (dusík – tlak 40 psi) 350 °C, tlak pomocného plynu (dusík) 20 arb, teplota vstupní kapiláry 350 °C.

Diskuze

Mikrodialýza je řadu let úspěšně používána v experimentálních studiích a také v klinické praxi pro monitorování chemických změn v CNS i na periférii⁵. Potenciál této metody byl v posledních letech výrazně posílen^{6,7} díky vysokoúčinné kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). V důsledku kombinace uvedené analytické metody s MD je v současné době možné monitorovat i velmi dynamické procesy v diskrétních oblastech mozku a navíc registrovat i minimální změny v koncentracích metabolitů.

Řadu let je MD používána pro mapování neurotransmiterů ve výzkumu závislosti^{8,9}. Velkou výhodou získání vzorků pomocí MD je možnost mapování těchto změn jak na anestezovaném zvířeti, tak i na volně pohyblivém^{5,9}. Několik experimentálních studií^{2,3,10} ukázalo, že v důsledku podání drogy dochází k markantním a velmi dynamickým změnám především v hladinách dopaminu a jeho metabolitů. Navíc tyto neurochemické změny byly asociované s výraznou změnou v chování experimentálních zvířat^{3,11}.

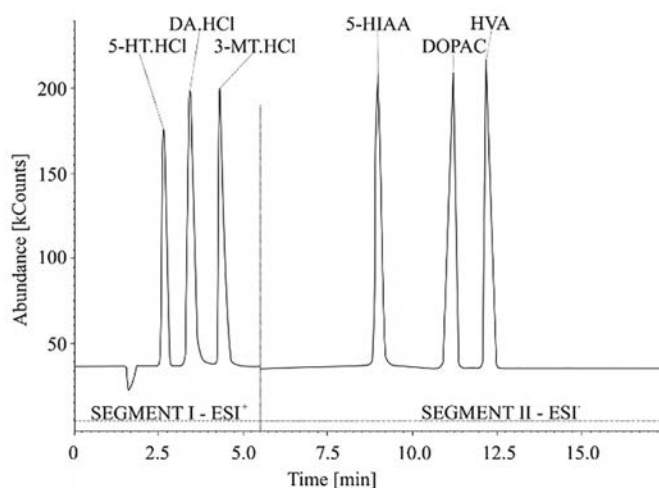
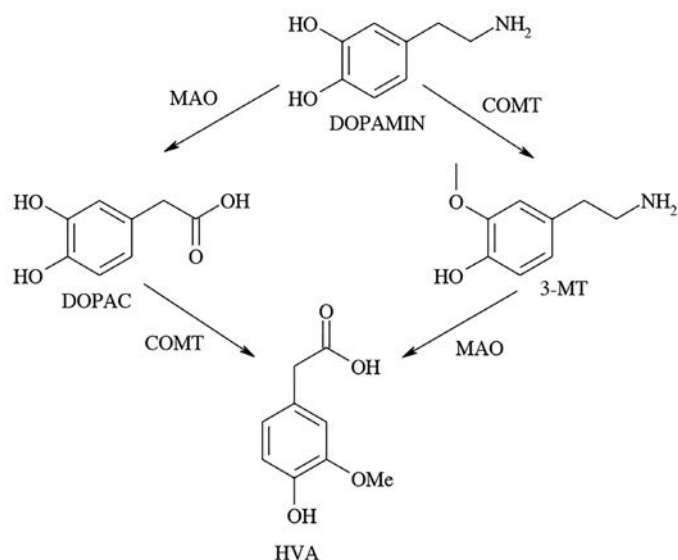
Nicméně slabou stránkou celé řady takových experimentálních prací je jejich zaměření často jen na neurotransmitery a jejich primární metabolity, zatímco metabolity samotných drog dost často zůstávají opomenuty. Toto zkresluje celkovou představu o účinku drog na neuronální metabolismus, a proto stále není k dispozici jasná představa, co stojí za dlouhodobými změnami funkcí toho či jiného neurotransmitterového systému^{4,10} a jak by měla vypadat případná terapie.

Další výzvou je možnost mapování změn spojených s perinatální expozicí drog. V předchozích letech byla vyvinuta přesná metodika na stanovení obsahu dopaminu a jeho metabolitů (dopamin, kyselina homovanilová, 3-methoxytyramin, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová) v mikrodialyzátu získaného z potkaního mozku¹². Zde se nám podařilo pozorovat koncentrační změny v čase až na úrovni pikogramů v mililitru mikrodialyzátu¹² s vysokou přesností. Potenciál vyvinutého analytického přístupu byl dále využit ve studii zabývající se vlivem prenatální expozice metamfetaminu (MA) u mláďat potkana (*in utero*) na hladinu dopaminu a jeho metabolitů v dospělosti přímo v *nucleus accumbens*¹³. Na základě našich poznatků metabolického mapování v nezralém mozku⁶ můžeme tvrdit, že perinatální expozice drog má přetrvávající vliv na dopaminergní neurotransmisi a zvýšenou citlivost v dospělosti^{11,13} (Obr. 1). Výsledky získané již zmiňovanou metodikou dále ukázaly změny v hladinách neurotransmiterů v *nucleus accumbens* u modelu deprese vyvolané čichovou bulbektomií u potkana¹⁴. Oproti kontrolní skupině zvířata po proděláním bulbektomie vykazovala nižší bazální hladiny dopaminu a serotoninu, nicméně MA indukoval silnější odpověď jak u dopaminu, tak i serotoninu¹⁴.

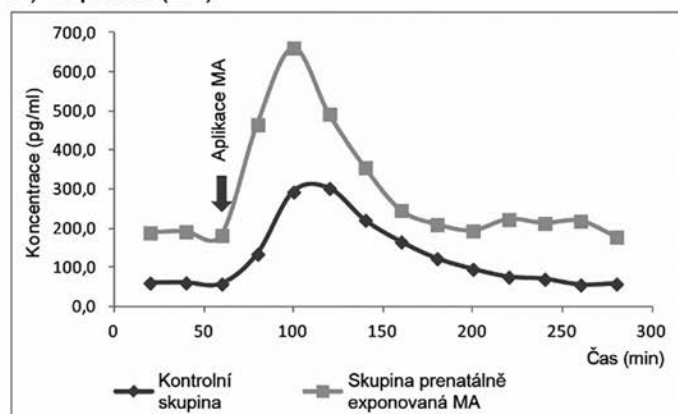
V rámci výzkumu NSD byla tato metodika použita pro vyhodnocení účinku 4-brom-2,5-dimethoxyphenethylaminu (2C-B) na dopaminergní systém v *nucleus accumbens* u potkana¹⁵. Podání 2C-B mělo za následek zvýšení koncentrace dopaminu a snížení 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny¹⁵, což ukazuje podobný trend jako u MA¹³. Z našeho pohledu by mapování metabolických změn v průběhu intoxikace mohlo vést k vytvoření srovnávací databáze metabolických odpovědí na podání vybraných referenčních drog v různých koncentracích. Tato databáze by tak mohla výrazně přispět k predikci účinků a adiktivního potenciálu NSD a tím urychlit odpověď na jejich výskyt.

Závěr

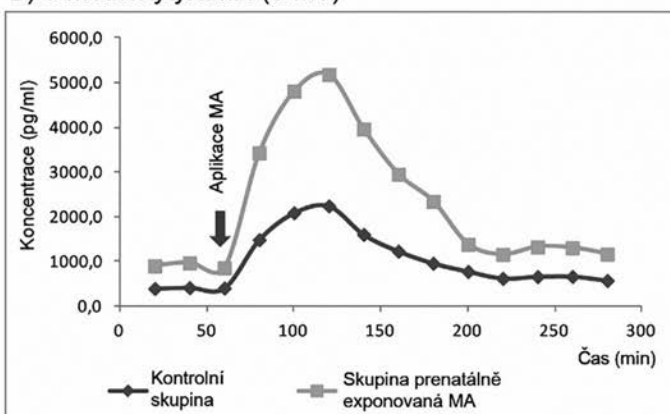
Možnost využití citlivé metody schopné měřit rychlé změny metabolitů a neurotransmiterů v různých cílových strukturách mozku v širším časovém období otvírá možnost získat velmi cenné poznatky ve výzkumu drog a závislosti. Kombinace MD a HPLC-MS tedy může pomoci velmi výrazně k objasnění biochemických změn probíhajících v tkáni v průběhu intoxikace, ale i v přípa-



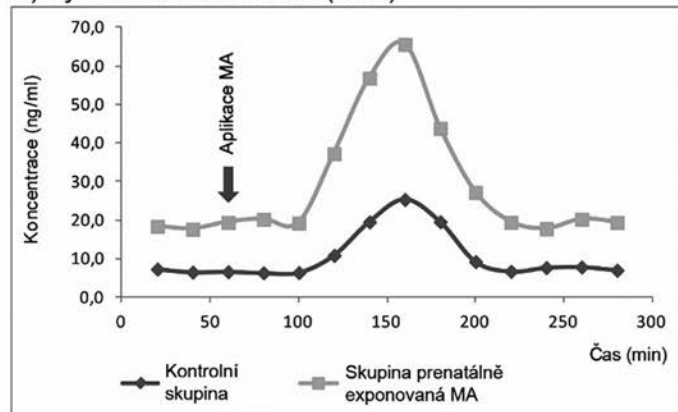
A) Dopamin (DA)



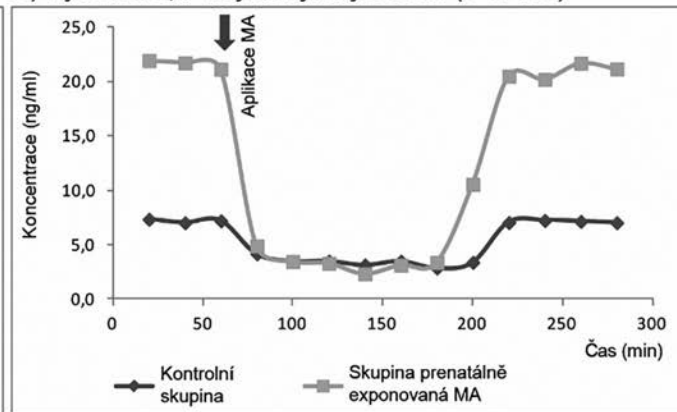
B) 3-methoxytyramin (3-MT)



C) Kyselina homovanilová (HVA)



D) Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC)



Obr. 1: Hormí část: Dopamin a jeho základní metabolity a jejich HPLC chromatogram. Spodní část: Průběh koncentrace DA a jeho metabolitů v průběhu experimentu po aplikaci MA. Koncentrace DA (A) a jeho metabolitů 3-MT (B), HVA (C) a DOPAC (D) v *NAC* před a po aplikaci akutní dávky metamfetaminu. Průměrné koncentrace naměřené u potkanů, kteří byli prenatalně exponováni MA, jsou vyznačené jako světlé čtverečky. Průměrné hodnoty pro kontrolní skupinu potkanů jsou v grafu značeny jako tmavé čtverečky.

dě rozvoje závislosti či v průběhu abstinčních příznaků. Předpokládáme tedy, že na základě metabolického mapování bude možno dostatečně predikovat účinky NSD a jejich adiktivní potenciál.

Základní zmapování změn metabolitů v průběhu rozvoje závislosti a v průběhu odvykací léčby může mít

i významný klinický potenciál při využití tzv. reverzní mikrodialýzy. Kdy pomocí mikrodialyzační sondy mohou být podávány velmi cíleně do konkrétních oblastí mozku průběžně léčiva. Z hlediska závislosti by se mohlo jednat o mikrodávky látek (např. dopaminu) s cílem postupně normalizovat metabolický profil bě-

hem odvykání či v dalších případech u dětí prenatálně vystavených MA.

Poděkování

Výzkum byl podpořen operačním programem „Praha-Konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/22197) a „Národní program udržitelnosti“ NPUI (LO1215)

Literatura:

1. Mravčík V, Běláčková V, Drápalová E, Zábranský T (Eds.): *Nové psychoaktivní látky v České republice: výskyt rizika a související opatření*. Praha, 2015.
2. Di Chiara G, Bassareo V: *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 69 (2007).
3. Sustkova-Fiserova M, Jerabek P, Havlickova T, et al.: *Psychopharmacol.* 231(14), 2899 (2014).
4. Wise RA: *Trends Neurosci.* 32, 517 (2009).
5. Westerink B, Cremers T (Eds.): *Handbook of microdialysis: Methods, Applications and Perspectives*. Academic Press, 2007.
6. Vondrakova K, Uttl L, Kubova H, et al.: *Chem. Lett.* (under review) (2016a).
7. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD: *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51 (2007).
8. Torregrossa MM, Kalivas PW: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90(2), 261 (2008).
9. Tung-Hu T (Ed): *Applications of Microdialysis in Pharmaceutical Science*. Wiley, 2011.
10. Darvesh AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, et al.: *Expert Opin. Drug Discov.* 6(2), 109 (2011).
11. Bubenikova-Valesova V, Kacer P, Syslova K, et al.: *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(6), 525 (2009).
12. Syslova K, Rambousek L, Kuzma M, et al.: *J. Chrom. A* 1218(21), 3382 (2011).
13. Zlamalova E, Syslova K, Kacer P: *Chem. Listy* 110, 935 (2016).
14. Ruda-Kucerova J, Amchova P, Havlickova T, et al.: *World J. Biol. Psych.* 16(7), 521 (2015).
15. Páleníček T, Fujáková M, Brunovský M, et al.: *Psychopharmacol.* 225(1), 75 (2012).

Souhrn

Uttl L., Vondráková K., Zlamalová E., Tsenov G., Kačer P.: Metabolomické mapování jako nástroj k porozumění molekulární podstaty závislosti a ke zjištění adiktologického potenciálu nových syntetických drog

Mikrodialýza (MD) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) je úspěšně využívána k metabolomickému mapování dynamických změn v mozku. Potřeba využití těchto metod vzrůstá s rozvojem nových syntetických drog (NSD), kdy je nutné na jejich výskyt velmi rychle reagovat a určit jejich případnou nebezpečnost a jejich adiktivní potenciál. Z uvedeného důvodu by tato metodika mohla v budoucnu sloužit jako prediktivní nástroj pro určení nebezpečnosti NSD na základě metabolických změn v průběhu intoxikace. Dovolujeme si odhadnout, že tato metoda má vysoký potenciál pro rozšíření znalostí nejen o účinku nových syntetických drog (NSD) a molekulární podstatě rozvoje závislosti, ale může také posloužit k vývoji nových léčebných postupů.

Klíčová slova: mikrodialýza, HPLC-MS, závislost, nové syntetické drogy, metabolomika

Summary

Uttl L., Vondrakova K., Zlamalova E., Tsenov G., Kacer P.: Perspectives in the metabolomic mapping of addiction potential of new synthetic drugs

In the past decades, the requirement for in vivo detection of diverse chemical substances has increased due to development of new synthetic drugs with an unknown impact on brain metabolism. Microdialysis in combination with high-performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS) is an efficient tool for monitoring dynamic biochemical changes in the brain. Hence, it could be used for dissecting the mechanism of action of newly appearing synthetic abusive drugs and processes involved in the development of drug addiction. Moreover, it can be optimized for diverse compounds and biological tissues and utilized, for example, for testing of novel therapeutical approaches.

Keywords: microdialysis, HPLC-MS, drug addiction, new synthetic drugs, metabolomic

PROLIN, VÝJIMEČNÁ AMINOKYSELINA ANEB, ZA CO VŠECHNO MŮŽE PROLIN V EUKARYOTICKÉ BUŇCE

Vladimíra Hajná^{1,2}, Jan Martinec², Zuzana Novotná¹

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ²Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.; hajna@ueb.cas.cz; vladimirahajna@gmail.com

Úvod

Prolin je jedinečná aminokyselina. Je jedinečná svojí strukturou a má velmi rozmanité funkce. Zajímavostí například je, že je nejvýznamnější aminokyselinou obsaženou v medu. Jeho obsah je důležitý pro určení vyzrállosti a pravosti medu. V posledních letech je

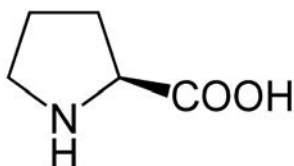
o výzkum metabolismu prolinu a jeho zapojení v oblasti výživy a metabolických poruch stále větší zájem. Nově získané informace ukazují, že se prolin zapojuje do celé řady biochemických a fyziologických procesů u živočichů i u rostlin. Tato výjimečná aminokyselina může například fungovat jako signální molekula

při stresu či jako osmoprotektant, který pomáhá rostlinám přežít období sucha. Může fungovat i jako senzor buněčného energetického stavu či zdroj pyrrolin-5-karboxylátu (P5C) účastnícího se redoxních reakcí u celé škály organismů^{1,2,3}. Různé role a zapojení této aminokyseliny v metabolismu vyšších organismů se čtenáři pokusíme nastínit v následujícím textu.

Prolin – neobvyklá aminokyselina

Jako první byla tato aminokyselina izolována v roce 1900 německým chemikem Richardem Willstätterem. Jako jedna z mála aminokyselin byl prolin izolován ještě před jeho objevením jako produkt hydrolýzy proteinů⁴.

Prolin, jehož systematický název je pyrrolidin-2-karboxylová kyselina, je kódovaná, neesenciální, hydrofobní aminokyselina s výjimečnou konformační stabilitou. Díky jeho struktuře jsou jeho vlastnosti v porovnání s ostatními aminokyselinami rozdílné. Prolin, jako jediná proteinogenní aminokyselina, nemá volnou primární aminoskupinu, ale obsahuje postranní řetězec v podobě cyklu (Obr. 1)⁵.

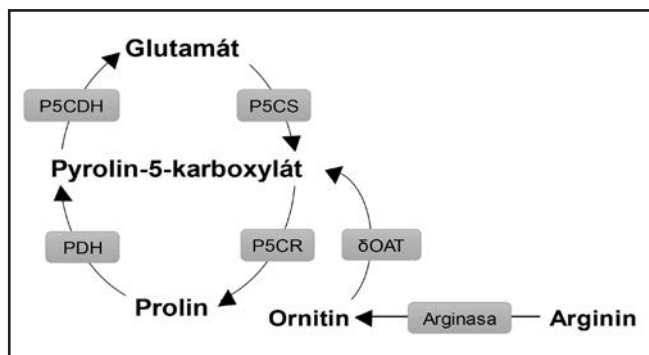


Obr. 1: Strukturální vzorec prolinu.

Díky své struktuře je přítomnost prolinu v bílkovinách neslučitelná s některými sekundárními strukturami. V α -helixu se nevyskytuje. Naopak tvoří specifické helixy vyskytující se v kolagenu a je častý v β -ohybech. Díky své iminoskupině je totiž prolin schopen tyto struktury stabilizovat v nevýhodné *cis* konfiguraci, která je pro tyto struktury nezbytná^{4,5}.

Metabolismus prolinu v eukaryotních buňkách

Prolin vzniká v organismech několika biosyntetickými drahami (Obr. 2). Jednou z výchozích látek je glutamát, jehož cyklizaci pomocí enzymu Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátsynthetasy (P5CS; EC 2.7.2.11/1.2.1.41) a následnou redukcí pyrrolin-5-karboxylátreduktasou (P5CR; EC 1.5.1.2) vzniká L-prolin. Alternativně vzniká prolin z ornitinu, popřípadě argininu. V tomto případě je arginin enzymem arginasou (EC 3.5.3.1) přeměňován na ornitin, který je následně konvertován na pyrrolin-5-karboxylátovou kyselinu za působení enzymu ornitin- δ -aminotransferasy (δ OAT; EC 2.6.1.13). Ta je poté redukována opět pomocí P5CR na prolin. Míra zastoupení jednotlivých syntetických drah se u různých organismů liší. U většiny savců jsou například dráhy využívající glutamát a arginin víceméně rovnocenné. Výjimkou jsou některé šelmy (kočky, fretky), které postrádají P5CS a mohou prolin syntetizovat pouze z argininu. Opakem jsou ptáci, kteří mají jen velmi malou aktivitu arginasy, a proto je u nich schopnost konvertovat arginin na prolin velmi malá. U vyšších rostlin se za primární metabolickou dráhu považuje dráha využívající jako substrát glutamát⁶.



Obr. 2: Zjednodušený model metabolismu prolinu. Prolin může vznikat z glutamátu a ornitinu, popřípadě argininu. V prvním případě je glutamát přeměňován na prolin enzymy P5CS a P5CR. Meziproduktem této reakce je P5C, který je zároveň i společným meziproduktem pro dráhu argininovou/ornitinovou. V této dráze je arginin nejprve přeměněn na ornitin působením arginasy a následně pomocí δ OAT pak na již zmíněný P5C. Ten je poté přeměněn stejnou cestou přes enzym P5CR na konečný prolin. P5CS – Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátsynthetasa (EC); P5CR – pyrrolin-5-karboxylátreduktasa (EC); P5C – pyrrolin-5-karboxylová kyselina; PDH – prolindehydrogenasa; P5CDH – Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa; δ OAT – ornitin- δ -aminotransferasa.

V degradaci prolinu se organismy mezi sebou moc neliší. Vzhledem k tomu, že je primární dusík prolinu uzamčen v pyrrolidinovém kruhu, nemůže být prolin substrátem pro běžné degradační enzymy působící na ostatní aminokyseliny, jako jsou transaminasy, dekarboxylasy či racemasy. Místo toho je tento první degradační krok v metabolismu prolinu katalyzován speciálním enzymem, prolindehydrogenasou (PDH; EC 1.5.99.8), která dokáže otevřít pyrrolidinový kruh. Prolin je působením PDH přeměněn zpět na pyrrolin-5-karboxylátovou kyselinu. Během tohoto degradačního kroku dochází zároveň k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které se následně zapojují do celé řady buněčných procesů. Prolindehydrogenasa musí být tedy ze všech enzymů účastnících se prolinového metabolismu nejpřísněji regulována, a to jak na úrovni genu tak i na katalytické úrovni. P5C, produkt vzniklý z prolinu působením PDH, je dále metabolizován působením Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasy (P5CDH; EC 1.5.1.12) na původní glutamát^{1,7}.

Úloha prolinu v lidském těle

Asi nejvýznamnější funkci v lidském těle zastává prolin v kolagenních strukturách. Prolin přítomný v kolagenu může být působením dvou enzymů prokollagen-prolin-dioxygenasou (EC 1.14.11.2) a prokollagen-prolin-3-dioxygenasou (EC 1.14.11.7) přeměněn na 3- popřípadě 4-hydroxyprolin. Přítomnost hydroxyprolinu kolagenové struktury ještě více stabilizuje v požadované konformaci. Hydroxyprolin je, stejně jako prolin, chemicky i biochemicky jedinečná aminokyselina. Tyto dvě aminokyseliny představují společně asi jednu třetinu všech aminokyselin tvořících kolagenové proteiny, které tvoří přibližně 30 % všech proteinů člověka. Vzhledem k tomu je syntéza prolinu mezi všemi aminokyselinami v lidském těle nejvyšší⁸. Díky nezbytné přítomnosti prolinu a hydroxyprolinu v kolagenu jsou

tyto dvě aminokyseliny životně důležité pro správnou funkci kloubů a šlach a tím i pro správnou funkci celého pohybového aparátu.

Kromě své role ve složení kolagenu má prolin úlohu v mnoha dalších buněčných pochodech. Bylo zjištěno, že prolin a meziprodukt jeho syntézy P5C regulují genovou expresi a zasahují do některých buněčných signálních drah. Prolin i hydroxyprolin fungují též jako „zhášeči“ volných radikálů. Tato antioxidační vlastnost může vysvětlovat, proč se jejich koncentrace výrazně zvyšuje během reakce na buněčný oxidační stres. Dále prolin napomáhá správné činnosti srdečního svalu a do jisté míry i zabraňuje ateroskleróze. Jeho přítomnost v krvi totiž ovlivňuje lipoprotein (a). Lipoprotein (a) „přináší“ při reparaci a hojení ran do poškozeného endotelu lipidy jako substráty při hojení. Ale tím paradoxně přispívá k ukládání dalších a dalších lipidů do aterosklerotického plátu, který následně způsobí aterosklerózu. Pokud je ale v krvi vyšší koncentrace volného prolinu a další aminokyseliny lysinu, lipoprotein (a) se váže přednostně na ně a tím nedochází k jeho nadměrnému ukládání na stěnu poškozených cév^{9,10,11}.

V roce 2012 Liu et al. a Phang et al. ukázali, že prolin hraje důležitou roli v rakovinném bujení. Byl zaveden pojem „parametabolická regulace“, který pojednává o „přeprogramování“ metabolismu různých neesenčních aminokyselin v nádorových buňkách. Zjednodušeně řečeno, pro tyto pochody nejsou jako hlavní molekuly potřebné „hotové“ aminokyseliny. Významná je hlavně jejich syntéza a degradace. Tyto procesy poskytují důležité meziprodukty, které jsou nezbytné pro optimální funkci a regeneraci spřažených metabolických drah. Vzájemné přeměny prolinu, argininu a glutamátu jsou v tomto směru jednou z hlavních a do jisté míry modelových drah, které mají význam v různých nutričně stresových situacích. Například proto-onkogen c-MYC, který je významně přítomen v mnoha typech lidských nádorů, výrazně zvyšuje množství enzymů prolinové syntézy z glutamátu. Objasnění těchto parametabolických regulací by mohlo vést k identifikaci nových cílů léčby rakoviny^{12,13}.

Z výše uvedeného je zřejmé, že prolin a jeho metabolismus hrají v lidském těle i u dalších živočichů velice významnou roli. Nedostatek této aminokyseliny a celkově narušení prolinového metabolismu může způsobit celou řadu problémů, jako je poškození měkkých tkání v důsledku malého množství kolagenu a s tím spojené pomalejší hojení ran, vyšší riziko aterosklerózy či narušení dalších metabolických drah, které jsou s metabolismem prolinu propojené.

Rostliny a prolin

Rostliny, na rozdíl od živočichů, kolagen neobsahují. Je tedy prolin pro rostliny nějak důležitý? Rostliny se mezi sebou v obsahu této aminokyseliny za běžných podmínek příliš neliší. Hladina prolinu však není u rostlin vždy konstantní a stejně jako u živočichů, v průběhu jejich vývoje různě kolísá a mění se. Již na počátku 80. let bylo zjištěno, že rostlina musí za účelem svého normálního vývoje akumulovat prolin. V porovnání s vegetativními pletivy bylo velké množství prolinu nalezeno v reprodukčních orgánech různých druhů rostlin. Hladina této aminokyseliny významně kolísá při tvorbě

listů. Zatímco ve zralých listech je prolinu v porovnání s kořeny více, během vývoje listů je oproti tomu hladina prolinu významně nižší. Množství prolinu ovlivňuje i velikost listů. Všechna tato pozorování vedla k závěru, že homeostáza prolinu musí být u rostlin, stejně jako je tomu u živočichů, přísně regulována^{7,14}.

Vedle výše uvedené funkce ve vývoji rostlin má prolin ještě jednu, neméně důležitou funkci. Je molekulou, která chrání rostliny před stresem a umožňuje jim nepříznivé podmínky přežít a vyrovnat se s nimi. Nejběžnější stresovou situací pro rostliny je nedostatek vody. Ten je vyvolán vedle sucha také například mrazem či přítomností solí v půdě. Během těchto nepříznivých stavů chrání prolin rostliny hned na několika úrovních. V první řadě plní prolin funkci osmoprotektantu. Osmoprotektivní funkce prolinu byla nejdříve objevena u bakterií¹⁵. To vedlo k předpokladu, že pozorovaná akumulace prolinu u rostlin vystavených nedostatku vody bude mít stejnou ochrannou funkci, což bylo později i potvrzeno⁷. Vyšší hladina volného prolinu v cytosolu snižuje v protoplastech osmotický potenciál, tzn. zvyšuje osmotický tlak, a tím napomáhá rostlině lépe přijímat vodu.

Zasolení půd a sucho vyvolává u rostlin sekundární oxidační stres a prolin je do určité míry schopen reaktivní formy kyslíku vznikající při tomto stresu vychytávat a opět tak pomáhá rostlině se s těmito stresem vyrovnat¹⁰. V neposlední řadě prolin chrání integritu proteinů a tím zároveň posiluje enzymatickou činnost. Prolin je schopen v případě nouze částečně nahradit proteinovým strukturám vodu a posiluje tak jejich hydratační obal. Proteiny jsou si díky tomu schopné udržet svoji správnou a funkční konformaci^{7,16,17}.

Je zřejmé, že prolin zastává u rostlin, stejně jako u živočichů, významnou funkci hned v několika případech. Cílené změny v metabolismu a regulaci syntézy prolinu by tedy v budoucnosti mohly vést k rostlinám se zvýšenou tolerancí vůči vodnímu stresu či stresu způsobenému zasolením, které jsou v současné době problémem mnoha zemědělských oblastí po celém světě.

Závěr

Jedinečná aminokyselina prolin má v metabolismu převážně většiny organismů nezastupitelnou funkci. U živočichů a zejména u lidí se v první řadě jedná o jeho významnou funkci ve stavbě kolagenu a dále také o nedávno objevenou funkci prolinu a hlavně meziproduktů jeho metabolismu v nádorových onemocněních. Na rozdíl od živočichů, u rostlin nemá prolin funkci ani tak jako stavební jednotka, ale hlavně jako molekula významně se podílející na obranné reakci rostlin na stres vyvolaný nedostatkem vody a jako látka napomáhající správnému vývoji rostliny. Všechny role prolinu a přesné mechanismy jeho působení v organismech však nejsou dosud zcela objasněny. Nezbyvá než závěrem říci, že prolin je důležitou součástí všech živočišných organismů i rostlin, a proto je třeba i nadále věnovat studiu jeho metabolismu a funkcí v organismech náležitý čas a zaslouženou pozornost.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2016).

Literatura

1. Phang J. M., et al.: *Amino Acids*. 35, 681 (2008).
2. Phang J. M., et al.: *Annual Review of Nutrition*. 30, 441 (2010).
3. <http://www.chempoint.cz/fyzikalne-chemicke-vlastnosti-medu>; dostupné 11. listopadu 2016
4. <http://www.aminoacidsguide.com/Pro.html>; dostupné 10. září 2016.
5. Kodíček, M. Prolin. From: *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007. Dostupné 1. září 2016 z [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=prolin](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=prolin).
6. Wu G. et al.: *Amino Acids*. 40 (4), 1053 (2011).
7. Szabados L. and Saviouré A.: *Trends in Plant Science*. 15, 89 (2009).
8. Hu C.A. et al.: *Amino Acids*. 35, 665 (2008).
9. Kaul S. et al.: *Amino Acids*. 34, 315 (2008).
10. Verbruggen N. and Hermans C.: *Amino Acids*. 35, 753 (2008).
11. Ivanov V. et al.: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 49, 140 (2007).
12. Liu W. et al.: *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 109, 8983 (2012).
13. Phang J.M. et al.: *Frontiers in Oncology*. 2, 60 (2012).
14. Suprasanna P. et al.: Plant adaption to environmental change, Significance of amino acids and their derivatives (Anjum N.A., Gill S.S., Gill R., eds.), CABI, Oxfordshire, UK, 68–96 (2014).
15. Csonka L.N. et al.: *Gene*. 64, 199 (1988).
16. Hong Z. et al.: *Plant Physiology*. 122, 1129 (2000).
17. Chiang H. H. et al.: *Plant, Cell & Environment*. 18, 1280 (1995).

Souhrn

Hajná V., Martinec J., Novotná Z.: Prolin, výjimečná aminokyselina aneb, za co všechno může prolin v eukaryotické buňce

Prolin má jako jediná aminokyselina primární dusík uvnitř pyrrolidinového kruhu a z toho vyplývají jeho jedinečné vlastnosti. Jeho biosyntéza v organismech probíhá několika drahami. Substrátem může být glutamát a arginin, popř. ornitin, zatímco v degradaci prolinu se organismy mezi sebou neliší. Prolin je velmi důležitou aminokyselinou a jeho funkce se u živočichů a rostlin zásadně liší. V případě lidského organismu je prolin zásadní složkou kolagenu a nově byla popsána jeho účast v metabolismu nádorových buněk. U rostlin plní prolin především úlohu osmoprotektantu, molekuly, která pomáhá rostlinám překonat stres vyvolaný nedostatkem vody. Prolin má však v obou říších eukaryot mnoho dalších funkcí.

Klíčová slova: Prolin, hydroxyprolin, metabolismus, kolagen, stres

Summary

Hajná V., Martinec J., Novotná Z.: Proline, an exceptional amino acid and what can proline do in the eukaryotic cell

Proline is the only amino acid which has primary nitrogen inside of pyrrolidine ring and because of that proline has unique properties. There are several different pathways of proline synthesis in eukaryotic organisms. Glutamate and arginine, respectively ornithine are possible substrates for proline synthesis, while degradation is not different among eukaryotic organisms. Proline is an important amino acid and its functions are fundamentally different in animals and plants. In the case of the human, proline is essential component of collagen and its participation in the metabolism of cancer cells was newly described. In plants, proline functions mainly as osmoprotectant and helps to overcome water stress. However, proline has many other functions.

Keywords: Proline, hydroxyproline, metabolism, collagen, stress

SEVERE REFRACTORY ASTMA, MOLECULAR ASPECTS OF DIAGNOSTICS AND PHARMACOTHERAPY

Tereza Kacerova^{1,2}, Marek Kuzma¹, Petr Kacer^{1*}

¹ University of Chemistry and Technology, ² Secondary school Prague 7, Nad Stolou 1; *Petr.Kacer@vscht.cz

Introduction

Bronchial asthma is a pulmonary disease that is usually characterized by attacks of dyspnoea. Asthma is usually induced by bronchoconstriction and by an increased production of mucus which is abnormally viscous and dense¹. Currently, there are approximately 350 millions of people who suffer from asthma. At the same time, the prognosis show that this number will keep increasing in the future. On the other hand, there is a wide range of available asthma therapies, allowing patients to return to their normal life. This might be the reason for the relatively common presumption that asthma is a disease with sufficiently resolved diagnostics and applied therapies. This assumption, however, may be the cause for a relatively reduced research and public attention dedicated to asthma. Only the expert part of society seems to perceive the increasing incidence of asthma, the decreasing age of the first asthma

attack and the adverse prospects of its future development. Furthermore, for a not negligible number of patients, the currently used pharmacotherapy is practically inefficient – the severe refractory asthmatics (SRA). The SRA patients make up for approximately 3 % of the total number of asthmatics worldwide, which represents more than 10 million people expending 65 % of the total cost spend on asthma therapies².

The presented work is engaged to the development of a molecular-diagnostic method based on two groups of biomarkers. The first encompasses cysteinyl leukotrienes (cys-LTs), functioning in the human organism as mediators of inflammation³. To the contrary, the second group contains lipoxines (LXs), i.e. biomarkers with an anti-inflammatory function. The special attention has been paid to the possibility to diagnostically separate the group of SRA patients by means of the developed molecular diagnostic method^{4,5}.

Exhaled breath condensate – a biological matrix for molecular diagnostics

In order to render a correct diagnosis of a disease, it is crucial to select an appropriate biological material in which detection of various biomarkers is feasible and applicable to reliable molecular diagnostics. Exhaled breath condensate (EBC) is a matrix⁶ particularly specific for the lung and airways' diseases. EBC composition corresponds to the composition of bronchoalveolar fluid which reflects all the processes that influence lungs and the respiratory ways⁵. The main component of EBC is water vapor, where a number of inorganic compounds (nitric oxide, oxygen, nitrogen, carbon dioxide etc.) and many organic compounds (amino acids, peptides, enzymes, prostanoids and cytokines, etc.), contained in EBC in the form of an aerosol⁷, can be detected.

The prominent potential of the withdrawal of EBC lays mainly in a far less burdening of the patients by this non-invasive method, compared to the commonly used invasive (bronchoalveolar lavage) and semi-invasive (induced sputum) diagnostic alternatives. At the same time, the withdrawal of EBC is a method easily repeatable in a relatively short period of time⁸ and thus applicable for a real-time monitoring of the disease course.

Cysteinyl leukotrienes and lipoxines as biomarkers for the diagnostics of bronchial asthma

The aim of the study was to determine the concentration levels of biomarkers of the allergic reaction, namely – cysteinyl leukotrienes (cys-LTs; specifically: LTC₄, LTD₄ a LTE₄) and the substances with physiologically anti-inflammatory function in the organism – lipoxines (LXs; specifically: LXA₄, LXB₄) in EBC. Both of these groups of biomarkers are generated from arachidonic acid by various enzymatic paths. Arachidonic acid ((5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid) is a polyunsaturated omega-6 fatty acid 20:4(ω-6), which is present in the phospholipid cell membranes and also enables the production of biomarkers that are able to regulate the inflammatory response.

Leukotrienes (LTs) are inflammatory mediators, which are divided into two groups based on their effect and site of action. The first group includes leukotriene B₄ (LTB₄), which is produced in monocytes, neutrophils and alveolar macrophages. Its autacoidal "mission" is to activate a wide range of immune effector cells and it is a major participant in the pathogenesis of various inflammatory diseases. The binding of LTB₄ to receptors can lead to narrowing of the airways, an increased mucus secretion and local oedema. Among significant cys-LTs can be included LTC₄, LTD₄ and LTE₄, which are formed by eosinophils, basophils, mast cells and macrophages. Their receptors (cys-LT receptors) are mainly located on smooth muscle cells and tissues of the airways and the binding of cys-LTs leads to airway hyper-responsiveness and bronchoconstriction^{3,9}. Receptor cys-LT1 binds all cys-LTs and their binding is demonstrated by airway obstruction (download bronchitis, mucosal oedema, increased phlegm secretions^{9,10}). Cys-LT2 receptor can be activated only by LTC₄,

which causes vasoconstriction of pulmonary vessels. It is proved that the level of cys-LTs in EBC is significantly higher among asthma patients compared to healthy subjects.

LTs are generally produced from arachidonic acid by the reaction with the enzyme 5-lipoxygenase (5-LO), where arachidonic acid is oxidized to 5S-hydroperoxyeicos-6,8,11,14-tetraenoic acid (5S-HPETE). 5 HPETE is converted by LTA-synthetase to a highly reactive leukotriene A₄ (LTA₄), which is immediately metabolized during inflammatory processes, producing additional "family members of cys-LTs" (LTC₄, LTD₄, LTE₄, LTF₄)¹⁰.

In contrast to cys-LTs, LXs and the epimers of 15-epi-lipoxins include exactly the opposite effects on the organism, functioning as the anti-inflammatory mediators. They are also able to support the reconstruction processes that occur in the lungs immediately after an asthma attack. LXs as well as cys-LTs are produced metabolically from arachidonic acid, however, there are three possible pathways of generation. The first of these is mediated by 15-lipoxygenase (15-LO), present in tissue cells of the airways, initiating the biosynthesis of LXs. The second path is attributed to the oxidation of LTA₄, accompanied by 12-lipoxygenase (12-LO). These two syntheses not only allow the production of LXs, but also reduce the production of LTs. The last route is a subject to acetylsalicylic acid and occurs mainly in patients suffering from a particular phenotype of asthma, the so called aspirin-induced asthma.

Experimental

Chemicals

Standards: Leukotriene C₄ (≥ 97 %), leukotriene D₄ (≥ 97 %), leukotriene E₄ (≥ 97 %), leukotriene C₄-d₅ (≥ 99 %), leukotriene D₄-d₅ (≥ 99 %), leukotriene E₄-d₅ (≥ 99 %), lipoxine A₄-d₅ (≥ 95 %, Cayman Chemicals, USA), serotonin hydrochloride (= 5-hydroxytryptamine hydrochloride; = 5-HT.HCl; ≥ 98.0 %; Sigma Aldrich, USA);. Auxiliary chemicals: Acetonitrile (LC-MS, Fisher Scientific, USA), water (LC-MS, Fisher Scientific, USA), ammonium acetate (99,99 %, Sigma Aldrich, USA), 2-propanol (LC-MS, Acros Organics, USA), methanol (LC-MS, Fisher Scientific, USA), formic acid (LC-MS, Fisher Scientific, USA), acetic acid (≥ 99,8 %, Acros Organics, USA), 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, USA). Gases: nitrogen (99,5 %, nitrogen generator, Peak Scientific, USA), helium (5.5, SIAD, Czech Republic), argon (5.0, SIAD, Czech Republic).

Analytical conditions – HPLC-MS

HPLC-MS analysis to determine cys-LTs, LXs and 5-HT were carried out using a mass spectrometer with a triple quadrupole TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) connected to a quaternary high pressure pump Accela 600 Pump (Thermo Scientific, USA), an auto sampler Open Accela AS (Thermo Scientific, USA) and with column thermostat Ultimate 3000 (Dionex, USA).

Metabolic profiling was carried out under isocratic separation of substances by HPLC¹¹. Hypercarb column was used (100 x 2.1 mm, 5 m; Thermo Scientific, USA)

and the mobile phase consisted of a mixture of 75 % propan-2-ol with addition of formic acid (1 % v/v) and 25 % ammonium acetate (10 mmol/l aqueous solution). The mobile phase flow was set at 150 μ l/min and it was constant during the whole measurement. The chromatographic column was thermostated to 40 °C. Injection volume was 10 μ l. The detection was performed by tandem mass spectrometry (MS/MS) operating in electrospray negative ionization mode (ESI⁻). ESI-MS analysis was performed in the SRM mode (Selected Reaction Monitoring), monitoring the characteristic transitions ($m/z \rightarrow m/z$, the collision energy (eV)): LTC₄ (624.1 $\rightarrow$ 351.2, 17 eV); LTD₄ (495.2 $\rightarrow$ 477.3, 16 eV); LTE₄ (438.2 $\rightarrow$ 333.1, 16 eV); LXA₄ (351.2 $\rightarrow$ 115.0, 17 eV); LXB₄ (351.2 $\rightarrow$ 221.1 17 eV); 5-HT (177 $\rightarrow$ 160 eV) and quantification using deuterium-labelled internal standards (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅, LXB₄-d₅, 5-HT-d₄). Conditions on the mass spectrometer were optimized for the following values: Voltage of the needle (-2,500 V), the pressure of the carrier gas (nitrogen, 35 psi), the pressure of the auxiliary gas (nitrogen, 10 arb), the temperature of the capillary (300 °C). Data were measured and processed using software Xcalibur 2.2 Sieve 2.1 (Thermo Scientific, USA) XLSTAT 2015 (Addinsoft, USA). Profiling of metabolites formed from arachidonic acid (LTC₄, LTD₄, LTE₄, LXA₄, LXB₄) and of 5-HT, was carried out and graphical outputs were expressed using boxplots charts and scatter diagrams of component scores.

EBC sample collection

The commercially available EcoScreen condenser equipped with saliva trap (Jaeger, Germany) was used for the EBC sample collection. The acquired EBC volumes of samples ranged from 1 – 2 ml. Immediately after the sample collection, 50 pg of each deuterium labelled internal standard (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅ and LTE₄-d₅) was added to 1 ml of EBC and the sample was subsequently frozen to the temperature of – 80 °C (stored for a period not exceeding 6 months). Pre-frozen EBC samples (– 80 °C; 1 ml; labelled by deuterium labelled internal standards) were introduced into a lyophilizer (Labconco Free Zone, USA) for 6 hours. The spiral of the lyophilizer was cooled to – 47 °C and the pressure stabilised within one hour at 9 kPa. The lyophilized residue was dissolved in the mobile phase (50 ml) and immediately analysed by LC-ESI-MS/MS.

Results and discussion

Separation of SRA from the other asthma phenotypes

The above mentioned analytical method¹¹ for determination of cys-LTs and LXs had been developed, validated and used in clinical study of patients with different asthma phenotypes. The study engaged a group

of SRA, containing 60 people (35 women and 25 men), with the median of age 54 years. In next, a group of patients, suffering from difficult asthma that contained 50 people (27 women and 23 men) was involved, with the median of age 56 years. The group of patients with a moderate-persistent asthma consisted of 42 people (23 women and 19 men) with the median age 47 years. The last group were patients with mild asthma where 33 people (18 women and 15 men) were involved with the median age 54 years. The control group contained 30 healthy non-smokers (16 women and 14 men), without any previous diagnosis of asthma or allergy, with the median of age 43 years.

The results (Figure 1a, 1 b) show that EBC of asthmatics contained increased levels of the pro-inflammatory cys-LTs, with the highest levels detected among the SRA. To the contrary, the levels of the anti-inflammatory LXs were significantly increased among the health controls and at the same time decreased among asthmatics (EBC of SRA contained the lowest levels of LXs from all the groups mentioned above).

According to the results, it is possible to use cys-LTs and LXs for the differential diagnostics of asthma. The diagnosis can be founded on the fact that the concentration levels of cys-LTs and LXs are complementary and there exists a relation of dynamic equilibrium (i. e. when the level of the pro-inflammatory LTs increases, the level of the anti-inflammatory LXs correspondingly decreases). This phenomenon can be attributed to the fact that biochemical synthesis in the organism (mother molecule: LTA₄) enabling the production of LXs at the same time reduce the production of LTs. The combination of these two groups of biomarkers represents an interesting option for the molecular diagnostics applicable for asthma phenotyping. In the Figures 1a and 1 b is described the principle of equilibrium between the pro-inflammatory LTs and

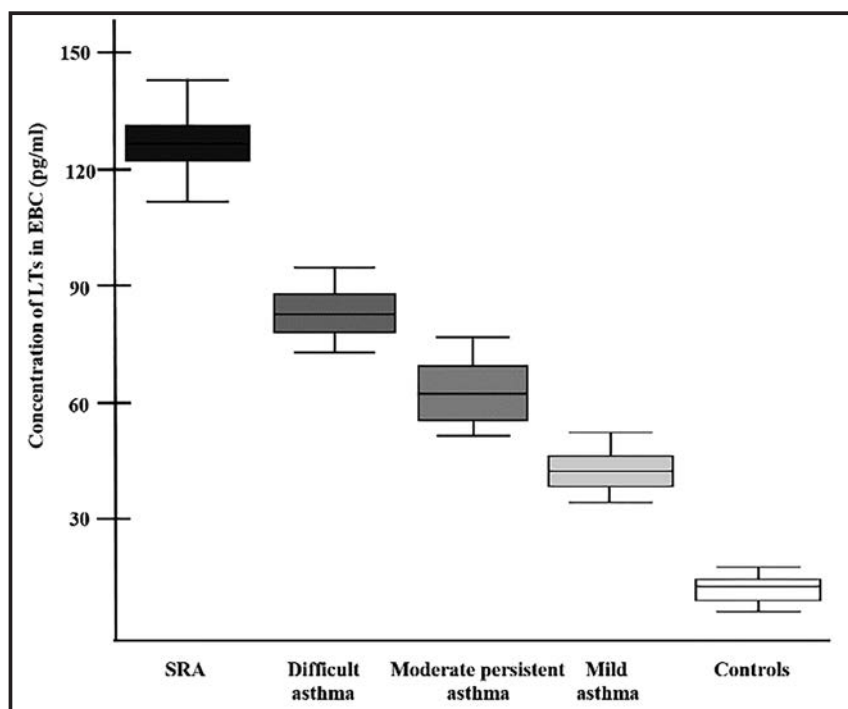


Fig. 1a: Statistically evaluated clinical study: Levels of cys-LTs in different asthma phenotypes

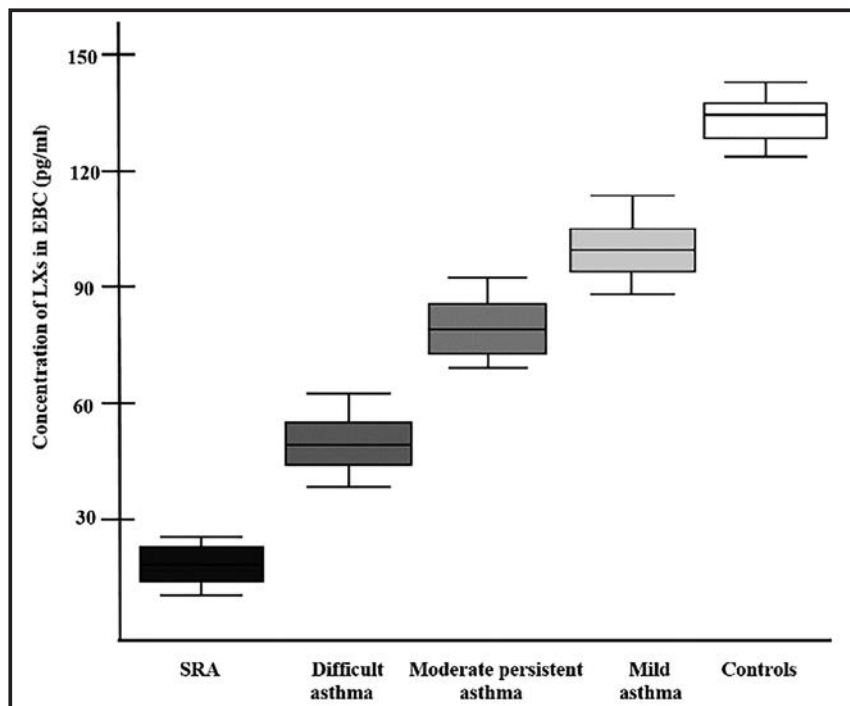


Fig. 1 b: Statistically evaluate clinical study: Levels of LXs in different asthma phenotypes

the anti-inflammatory LTs. Apparently, such tool has a profound potential to significantly contribute to the accuracy of the current diagnostics and it enables division of the asthmatics into groups:

- a/ difficult asthma
- b/ moderate-persistent asthma
- c/ mild asthma
- d/ severe refractory asthma
- e/ non-asthmatics – health controls.

The developed method was implemented to several studies that were aimed at different fields of molecular diagnostics, especially at asthma phenotyping with the option of separating SRA.

The method is completely non-invasive, and thus it can be applied to a wide range of patients from children to seniors. Another advantage is the fact that the withdrawal of EBC can be repeated in short periods of time, which is crucial for clinical studies that investigate the processes in respiratory tract that occur as a response to specific impulses (allergens, climate conditions, air quality, air temperature, physical activity etc.).

Serotonin and SRA

Serotonin (5-hydroxytryptamin (5-HT)) is a neurotransmitter that is primarily located in gastrointestinal tract and in the central nerve system. According to the clinical experience it seems that SRA patients positively respond to SSRI (Selective serotonin re-uptake inhibitors) antidepressants therapy, although otherwise they do not respond to any kind of anti-asthmatic pharmacotherapy.

There are actually two sides of this phenomenon. Firstly, the antidepressants definitely influence the psychological state of the patients, so the improvement of their mental state is quite a logical and expected consequence. However, after the therapy are improving also the respiratory functions of the patients. This allowed an assumption that EBC of SRA will contain lower levels of 5-HT which will provide a sufficient explanation of the positive response to the SSRI antidepressants therapy. However, the results proved to be opposite to the original assumption.

In the study was involved a group of SRA that contained 52 people (33 women and 19 men, the median of age 51 years), group of 31 patients diagnosed with moderate persistent asthma (18 women and 13 men, median of age 49 years) and a control group, where were involved 45 people (23 women and 22 women, median of age 49 years). There were done LC-MS/

MS analysis that showed that EBC of SRA contained increased levels of 5-HT (Figure 2). Surprisingly, the analysis also showed that EBC of other asthma phenotypes (here represented by moderate persistent asthma) and health controls contained almost the same levels of 5-HT (Figure 2).

The interpretation of these results is quite complicated. The study has shown that EBC of SRA contains different (i. e. higher) levels of 5-HT than other asthma phenotypes. There might be several explanations of this phenomenon. One of them offers a hypothesis that SRA could be a different disease that would be only demonstrated as asthma. This would be the reason why SRA do not respond to any kind of anti-asthmatic pharmacotherapy. Also, it has to be taken into consideration that the detection of 5-HT has been done in EBC, so the

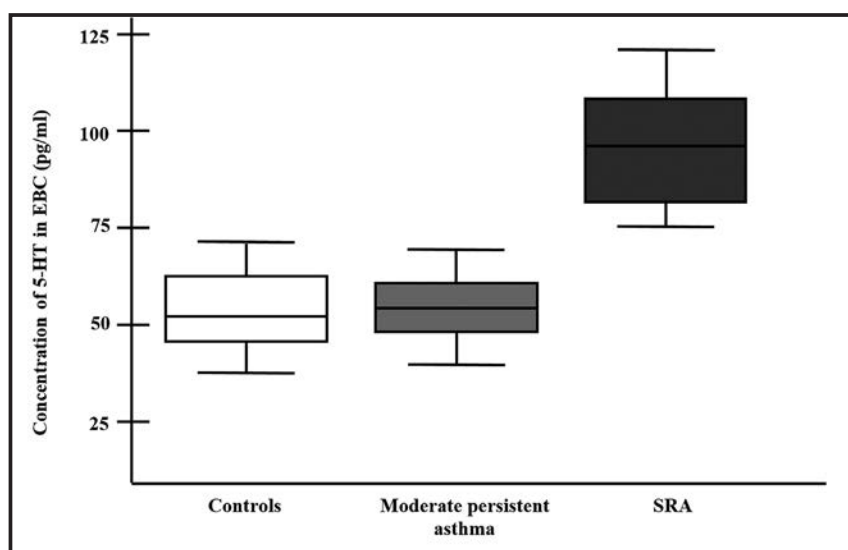


Fig. 2: Statistically evaluated clinical study: Levels of 5-HT in SRA, moderate persistent asthma and controls

information about the levels of 5-HT behind the brain-blood barrier is still unknown, so it does not sufficiently explain the positive response to SSRI antidepressants.

The analysis has only unrevealed interesting information, but it is quite obvious that further research will have to be held in the future, in order to provide a clearer explanation and possible impacts of this phenomenon.

Conclusion

The work has been engaged to enhancing molecular diagnostics of asthma. The main objective of this study was to do phenotyping of bronchial asthma with the emphasis on SRA, i.e. patients who are irresponsive to any sort of currently used pharmacotherapies. The method was based on the detection of levels of biomarkers in EBC, a highly specific matrix for the respiratory system.

As a part of the work, an analytical method was developed, enabling a detection of the levels of the low-molecular substances generated from arachidonic acid (LTs and LXs). The method was then tested in a clinical study confirming its applicability for asthma phenotyping. The quantification of known biomarkers demonstrated that EBC of patients diagnosed with asthma

consistently displayed both increased levels of cys-LTs (the highest levels were present in EBC of SRA) and decreased levels of anti-inflammatory LXs. With respect to these biomarkers, the results and the diagnostic potential were verified by monitoring EBC of health controls, which showed unambiguously inverse values. Efficient monitoring of the described phenomenon can thus enable asthma phenotyping in clinical practise based on the natural balance between cys-LTs and LXs in the human body.

There was also done an experiment that should have explained why SRA positively respond to SSRI antidepressants therapy. In EBC off SRA was detected a statistically significant increase of 5-HT. This result does not have an unequivocal explanation (for example the blood-brain barrier must be taken into consideration), but it also offers a hypothesis that SRA could be a different disease that would be only demonstrated as asthma.

Acknowledgement

This work was carried out within the framework of the National Programme of Sustainability NPU I LO1215, MSMT – 34870/2013.

References

1. Holz O, Kips J, Magnussen H: *Eur. Respir. J.* 16, 355 (2000).
2. <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/tezke-astma-a-obtizne-lecitelne-astma-429721>, staženo 12. 11. 2016.
3. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Busch A, Wilson NM, Barnes PJ: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1345 (2002).
4. Syslova K., Kacer P., Kuzma M., Novotny P., Pelclova D. (2012): Determination of Biomarkers in Exhaled Breath Condensate. In: *Bronchial Asthma: Emerging Therapeutic Strategies*. (Sapey E. ed.), InTech, Rijeka, 37-75.
5. Chappell GP, Xiao X, Pica-Mendez A, Varnell T, Green S, Tanaka WK, Laterza O: *J. Chromatogr. B* 879, 277 (2011).
6. Montuschi P, Felli M, Mondino C, Barnes P, Chiarotti: *Respir. Res.* 6, 119 (2005).
7. Higashi N, Mita H, Ono E, Fukutomi Y, Yamaguchi H, Kajiura K, Tanimoto H, Sekiya K, Akiyama K, Taniuchi M: *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1084 (2010).
8. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Klusáčková P, Fenclová Z, Lebedová J, Pelclová D: *J. Chromatogr. B* 867, 8 (2008).
9. Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, Zervas E, Economidou E, Papatheodorou G, Loukides S, Gaga M: *Respir. Med.* 103, 750 (2009).
10. Syslova K, Kacer P, Kuzma M, Pankracova A, Fenclova Z, Vlckova S, Lebedova J, Pelclova D: *J. Breath Res.* 4 (1), 017104/1 (2010).
11. Kacerova T, Kuzma M, Kacer P: *Chem. Listy* 111, 982 (2017).

Summary

Kacerova T., Kuzma M., Kacer P. : Severe refractory asthma, molecular aspects of diagnostics and therapy

The present work mainly deals with the issue of severe refractory asthma (SRA), i. e. an asthma phenotype that does not respond to any kind of currently used pharmacotherapy. The work is patterned on a diagnostic method that is based on molecular diagnostics of a highly specific matrix – exhaled breath condensate (EBC). The method works with two groups of biomarkers that are known as cysteinyl leukotrienes and lipoxines. Cysteinyl leukotrienes are mediator of inflammation, however lipoxines have the anti-inflammatory function. The combination of these two groups biomarkers can be used for accuracy of asthma phenotyping and it also allows separation of SRA, which was confirmed in a clinical study. At the same time, the work tries to explain, why SRA positively respond to SSRI antidepressants therapy. It has been detected that EBC of SRA contains increased levels of 5-HT (compared to controls and other asthma phenotypes). This phenomenon has several possible explanations. One of them offers a hypothesis that SRA could be a different disease that would be only demonstrated as asthma. But this issue will definitely require further research in the future.

Keywords: Bronchial asthma, molecular diagnostics, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, lipoxines, cysteinyl leukotrienes, serotonin

Souhrn

Kačerová T., Kuzma M., Kačer P. : Obtížně-léčitelné astma, molekulární aspekty diagnostiky a farmakoterapie

Předkládaná práce se zejména zabývá problematikou obtížně léčitelného astmatu (OLA), tedy zvláštního fenotypu, který nereaguje na žádnou formu zatím známé antiastmatické farmakoterapie. Práce je založena na diagnostické metodě, kdy molekulární diagnostika vychází z vysoce specifické matrice – kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV). Metoda pracuje se dvěma skupinami biomarkerů, které jsou známy jako cysteinylované leukotrieny a lipoxiny. Cysteinylované leukotrieny jsou mediátory zánětu, naproti tomu lipoxiny mají funkci protizánětlivou. Kombinace těchto dvou skupin biomarkerů pak velmi zpřesňuje fenotypizaci astmatu a zároveň umožňuje oddělení OLA, což bylo potvrzeno v klinické studii. Zároveň se práce snaží vysvětlit, proč OLA pozitivně reagují na terapii SSRI antidepressivy. Bylo zjištěno, že KVV OLA obsahuje zvýšené hladiny 5-HT (v porovnání s kontrolní skupinou a ostatními fenotypy astmatu). Tato skutečnost má mnoho možných vysvětlení. Jedno z nich nabízí hypotézu, že OLA by mohlo být jiným onemocněním, které by se pouze demonstrovalo podobně jako astma. Ovšem tato problematika bude jistě v budoucnu ještě vyžadovat další výzkum.

Klíčová slova: Bronchiální astma, molekulární diagnostika, vysoceúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, lipoxiny, cysteinylované leukotrieny, serotonin

OBSAH

Úvodem	65
GATE2BIOTECH – unikátní portál nejen o českých biotechnologiích	66
Kaštánek P., Brányik T.: Ocenění Vizionáři 2016	67
Šulc M., Stiborová M.: Vzpomínka na paní prof. RNDr. Danuši Sofrovou, CSc.	69
Gharwalová L.: Možnosti využití odpadů z potravinářského průmyslu a zemědělství v biotechnologiích	70
Skládal P., Příbyl J., Pešl M., Rotrekl V.: Nanomechanické biosensory	73
Paldrychová M., Gharwalová L.: Antibiofilmová aktivita chitosanu	76
Šulc M., Ptáčková R.: Biotechnologické aspekty UV-světlem iniciovaného síťování – PIXL (z angl. Photo-Induced Cross-Linking): nové alternativní techniky pro studium 3D struktury proteinů či vzájemných interakcí	79
Uttl L., Vondráková K., Zlámalová E., Tsenov G., Kačer P.: Metabolomické mapování jako nástroj k porozumění molekulární podstaty závislosti a ke zjištění adiktologického potenciálu nových syntetických drog	84
Hajná V., Martinec J., Novotná Z.: Prolin, výjimečná aminokyselina aneb, za co všechno může prolin v eukaryotické buňce	87
Kačerová T., Kuzma M., Kačer P.: Obtížně-léčitelné astma, molekulární aspekty diagnostiky a farmakoterapie	90

CONTENTS

Editorial	65
GATE2BIOTECH – unique portal not only about Czech biotechnology	66
Kaštánek P., Brányik T.: Awards Visionaries 2016	67
Šulc M., Stiborová M.: In memory of prof. Danuse Sofrova	69
Gharwalová L.: Possibilities of using waste from food industry and agriculture in biotechnologies	70
Skládal P., Příbyl J., Pešl M., Rotrekl V.: Nanomechanical biosensors	73
Paldrychová M., Gharwalová L.: Antibiofilm activity of chitosan	76
Šulc M., Ptáčková R.: Biotechnological aspects UV-light induced cross-linking – PIXL (Photo-Induced Cross-Linking): novel alternative technique to study 3D protein structure or their mutual interactions	79
Uttl L., Vondrakova K., Zlamalova E., Tsenov G., Kacer P.: Perspectives in the metabolomic mapping of addiction potential of new synthetic drugs	84
Hajná V., Martinec J., Novotná Z.: Proline, an exceptional amino acid and what can proline do in the eukaryotic cell	87
Kacero T., Kuzma M., Kacer P.: Severe refractory asthma, molecular aspects of diagnostics and therapy	90

REDAKČNÍ RADA

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

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

Novák Z.: Diploma Thesis, UCT Prague 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
vydávaných v ČR

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