

B I PROSPECT

Dvacátý ročník
Číslo 3-4/2010

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

BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

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

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

Redakční rada

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

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

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

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

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

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

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

Ing. Jan Kopečný, DrSc.
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.
(Endokrinologický ústav, Praha)

BIOPROSPECT

20th Volume
No. 3-4/2010

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (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,

Jak jsme Vás již informovali, pokračují přípravy mezinárodního biotechnologického symposia BIOT 2011 spojeného s 5. Česko-švýcarským symposiem, které se uskuteční 15. – 17. června 2011 v Národní technické knihovně v Praze 6 a bude následováno symposiem „Plant Biotechnology“ ve dnech 20. a 21. 6. 2011 v Olomouci. Webové stránky pro obě akce jsou již k dispozici (www.biot2011.cz) a prosíme Vás, abyste si je laskavě prohlédli a neotáleli s registrací Vaší účasti. Žádáme Vás, abyste o těchto akcích informovali své známé, a to nejen doma, ale i v zahraničí. Pro symposia je již připraven zajímavý program (viz webové stránky) a podle zájmu jej můžeme dále rozšířit. Vaši účast umožní i kvalitní technické a společenské prostředí. Jsem přesvědčen, že se nám podaří dále rozšířit spolupráci se švýcarskými kolegy, kteří byli iniciátory prvního společného biotechnologického symposia v Praze v r. 1999, a dále rozšířit tuto výměnu zkušeností a navázání spolupráce s biotechnologií v dalších zemích, nejen evropských. Národní technická knihovna vytváří pro toto symposium kvalitní zázemí, včetně galerie, kde hodláme uspořádat uvítací večírek.

Na jaře opět počítáme s jednodenním seminářem „Novinky v oblasti genetických modifikací“. Jeho termín a program Vám sdělíme v příštím čísle a na našich webových stránkách. Letošní rok byly v České republice poprvé pěstovány geneticky modifikované brambory na 150 ha v kraji Vysočina. Sklizené hlízy jsou však určeny výhradně pro průmyslové použití. Jedná se o odrůdu Amflora, která má zvýšený obsah amylosy (lineárního škrobového polysacharidu). Naproti tomu poklesla produkce geneticky modifikované kukuřice, která byla v r. 2010 pěstována jen na 4680 ha (zhruba úroveň roku 2007). Důvodem jsou odbytové problémy způsobené permanentní negativní kampaní proti GM plodinám. V případě GM kukuřice se však ukázalo, že GM kukuřice je méně napadena plísněmi (produkujícím aflatoxiny) a představuje tedy kvalitnější krmivo pro hospodářská zvířata. Vzhledem k nižšímu poškození porostů bývají průměrné výnosy o 10 % vyšší než

u klasických hybridů (viz publikace Ministerstva zemědělství ČR). Z mezinárodního hlediska je významná současná situace v USA, kde se v nejbližší době počítá s uvolněním do oběhu (rozuměj běžného prodeje) první geneticky modifikovaná potravina živočišného původu, a to lososa pěstovaného v uzavřených prostorech. Jedná se o infertilní samice (údajně z 98 %), u nichž bylo dosaženo exprimování růstového hormonu i v chladných vodách, takže losos roste přibližně dvakrát rychleji. Pokud bude jeho prodej povolen, zřejmě to uvolní cestu pro pozdější uvolnění dalších živočišných produktů.

Vzhledem k tomu, že biotechnologie mají v mnoha směrech blízko i k chemii dovolujeme si připomenout, že příští rok byl prohlášen mezinárodním rokem chemie (letošní rok byl mezinárodním rokem biodiversity).

V současném čísle našeho Biopropectu Vám přinášíme i stručnou informaci o 14. Mezinárodním biotechnologickém symposiu, které se konalo 14. – 18. září 2010 v italském Rimini. Dále uvádíme recenzi zajímavé knihy, pozvánky na naše symposia a zajímavý kurs pořádaný kolegy v Olomouci. Jistě Vás zaujmou přehledné články se zajímavou aktuální tematikou. Těšíme se na Vaše další příspěvky, které nám pomůžou si rozšířit náš přehled o širokém spektru biotechnologických tematik. Články laskavě posílejte průběžně a respektujte pokyny pro autory.

Závěrem roku bychom Vám rádi poděkovali za Vaši kontinuální přízeň, těšíme se na spolupráci v dalším roce a zejména na Vaši účast na námi pořádaném mezinárodním symposiu BIOT2011.

Přejeme Vám klidné a pohodové prožití vánočních svátků, pevné zdraví, osobní a pracovní úspěchy po celý rok 2011.

Srdečně Vás zdraví

Váši

Jan Káš a Petra Lipovová

14th INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY SYMPOSIUM AND EXHIBITION

14 – 18. září 2010, Rimini, Italie

S „mezinárodními biotechnologickými symposii“ se roztrhl pytel a pořádají se po celém světě od Číny přes Indii i USA. Toto symposium, jak již vyplývá z jeho označení je již čtrnácté a až do letošního roku se pořádalo ve čtyřletých intervalech, takže jistě uznáte, že se opravdu dá hovořit o tradici. Dosud se vždy udržovalo pravidlo, že každé další symposium se má konat v jiném světadíle. Zatím se již vystřídaly všechny obydlené kontinenty kromě Afriky, kde se nenašel vhodný organizátor. Před dvěma roky se v čínském Dalianu rozhodlo, že symposia se budou konat každé dva roky, a proto se symposium letos konalo v Itálii (tedy v Evropě). Za další dva roky se opět vrátí do Asie, a sice do (jižní) Koreje. Zde se bude konat v Daegu 16. – 21. září 2012 (<http://www.ibs2012.org>). Daegu je významné město v jižní části (jižní) Koreje, mimo jiné, sídlo významných společností jako je Hunday či Samsung.

Dosud jsem se nezmínil, že iniciátorem těchto konferencí byla a dosud je biotechnologická komise IUPACu (celosvětová unie národních chemických společností), zřejmě i proto, že celosvětová unie národních biotechnologických společností neexistuje. Proto i EFB (Evropská federace biotechnologií) s IUPACem spolupracuje.

Výběr místa konání tak velkého symposia (ve skutečnosti velkého kongresu složeného z množství symposií) nebyl nejšťastnější. Symposium se mělo konat v nově postaveném velkém kongresovém centru, které však do doby jeho konání nestačili dostavět. Nicméně v jeho blízkosti se nachází staré centrum, které poskyt-

lo dostatek vhodného prostoru pro realizaci symposia. Mezi další problémy patřilo nepříliš jednoduché dopravní spojení z hotelů ke kongresovému centru a vysloveně mizerná místní doprava (autobus 2x za hodinu). Vlastní organizace symposia se v jeho průběhu postupně vylepšovala. Většina účastníků však postrádala tištěná abstrakta, která účastníci dostali pouze ve formě CD, a tak se museli spokojit jen s programem přednášek a seznamem posterů.

Symposium se konalo pod heslem „Biotechnology for the sustainability of Human Society“. Hlavním organizátorem byl prof. Fabio Fava, který obhajoval svůj PhD titul na našem ústavu a je specializován na oblast bioremediací. Sekundoval mu prof. Francesco Nicotra z milánské university jako zástupce UPACu. Symposia se zúčastnilo přes 1500 účastníků 70 národů. Vysoká účast byla zejména z asijských zemí. Program byl velmi bohatý a zahrnoval téměř všechny oblasti biotechnologií (lékařské, farmaceutické, rostlinné, potravinářské, průmyslové environmentální, genomiku, bioinženýrství, atd). Značná pozornost byla věnována i bioenergetice, včetně fermentace pentos. Bylo zde předneseno 330 přednášek a presentováno 1100 posterů. Symposium doprovázela řada pracovních setkání, workshopů, platform, společných projektů atd. Nemá cenu zde podrobně probírat celý program. Zájemcům doporučuji si od některého účastníka vypůjčit CD či přes platformu Elsevieru vyhledat abstrakta na Science Direct či si vypůjčit „Supplement“ Journal of Biotechnology.

MEZINÁRODNÍ ROK CHEMIE 2011 (INTERNATIONAL YEAR OF CHEMISTRY 2011)

Příští rok (2011) byl zvolen mezinárodním rokem chemie pod heslem „**Chemie – náš život, naše budoucnost**“ (**Chemistry – our life, our future**). Cílem této významné události je přiblížit široké veřejnosti a zejména mladým lidem na celé zeměkouli dosa- vadní úspěchy chemie a její příspěvek ke zlepšení život- ního standardu lidstva a naznačit její další perspektivy, kterými chemie může zlepšit život lidstva. Rok 2011 nebyl zvolen náhodně. Je to rok stého výročí udělení Nobelovy ceny paní Marii Curiové-Sklodowské (první chemičce) za objev prvků radia a polonia a za výzkum vlastností a složení těchto prvků. Marie Sklodovská sice získala svou první Nobelovu cenu již o osm let dříve, ale za fyziku, a to společně s Henrim Becquerem, za zásluhy ve výzkumu radioaktivního záření, ale rok

2011 je přece jen jejím výrazným oceněním v oblasti chemie. Mezinárodní rok chemie byl oficiálně vyhlášen na plenárním zasedání Organizace spojených národů již 19. 12. 2008. Jeho propagace se ujal prezident IUPACu Jung-Il Jin. Na jeho organizaci se rovněž podí- lejí UNESCO (Výchovná, vědecká a kulturní organizace OSN) a DESA (Úřad pro ekonomické a sociální záleži-losti). Úspěch mezinárodního roku chemie však bude jistě záležet na nejrůznějších akcích národních chemic- kých společností. Program akcí např. prezentuje na svých webových stránkách Americká chemická společnost. Američtí chemici také sepisovali petici na pamětní známku.

Další informace možno nalézt např. na www.chemistry2011.org, www.acs.org/iy2011.

MEZINÁRODNÍ JEDNÁNÍ O BIOLOGICKÉ BEZPEČNOSTI SKONČILA ÚSPĚŠNĚ

Hana Jiráková, Milena Roudná

Ministerstvo životního prostředí České republiky

Ve dnech 11. – 15. října 2010 se pod taktovkou hostitelského Japonska uskutečnilo Páté zasedání Konference smluvních stran Úmluvy o biologické rozmanitosti sloužící jako zasedání smluvních stran Cartagenského protokolu o biologické bezpečnosti (COP-MOP/5). Kongresové centrum v jednom z nejlidnatějších měst Japonska, kterým je Pacifikem omývaná Nagoya na ostrově Honšů, otevřelo své brány přibližně 1600 účastníkům tohoto vrcholného politického zasedání Cartagenského protokolu. Přítomni byli reprezentanti smluvních stran Cartagenského protokolu, organizací OSN, mezivládních a nevládních organizací, ale také akademické sféry a průmyslu. Prezidentem zasedání byl zvolen Hidenori Murakami, poradce ministra zemědělství, lesnictví a rybářství Japonska, kterému tuto funkci formálně předal Wolfgang Köhler, zástupce německého Spolkového ministerstva pro výživu, zemědělství a ochranu spotřebitele a prezident předchozího zasedání smluvních stran v jedné osobě. Japonsko tak převzalo dvouleté předsednictví od Německa, jež předsedalo Čtvrtému zasedání smluvních stran v roce 2008.

Co je Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti?

Tento Protokol byl sjednán v rámci Programu OSN pro životní prostředí pod Úmluvou o biologické rozmanitosti a vstoupil v platnost 11. září 2003 po jeho ratifikaci 50 státy. V současnosti má celkem 160 smluvních stran (tj. 159 států a Evropská unie). Česká republika jej ratifikovala jako jeden z prvních států v r. 2001.

Jedná se o mnohostrannou environmentální smlouvu stanovující pravidla bezpečného přeshraničního pohybu a využívání živých modifikovaných organismů, které jsou výsledkem moderních biotechnologií a které mohou mít nepříznivý dopad na zachování biologické rozmanitosti a zdraví člověka. Protokol zahrnuje princip předběžné opatrnosti, zavádí postup předchozího souhlasu před prvním záměrným přeshraničním pohybem živých modifikovaných organismů za účelem jejich záměrného uvedení do životního prostředí smluvní strany dovozu a dále mechanismy pro hodnocení a řízení rizik.

Zasedání COP-MOP je nejvyšším orgánem Protokolu a koná se v současné době pravidelně každé dva roky. Hlavní závěry a výsledky Pátého zasedání smluvních stran Cartagenského protokolu

COP-MOP/5 přijalo celkem 16 rozhodnutí, jež by měla přispět k dalšímu prohloubení implementace Protokolu. Za stěžejní úspěch zasedání lze bezesporu považovat **přijetí nového „Nagojsko-kualalumpurského dodatkového protokolu o odpovědnosti a náhradě škody ke Cartagenskému protokolu o biologické bezpečnosti“** (The Nagoya – Kuala

Lumpur Supplementary Protocol on Liability and Redress to the Cartagena Protocol on Biosafety). Jeho dojednání vycházelo ze znění článku 27 Cartagenského protokolu, který hovoří o nutnosti vypracovat mezinárodní pravidla a postupy v oblasti odpovědnosti a náhrady škod vzniklých přeshraničními pohyby živých modifikovaných organismů, a to do čtyř let od vstupu Cartagenského protokolu v platnost (tedy do roku 2008). Uvedený časový horizont se ukázal jako příliš ambiciózní, jelikož vnímání principu odpovědnosti a odškodnění smluvními stranami s charakterem rozvojových zemí bylo principiálně velmi odlišné od pohledu zemí vyspělých. Složitá mezinárodní jednání nakonec probíhala dlouhých 6 let a vyvrcholila 10. října 2010, doslova několik hodin před zahájením COP-MOP/5, kdy mezinárodní skupina vyjednávačů dospěla ke shodě nad diskutovaným textem. K formálnímu konsenzuálnímu přijetí nového protokolu došlo na závěrečném plenárním zasedání COP-MOP/5 dne 15. října 2010 a tento akt patřil k jednoznačně nejemotivnějším okamžikům celého zasedání, kdy přítomní delegáti vyjádřili spolupředsedům skupiny vyjednávačů, Jimeně Nieto z Kolumbie a Renému Lefebrovi z Holandska, své uznání bouřlivým potleskem.

Jak již bylo naznačeno, nový protokol zavádí pravidla řešení odpovědnosti za škody vzniklé na ochraně a udržitelném využívání biologické rozmanitosti, které mají svůj původ v přeshraničním pohybu živých modifikovaných organismů. Protokol je založen na principu správní odpovědnosti, tzn., že příslušné státní orgány jsou oprávněny vyžadovat na provozovatelích přijetí nápravných opatření, pokud dojde k definované škodě nebo i k bezprostřední hrozbě jejího vzniku. V řadě otázek se předpokládá aplikace vnitrostátního práva (např. u vymezení pojmu provozovatel, určení příčinné souvislosti mezi škodou a příslušnou činností, provádění nápravných opatření a další) a ve velmi omezené míře je řešena občansko právní odpovědnost. Nový protokol bude otevřen k podpisu od 7. března 2011 do 6. března 2012 v sídle OSN v New Yorku a vejde v platnost po jeho ratifikaci 40 smluvními stranami. Nutno podotknout, že pro Evropskou unii a potažmo Českou republiku v této souvislosti k legislativním změnám nedojde, jelikož již několik let je platná evropská směrnice o odpovědnosti za životní prostředí v souvislosti s prevencí a nápravou škod (2004/35/ES), která je v plném souladu s přijatým protokolem o odpovědnosti.

Mezi další významná rozhodnutí COP-MOP/5 patří **přijetí strategického plánu** činnosti pro období 2011 – 2020, který povede smluvní strany při alokaci finančních a lidských zdrojů pro schválené prioritní oblasti

Cartagenského protokolu. Jde o vůbec první dokument tohoto charakteru. Dosud se činnost Protokolu odvíjela od střednědobého plánu aktivit, jehož působnost končí v r. 2010. Úlohou strategického plánu je posilování globálních, regionálních a vnitrostátních opatření a kapacit na zajištění přiměřené úrovně ochrany v oblasti bezpečného přenosu a využívání živých modifikovaných organismů. Strategický plán specifikuje strategické a operativní cíle pro jednotlivé oblasti Protokolu s očekávanými dopady na tyto oblasti, včetně indikátorů hodnotící naplňování daných cílů.

COP-MOP/5 dále významně **posílilo úlohu a pravomoc Výboru pro kontrolu dodržování Cartagenského protokolu**. Tento Výbor měl dosud pouze velmi omezené možnosti zásahu proti, byť i zcela zjevným případům porušování povinností smluvních stran. Týká se to především povinnosti odezdávání národních zpráv, z nichž je možno vyčíst, jak jsou naplňována ustanovení Protokolu. Výbor musela dosud kontaktovat sama smluvní strana čelící problémům při plnění závazků vycházející z Protokolu a požádat o pomoc, což se ale dosud nestalo. Novým rozhodnutím bude moci Výbor zahájit aktivity vedoucí k nápravě i bez výzvy smluvní strany porušující Protokol. Nutno však zdůraznit, že úloha Výboru je výhradně pomocná, a nikoliv trestající.

Rozhodnutí o **vytváření kapacit** a navazující **finanční mechanismus** jsou důležitými body každého zasedání COP-MOP a páté zasedání nebylo žádnou výjimkou. Tato rozhodnutí by měla vytvářet základ pro spolupráci při rozvoji nebo posilování lidských zdrojů a institucionálních kapacit v oblasti biologické bezpečnosti v rozvojových zemích a zemích s přechodnou ekonomikou. Spolupráce zahrnuje vědeckou a technickou průpravu v oblasti správného a bezpečného řízení biotechnologií, stejně jako průpravu v hodnocení a řízení rizika a posílení technických a institucionálních kapacit v závislosti na dané situaci, schopnostech a požadavcích dané smluvní strany. Letošní rozhodnutí mj. poprvé od vstupu Protokolu v platnost reflektuje požadavek smluvních stran zahájit vytváření kapacit v oblasti výzkumu socio-ekonomických dopadů živých modifikovaných organismů na zachování a udržitelné využívání biologické rozmanitosti. Jelikož smluvní strany mají k uvedené problematice dlouhodobě velmi rozdílné postoje, přijetí tohoto rozhodnutí předcházela vypjatá diskuse, v rámci níž našly smluvní strany kompromisní řešení až na samém konci závěrečného plenárního zasedání COP-MOP/5.

Další důležité rozhodnutí bylo přijato pro oblast **hodnocení a řízení rizik**. Zasedání dalo zelenou pokračování práce skupiny technických expertů pro hodnocení a řízení rizik, která byla ustavena již v roce 2008 a jejímž úkolem bylo vypracovat schéma postupu hodnocení rizik živých modifikovaných organismů krok za krokem, vč. doporučení vhodných případových studií a dalších podkladových odborných materiálů. Toto schéma bylo určeno jako pomůcka zejména pro smluvní strany charakteru rozvojových zemí, které dosud

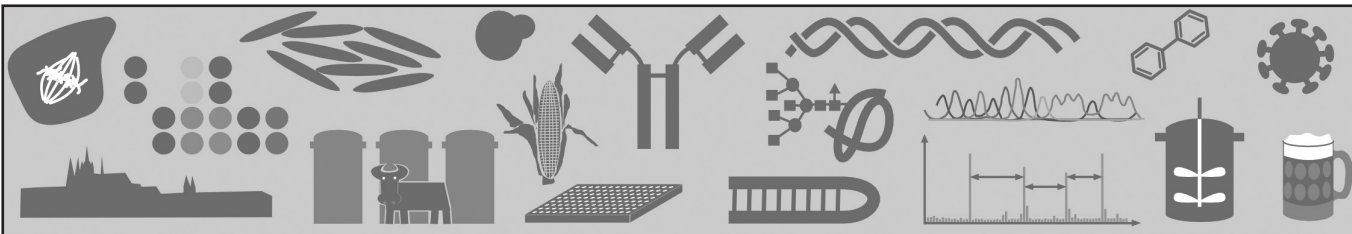
nemají vybudovaný vlastní legislativní a institucionální rámec pro tuto činnost. Jedním z nových úkolů pro uvedenou pracovní skupinu bude toto schéma revidovat a testovat na základě výsledků vědeckého oponentního řízení, kterému bude schéma podrobeno. Skupina také navrhne mechanismus (vč. kritérií) pro budoucí aktualizaci podkladových odborných materiálů a v neposlední řadě vypracuje další návody na postup pro hodnocení rizik vybraných skupin živých modifikovaných organismů. Vytvořené schéma a dokumenty budou přeloženy do šesti oficiálních jazyků OSN, aby byly použitelné pro co nejširší spektrum smluvních stran.

Rádcem i kritikem této početně omezené pracovní skupiny jsou online diskuzní fóra a online konference – platformy ustavené v roce 2008 na internetových stránkách Informačního systému biologické bezpečnosti <http://bch.cbd.int/>. Diskusí vedených v těchto online formátech se může zúčastnit každý registrovaný uživatel z řad odborné veřejnosti (registraci zprostředkuje národní kontaktní osoba pro Cartagenský protokol – Ing. Hana Jiráková, Ph.D., Ministerstvo životního prostředí, hana.jirakova@mzp.cz).

Další přijatá rozhodnutí podporující implementaci Protokolu se týkají např. Informačního systému pro biologickou bezpečnost (tzv. Biosafety Clearing-House); zkušeností s průvodní dokumentací a standardy pro nakládání, balení, přepravu a identifikaci LMO určených jako potraviny, krmivo či ke zpracování; informování a účasti veřejnosti; hodnocení účinnosti Protokolu a podávání národních zpráv a v neposlední řadě také rozpočtu, který byl pro následující roky 2011 – 2012 přijat v celkové výši 5 700 400 USD. Podrobné informace o veškerých výsledcích COP-MOP/5 naleznete na internetových stránkách Protokolu <https://www.cbd.int/mop5/>.

Samotné zasedání COP-MOP/5 bylo doplněno řadou **doprovodných akcí**, na nichž se mohly prezentovat nejen smluvní strany, ale také nevládní organizace, vědecké projekty či zástupci průmyslu. V budově konferenčního centra a v přilehlém areálu tak paralelně s jednáním probíhaly semináře, presentace a výstavy tematicky spojené s biologickou bezpečností a také s mezinárodním rokem biologické rozmanitosti, který aktuálně probíhá. Česká republika prezentovala zkušenosti s plněním projektu UNEP/GEF formou přednášky na akci organizované sekretariátem Úmluvy o biologické rozmanitosti (Milena Roudná; <http://bch.cbd.int/database/record-v4.shtml?documentid=101431>), vydaných publikací a formou posteru (Zuzana Doubková, Milena Roudná, Hana Jiráková) na výstavě v areálu zasedání.

Šesté zasedání smluvních stran Cartagenského protokolu se uskuteční na podzim roku 2012 v Indii. Průběh a výsledky právě ukončeného zasedání dávají tušit, že první zkušenosti s Nagojsko-kualalumpurským dodatkovým protokolem o odpovědnosti, dále hodnocení a řízení rizik a v neposlední řadě socio-ekonomické dopady živých modifikovaných organismů se stanou nejžhavějšími tématy pro budoucí směřování Protokolu.



Biotech 2011 & 5th Czech-Swiss Symposium with Exhibition



Prague, 15-17 June 2011



Scope of the conference

The symposium will promote collaboration in biotechnology research and development as well as in industrial activities. It will open a window on particular activities in the field of life sciences and identify synergies. As a platform for personal, scientific, technical and commercial contacts, the highly interactive event should foster new collaborations. Long-term close collaboration between Czech and Swiss biotechnologies will find also opportunity for fruitful continuation.

The programme is divided into four thematic sessions:

Biotechnology in Pharma

Biotechnology in Nutrition

Biotechnology for Sustainable Growth

Novel Approaches in Bioprocessing

During the event, institutions and companies will have the opportunity to exhibit and promote their latest technologies and achievements. Workshops strengthening the industry and academia relationships will be organized.

Forms of presentations

- ▶ oral presentation
- ▶ scientific poster presentation
- ▶ industrial and commercial poster presentation
- ▶ booths for commercial products presentation

Abstract submission

Deadline for abstract submission – 31 March 2011
On-line submission via www.biotech2011.cz

Social programme

Friday 17 June 2011

Evening Prague - sightseeing

Saturday 18 June, 2011

Excursion to Lonza Biotec and sightseeing in Kutná Hora

Post-symposium in Olomouc

Olomouc Biotech 2011

Plant Biotechnology: Green for Good

19-21 June 2011

www.cr-hana.eu/files/2011_biotech_olomouc.pdf



Conference venue

The conference will take place in newly built National Technical Library (NTL) in Prague 6 (www.techlib.cz).

Fees

	before 31 March 2011	after 31 March 2011
students	120 €	150 €
participants	250 €	300 €

Fee includes: opening session, welcome party, all symposium sessions, book of abstracts, list of participants, *Current Swiss Biotech Association Directory*, *Life Sciences in Czech Republic*, lunches and refreshments on Thursday and Friday, beer party on Thursday and company presentations.

Exhibition & Sponsoring

Biotechnological, pharmaceutical and food industries are invited for presentation. For details and possibilities see www.biotech2011.cz.

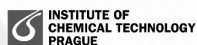
Contact

Biotech 2011 & 5th Czech-Swiss Symposium with Exhibition,
Institute of Chemical Technology, Prague
Technická 5, Prague 6, 166 28, Czech Republic

web: www.biotech2011.cz

e-mail: biotech2011@vscht.cz

Partners



THE ACADEMY
OF SCIENCES
OF THE CZECH
REPUBLIC



CZECHINVEST
Investment and Business Development Agency



Olomouc Biotech 2011

Plant Biotechnology: Green for Good

June 20 – 21, 2011

(postsymposium to the 5th Czech-Swiss Biotechnology Meeting in Prague, June 15 – 17, 2011)

VENUE:

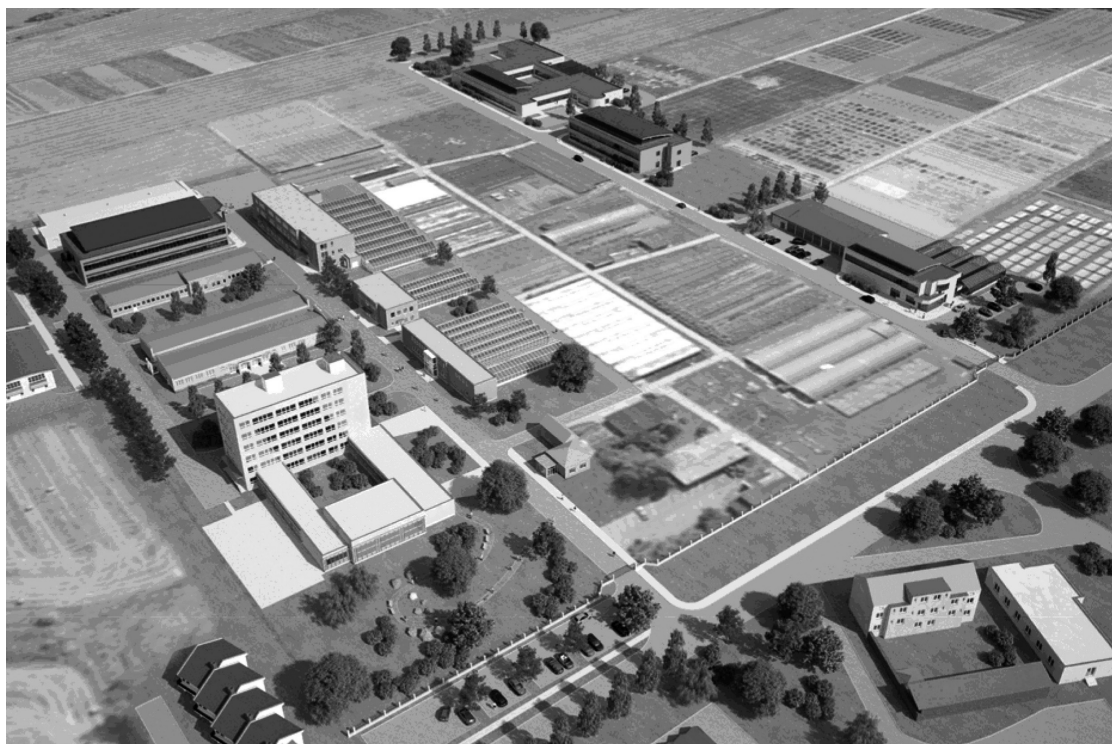
**Palacký University – Biological Center in Olomouc
– Holice and Science and Technology Park**

PROPOSED PROGRAM:

Mon June 20:	Morning	Registration
	Afternoon	Session Plant biotechnology I
	Evening	Industry and students get – together Student poster contest Welcome to Olomouc party
Tue June 21:	Morning	Session Plant biotechnology II
	Lunch	
	Afternoon	Visit to local traditional biotech company – A. W. curd cheese factory in Loštice (www.tvaruzky.cz) Free sightseeing in Olomouc (http://www.olomouc.eu/eng/)

CONTACT: Prof. Ivo Frébort

Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Faculty of Science
Palacký University in Olomouc
ivo.frebort@upol.cz, www.cr-hana.eu



Pozvánka do „Školy molekulárních biotechnologií – Profession“

Genové inženýrství a molekulární biotechnologie představují jeden z vrcholů v biologických technologiích a formují zcela nové průmyslové odvětví. Dynamika jeho vývoje a zejména ekonomické efekty nutně přitahují pozornost podnikatelů. Pracovníků, kteří by samostatně zvládli tyto nové netradiční postupy, není mnoho. Tomu odpovídá i jejich cena na trhu práce.

Univerzita Palackého připravila prostřednictvím Ústavu imunologie LF v rámci OP VK projekt, který zájemcům nabízí unikátní ucelený kurz, který bude syntézou teoretických poznatků zprostředkovaných vysokou školou, ale zejména praktických laboratorních metod v podmínkách podnikového výzkumu, s cílem přiblížit účastníkům moderní biotechnologické postupy, které jsou nerealizovatelné v limitech akademické laboratoře.

Základním cílem kurzu je získat praktické dovednosti na cestě od identifikace genů přes jejich izolaci a transfer do produkčních kmenů s využitím plazmidů a dále základní postupy pro izolaci a purifikaci vybraných proteinových produktů. To vše v podmínkách laboratoří i průmyslového poloprovozu.

Partnerem projektu je společnost Contipro Group s.r.o. Pro realizaci teoretické i praktické části projektu budou k dispozici její nově vybudované laboratoře a vybrané provozní úseky.

Projekt je koncipován tak, aby absolventům přiblížil podmínky aplikovaného výzkumu, především však usnadnil vstup do moderních podnikových laboratoří a provozů. Praktická zkušenost, možnost konzultací s odborníky a certifikace o absolvování kurzu budou hrát významnou roli v pracovní konkurenci.

Kurz je složen ze 2 hlavních částí:

- A)** Teoretická část v celkovém rozsahu 5 vyučovacích dnů. Počet účastníků této části není omezen. Teoretická část bude probíhat v prvním pololetí r. 2011 a bude rozdělena do dvou na sebe navazujících tematických okruhů přednášených jednak ve výukovém centru Contipro Group s.r.o. (I. část – 3.a 4. března 2011) a v olomouckých výukových centrech (II. část – 24., 25. a 26. března 2011).
- B)** Praktická část (stáž) bude realizována formou bloků v laboratořích partnera projektu společnosti Contipro Group s.r.o. v celkovém rozsahu **20** dnů v letním období 2011 podle individuální dohody s lektory. Termíny budou zveřejněny na webových stránkách projektu.

Obsahem kurzu jsou tři navazující tematické okruhy provázané se stáží ve výzkumných a vývojových laboratořích:

1. Molekulárně biologická část – od identifikace genu po přípravu produkčního mikroorganismu
2. Práce s biomasou – fermentační část
3. Ověření čistoty a charakteristika produktů – analytické metody

Kurz je určen především pro studenty VŠ. Podrobnosti, termíny, průběžné údaje vč. možnosti přihlášení na kurz najdete na webových stránkách projektu: www.skola-profession.cz

Projekt je podporován z fondů EU. Účast je proto bezplatná.

Garanti projektu: Prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc. (UP Olomouc); RNDr. Vladimír Velebný, CSc. (Contipro Group s.r.o.); Doc. MUDr. Milan Raška, Ph.D. (UP Olomouc); RNDr. Jaroslav Turánek, Ph.D. (VÚVL Brno).

TRANSGENNÍ ROSTLINY URČENÉ PRO FYTOREMEDIACE

Jitka Viktorová*, Martina Nováková, Martina Macková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, *jitka.prokesova@vscht.cz

Úvod do problematiky

V polovině 20. století došlo k rozsáhlému rozvoji průmyslu a zemědělství, byla provedena první syntéza a začalo se s výrobou detergentů. Později se řada z běžně používaných látek ukázala jako přírodě či zdraví škodlivá a omezila se nebo úplně zastavila jejich výroba. Je zapotřebí si však uvědomit, že určité negativní dopady na životní prostředí s sebou neodmyslitelně přináší téměř veškerá lidská činnost. Výsledkem nám zůstává rozsáhlá kontaminace životního prostředí, zejména pak půdy. Bohužel řada z kontaminujících látek jsou povahy perzistentní, což má za následek místně až kritické hladiny xenobiotik.

Existuje několik způsobů, jak odstranit kontaminanty z prostředí. Jedná se například o fyzikálně-chemické procesy, které jsou ale ve většině případů nákladné. A obecně veřejností hůře přijímané, protože jsou obvykle spojeny s devastací krajiny. Proto se pozornost v poslední době spíše obrací k přírodě bližším obranným mechanismům, mezi které patří využití mikroorganismů a rostlin. Při bioremediacích jsou používány bakterie, zejména z rodu *Pseudomonas*. Vhodné jsou ty, které využívají kontaminující látku jako jediný zdroj uhlíku i energie. Výhodou mikroorganismů je široký okruh degradačních schopností¹.

Proces fytořemediace znamená užití zelených rostlin k odstranění, akumulaci a metabolismu kontaminantů z životního prostředí nebo zmírnění jejich šíření². Je to využití vegetace k ošetření vody, půdy či vzduchu *in situ*³. Tímto způsobem mohou být odstraněny anorganické i organické polutanty. Některé druhy rostlin, které patří zejména do skupiny tzv. hyperakumulátorů jsou schopny v sobě kumulovat vysoké koncentrace těžkých kovů. Jako příklad můžeme uvést *Thlaspi caerulescens*⁴ (penízek modravý). Značnou nevýhodou těchto druhů rostlin je nízká produkce biomasy, protože se většinou jedná o pomalu rostoucí rostliny. Přes tuto nevýhodu by použití rostlin bylo užitečným nástrojem pro snížení koncentrace toxikantů v prostředí, neboť využití rostlin je veřejností dobře přijímáno už z estetických důvodů, protože obohacuje zamořenou a zdevastovanou oblast a není příliš nákladné, navíc nemá ničivý dopad na přírodu a není potřeba kontaminovaný materiál nikam přemísťovat⁵. Výhoda užití rostlin pro odstraňování toxikantů spočívá také v tom, že rostliny jako autotrofní organismy vyžadují jen skromný nutriční přísun⁵.

Přirozená fytořemediace je však proces velmi zdoluhavý a navíc závislý na řadě faktorů, jakými jsou klimatické a geologické podmínky, teplota, nadmořská výška, typ půdy a dostupnost zemědělského vybavení⁵.

Zároveň stoupá také snaha o rychlejší a účinnější odstranění polutantů. Proto se přistupuje k návrhu použití geneticky modifikovaných rostlin, které jsou odolnější či mají zvýšený fytořemediační potenciál. Transgenní rostliny jsou např. schopny akumulovat více sloučenin, mají vyšší rezistenci ke kontaminující látce nebo schopnost degradovat organické polutanty na méně toxické formy⁶. Výhodou také může být tvorba většího množství biomasy pro ukládání toxických látek, tvorba delších kořenů nebo výhodné agrotechnické charakteristiky, optimální pro danou klimatickou oblast.

Využití geneticky modifikovaných rostlin tak může významně přispět k udržení rovnováhy a zlepšení životního prostředí, ve kterém žijeme.

Fytořemediace anorganických látek transgenními rostlinami

Mezi anorganické polutanty patří zejména těžké kovy a jejich sloučeniny. V přírodě znamenají velké riziko zejména proto, že se kumulují v tukových tkáních živočichů, čímž se postupně zvyšuje jejich koncentrace v organismu, až dosáhne otravy. Z prostředí jsou odstraňovány pomocí přírodních rostlinných hyperakumulátorů, které však mají řadu již výše zmiňovaných nedostatků. Z těchto důvodů je snaha o využití hyperakumulátorů spíše jako zdrojů genů pro zvýšení účinnosti akumulace či rezistence k těžkým kovům. Tyto geny jsou pak použity v rostlinách, které mají lepší agronomické vlastnosti.

Jiná strategie spočívá v klonování genů pro transportní bílkoviny nebo genů pro enzymy zvyšující dostupnost polutantu. Například vysokoafinitní sulfátový přenašeč v rostlině *Stylosanthes hamata* se nachází v cytoplasmatické membráně. Gen tohoto přenašeče byl vnesen do *Brassica juncea* (brukev hořčičná sareptská), aby se tím zvýšila schopnost rostliny transportovat různé oxyanionty, wolfram a kadmium. Dalším příkladem mohou být ABC přenašeče reprezentující širokou skupinu transmembránových proteinů. Tyto proteiny váží ATP a používají jeho energii k transportu mnoha různých molekul skrz membránu, jimi odtékají i veškeré cytotoxické látky různých chemických struktur s rozmanitými biologickými aktivitami. Jejich klonování zvýšilo transport toxických iontů kovů do vakuol, čímž snížilo toxické účinky na rostlinu.

Další variantou jsou gsh enzymy (enzymy syntetizující glutathion), které hrají v rostlinách nepostradatelnou roli v detoxikaci těžkých kovů a produkty jejich reakcí jsou hlavními prekurzory fytochelatinů (peptidů vážících těžké kovy). Podobně metalothioneiny jsou proteiny bohaté na cystein, které mají velkou afinitu ke kationtům kadmia, mědi a zinku. Byly jedny

z prvních, jejichž geny se začaly využívat pro zvýšení fytoimediačních schopností rostlin v devadesátých letech minulého století. Genové inženýrství používá geny, podle kterých je peptid exprimován, např. z myši

(gen *MT1*), kvasinky (*CUP1*) nebo hrachu (*PsMTA*). V tabulce I jsou uvedeny příklady transgenů a transgenních rostlin se zvýšenou schopností akumulovat anorganické polutanty, které byly dosud připraveny.

Tab. I: Transgenní rostliny se zvýšenou schopností akumulovat anorganické polutanty

enzym	transgen	zdrojový organismus	cílová rostlina	polutant	výsledek transformace
lyasa, reduktasa ^{7, 8}	<i>merB</i> , <i>merA</i>	G ⁻ bakterie	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	organortuťné sloučeniny	přeměna toxických Hg(II) iontů na méně toxickou formu Hg(0)
γ -glutamylcysteinsynthetasa, glutathionsynthetasa ⁹	<i>gsh1</i> , <i>gsh2</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>B. juncea</i>	těžké kovy	zvýšená tolerance a akumulace Cd a Se
fytochelatinsynthetasa ^{10, 11}	<i>TaPCS1</i>	<i>Triticum</i> sp.	<i>N. glauca</i> , <i>A. thaliana</i>	těžké kovy	zvýšená tolerance k Pb a Cd, 100x vyšší produkce biomasy na médiu s arsenem
cysteinsynthetasa ¹²	<i>Atcys-3A</i>	rostlina	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	Cd, Se, Ni, Pb, Cu	9x vyšší tolerance ke Cd
ACC deaminasa ¹³	<i>ACC</i>	bakterie	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Cd, Co, Cu, Mg, Ni, Pb, Zn	zvýšená rezistence a akumulace
reduktasa ¹⁴	<i>FRO2</i>	<i>A. thaliana</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	Fe	redukce Fe(III) na Fe(II)
protein					
metallothionein ¹⁵	<i>MT1</i> , <i>CUP1</i> , <i>PsMTA</i>	myš, hrách, kvasinka	<i>N. tabacum</i> , <i>B. napus</i> , <i>A. thaliana</i>	kationty Cd, Cu a Zn	až 16x zvýšená tolerance k Cd, 8x k Cu
iontový přenašeč					
vakuolový přenašeč Mg, Zn ¹⁶	<i>AtMHX1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	Mg, Zn	tolerance
vakuolový přenašeč Ca, Cd, Mn ¹⁷	<i>AtCAX2</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	těžké kovy	zvýšená rezistence a akumulace
přenašeč Zn ¹⁸	<i>ZAT1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Zn	2x větší akumulace Zn v kořenech
přenašeč těžkých kovů ¹⁹	<i>ZntA</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	Zn, Pb	rezistence k Cd, Pb, Zn
přenašeč proteinů ²⁰	<i>YCF1</i>	kvasinka	<i>A. thaliana</i> , <i>Populus</i> sp.	Cd	rezistence k Pb a Cd, akumulace Cd
ABC přenašeč ²¹	<i>hMRP1</i>	člověk	<i>N. tabacum</i>	Cd, daunorubicin	zvýšený transport tox. iontů kovů
sulfátový přenašeč ²²	<i>SHST1</i>	<i>Stylosanthes hamata</i>	<i>B. juncea</i>	oxyanionty, W a Cd	zvýšená akumulace v kořenovém systému, nikoli ve výhoncích

Tab. II: Transgenní rostliny se zvýšenou schopností transformovat organické polutanty

enzym	transgen	zdrojový organismus	cílová rostlina	polutant	výsledek transformace
halogenalkandehalogenasa ²⁵	<i>dhA</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>N. tabacum</i>	chlorbutan	akumulace 1-chlorbutanolu
cytochrom P450 2E1 ²⁶	<i>CYP2E1</i>	savec	<i>N. tabacum</i>	trichlorethylen, dibromethylen, tetrachlor-methan, chloroform a vinylchlorid	zvýšení transformace trichlorethylenu až 640x
nitroreduktasa ²⁷	<i>nfs1</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>N. tabacum</i>	trinitrotoluen (TNT)	degradace či transformace 0,25 mM TNT během 50-ti hodin
pentaerytritol-tetranitrátreduktasa ²⁸	<i>onr</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	<i>N. tabacum</i>	pentaerytritol-tetranitrát, nitroglycerin, TNT	2x rychlejší degradace TNT a nitroglycerinu
enzym XplA ²⁹	<i>xplA</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>A. thaliana</i>	hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin	degradace výbušniny RDX
chlorkatechol-1,2-dioxygenasa ³⁰	<i>cbnA</i>	<i>Ralstonia eutropha</i> NH9	<i>O. sativa</i>	halogenaromáty	degradace 1,2,4- a 3-chlorbenzoové k.
extradioldioxygenasa ³¹	<i>dbfB</i>	<i>Terrabacter</i> sp.	<i>A. thaliana</i>	dibenzofuran	12x rychlejší degradace 2,3-dihydroxybifenyly
γ -glutamylcysteinsynthetasa ³²	<i>gshI</i>	bakterie	hybrid <i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i>	těžké kovy, chloracetanilidové herbicidy	vyšší množství γ -glutamylcysteinu a glutathionu
γ -glutamylcysteinsynthetasa resp. Glutathionsynthetasa ³³	<i>gshI</i> a <i>gshII</i>	nebyl uveden	<i>B. juncea</i>	kadmium, atrazin, metolachlor	zvýšená tolerance k alachloru
glutathion-S-transferasa I ³⁴	<i>gstI</i>	<i>Zea mays</i>	<i>N. tabacum</i>	chloracetanilidové herbicidy	podstatně vyšší tolerance k alachloru
organofosfáthydrolasa ³⁵	<i>OPH</i>	bakterie	<i>N. tabacum</i>	methylparathion	rezistence a degradace methylparathionu
cytochrom P450 ³⁶	<i>CYP1A1</i> , <i>CYP2B6</i> , <i>CYP2C19</i>	člověk	<i>O. sativa</i> , <i>S. tuberosum</i>	atrazin, metolachlor	degradace herbicidů i jejich směsy
atrazinchlorhydrolasa ³⁷	<i>atzA</i>	<i>Pseud.</i> sp.	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	atrazin	degradace atrazinu na hydroxyatrazin
cytochrom P450, CYP76B1 ³⁸	<i>CYP76B1</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i>	fenylmočovinné herbicidy	20x vyšší tolerance k Linuronu, 10x k Isoproturonu či Chlortoluronu
lakasa ³⁹	<i>flac</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>N. tabacum</i>	pentachlorfenol	degradace pentachlorfenolu a bisfenolu A
2,3-dihydroxybifenylyl-1,2-dioxygenasa ⁴⁰	<i>bphC</i>	<i>Pandorea pnomenus</i> LB400	<i>N. tabacum</i>	polychlorované bifenyly	degradace polychlorovaných bifenyly
bifenyldioxygenasa ⁴¹	<i>bphAE</i> , <i>bphF</i> , <i>bphG</i>	<i>Burkholderia xenovorans</i>	<i>N. tabacum</i>	polychlorované bifenyly	prokázána exprese jednotlivých genů v různých liniích

Fytoremediace organických látek transgenními rostlinami

Organické polutanty jsou látky širokého spektra rozmanitých struktur, vlastností a různých účinků na organismy. Mezi hlavní důvody jejich obtížné biologické degradovatelnosti patří polymerace struktur, substituce funkčními skupinami obsahujícími halogeny, dusík, síru ap., rozvětvení uhlovodíkového řetězce, hydrofobicita a s tím spojená obtížná biodostupnost.

Mezi významné organické kontaminanty prostředí patří zejména alifatické a aromatické uhlovodíky, polyaromáty, pesticidy a jejich metabolity, halogenované uhlovodíky, nitroaromáty, chloroaromáty, polychlorované bifenylly (PCB), ftalátové estery a nitrosaminy.

Alifatické uhlovodíky bývají růstovými substráty organismů, jejich odbourávání tedy probíhá v přírodě přirozeně. Obtížnější je to v případě navázání dalšího substituentu na uhlovodíkovém skeletu. Například v podobě halogenů nebo sloučenin dusíku. Tyto látky jsou pak častými kontaminanty životního prostředí a jejich odstranění je poměrně náročné.

Mezi aromatické uhlovodíky patří řada výbušnin, mnohé z nich jsou stále ještě používány. Značnou nevýhodou je jejich téměř naprostá biologická nerozložitelnost. Chlorované aromatické sloučeniny jsou ve velkém měřítku využívány jako herbicidy, pesticidy a rozpouštědla. Kontaminace půd těmito sloučeninami je velmi vážným ekologickým problémem, protože se jedná o látky většinou toxické a rezistentní k degradaci. Vliv pesticidů na přirozené fungování ekosystému a zdraví člověka bývá nepříznivý, proto je snaha o omezení užívání. Mezi nežádoucí důsledky nadměrného nebo nesprávného používání pesticidů patří hynutí včel, kontaminace povrchových vod, narušení nebo jejich kumulace v živých organismech (např. DDT, aldrin, endrin, toxafen atd.). Dnes se tedy u pesticidů kromě jejich okamžitých účinků zkoumá i postup jejich degradace a přenos v potravinovém řetězci²³.

Další skupinou jsou polychlorované bifenylly (PCB), což jsou chemicky stálé, tepelně odolné, přilnavé a nehořlavé sloučeniny. Zahrnují celkem 209 kongenerů s alespoň čtyřmi navázanými atomy chloru. PCB se začaly masově používat ve 30. letech 20. století jako běžná aditiva v barvách, lacích, hydraulických zařízeních, či teplonosných médiích. Byly náplní transformátorů, kondenzátorů a dalších zařízení. Podrobný toxikologický výzkum postupně odhalil, že zatímco akutní PCB je nízká, výrazně nebezpečnější je chronické vystavení nízkým dávkám, vzhledem k jejich schopnosti per-

zistence a bioakumulace především v tukách. Za nejvážnější jsou považována karcinogenní rizika. Dále bylo prokázáno, že mají nepříznivý účinek na výkon imunitního systému, poškozují játra a snižují plodnost. U savců se jako nejhorší jeví jejich vylučování mlékem, což představuje riziko pro další generace.

Pro odstranění organických látek z prostředí byly připraveny transgenní rostliny s geny bakterií, kvasinek, savců, ale i různých druhů rostlin. Většinou se jedná o geny zodpovědné za syntézu enzymů, které zvýší nebo zahájí degradaci organické látky na méně toxickou formu. Nejčastěji používanou metodou pro získání transgenních rostlin je infekce bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která vnáší část své DNA do rostlinného genomu. Tato technika je poměrně široce rozšířená, má však několik limitujících faktorů, které omezují její použití²⁴. Nicméně byla již s úspěchem použita např. u rostlin *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní), *Nicotiana tabacum* (tabák viržinský), *Oryza sativa* (ryže setá), *B. juncea*, *Solanum tuberosum* (lilek brambor), *Populus* sp. (topol) a jiných. V tabulce II jsou uvedeny příklady transgenů a transgenních rostlin se zvýšenou schopností transformace organických polutantů, které byly dosud připraveny.

Závěr

Fytoremediace je poměrně novou oblastí, ve které narůstá potřeba a snaha dalšího výzkumu. Tato oblast zahrnuje řadu oborů, ať už mikrobiologii, biologii, biochemii, zemědělství, fyziologii rostlin, genetiku či biotechnologii. Ovšem její největší předností je její snaha o zlepšení životního prostředí resp. o odstranění polutantů nebo alespoň zmírnění jejich šíření. Fytoremediace skloubená s genovým inženýrstvím pak dává možnost vzniku transgenních rostlinám, které mají nové nebo vylepšené vlastnosti.

Transgenních rostlin pro ochranu životního prostředí již byla zkonstruována celá řada (viz tab. I). Týkají se především hyperakumulátorů, u kterých se předpokládá spojení dvou výhod, a to vyšší akumulace těžkých kovů a současně tvorba většího množství biomasy. Transgenních rostlin určených pro vyšší účinnost přeměňovat organické polutanty bylo zatím připraveno mnohem méně než transgenních rostlin akumulujících těžké kovy (viz tab. II).

Avšak pro uvedení těchto „vylepšených“ rostlin do praxe ve velkém měřítku je nejprve zapotřebí změnit legislativu, překonat bariéry a změnit předsudky široké veřejnosti o geneticky modifikovaných rostlinách.

Literatura:

1. Debarati P, Gunjan P, Rakesh KJ, et al.: *BioEssays* 27, 563 (2005).
2. Cunningham SD, Berti WR, Huang JW, et al.: *TIBTECH* 13, 393 (1995).
3. Macek T, Macková M, Káš J, et al.: *Biotechnol. Adv.* 18, 23 (2000).
4. Brown SL, Chaney RL, Angle JS, et al.: *J. Environ. Qual.* 23, 1151 (1994).
5. Pulford ID, Watson C: *Environ. Int.* 29, 529 (2003).
6. Meagher RB: *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 153 (2000).
7. Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3182 (1996).

8. Chieh-Chen H, Meng-Wei C, Ju-Liang H, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 197 (2006).
9. Zhu Y, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, et al.: *Plant Physiol.* 119, 73 (1999).
10. Gisbert C, Ros R, Haro AD, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 440 (2003).
11. Li Y, Dhankher OP, Carreira L, et al.: *Plant Cell Physiol.* 45, 1787 (2004).
12. Dominguez-Soliz JR, Gutierrez-Alcala G, Vega JM, et al.: *J. Biol. Chem.* 276, 9297 (2001).
13. Grichko VP, Filby B, Glick BR et al.: *J. Biotechnol.* 81, 45 (2000).
14. Kärenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, et al.: *Environ. Pollut.* 107, 225 (2000).
15. Cherian S, Oliveira MM: *Environ. Sci. Technol.* 39, 9377 (2005).
16. Schaul O, Hilgemann DW, de Almeida-Engler J, et al.: *EMBO J.* 18, 3973 (1999).
17. Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, et al.: *Plant Physiol.* 124, 125 (2000).
18. Van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, et al.: *Plant Physiol.* 119, 1047 (1999).
19. Lee J, Bae H, Jeong J, et al.: *Plant Physiol.* 133, 589 (2003).
20. Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, et al.: *Nat. Biotechnol.* 21, 914 (2003).
21. Yazaki K, Yamanaka N, Masuno T, et al.: *Plant Mol. Biol.* 61, 491 (2006).
22. Lindblom SD, Ghany SA, Hanson BR, et al.: *J. Environ. Qual.* 35, 726 (2006).
23. <http://zpravodajstvi.ecn.cz/index.stm?x=207334>, staženo 30. března 2009.
24. Frančová K, Macek T, Demnerová K, et al.: *Chem. Listy* 95, 630 (2001).
25. Uchida E, Ouchi T, Suzuki Y, et al.: *Chem. Biol.* 39, 7671 (2005).
26. Doty SL, Shang TQ, Wilson AM, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6287 (2000).
27. Hannink N, Rosser SJ, French CE, et al.: *Nat. Biotechnol.* 19, 1168 (2001).
28. French CE, Nicklin S, Bruce NC, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2864 (1998).
29. Meagher RB: *Nat. Biotechnol.*; 24, 161 (2006).
30. Shimizu M, Kimura T, Koyama T, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4061 (2002).
31. Gullner G, Kömives T, Rennenberg H, et al.: *Exp. Biol.* 52, 971 (2001).
32. Flocco C, Lindblom S, Elizabeth A, et al.: *Int. J. Phytorem.* 6, 289 (2004).
33. Karavengeli M, Labrou NE, Clonis YD, et al.: *Biomol. Eng.* 22, 121 (2005).
34. Xiaoxue W, Ningfeng W, Jun G, et al.: *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 365, 453 (2007).
35. Kawahigashi H, Hirose S, Hayashi E, et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 74, 139 (2002).
36. Inui H, Ueyama Y, Shiota N, et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 64, 33 (1999).
37. Wang L, Samac DA, Shapir N, et al.: *Plant Biotechnol.* 3, 475 (2005).
38. Didierjean L, Gondet L, Perkins R, et al.: *Plant Physiol.* 130, 179 (2005).
39. Sonoki T, Kajita S, Ikeda S, et al.: *Environ. Biotechnol.* 67, 138 (2005).
40. Nováková M, Macková M, Chrástilová Z, et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 102, 29 (2009).
41. Mohammadi M, Chalavi V, Novakova-Sura M, et al.: *Biotech. Bioeng.* 97, 496 (2007).

Souhrn

Viktorova J., Nováková M., Macková M.: Transgenní rostliny určené pro fytořemediaci

Geneticky modifikované rostliny mohou být velmi účinnou alternativou k odstranění různých nebezpečných organických i anorganických polutantů. Tato xenobiotika jsou obvykle perzistentní a toxické povahy, často jsou jen velmi obtížně odstranitelná z životního prostředí. Přenos bakteriálních degradačních genů do rostlin může pomoci úspěšné a účinnější fytořemediaci. To se již potvrdilo řadou skutečněných přenosů. Tento článek shrnuje geneticky modifikované rostliny, které již byly připraveny a bylo u nich prokázáno odbourávání či akumulace xenobiotika a vyšší životaschopnost na toxickém substrátu ve srovnání s netransgenními liniemi.

Klíčová slova: fytořemediace, geneticky modifikované rostliny, organické a anorganické polutanty

Summary

Viktorova J., Nováková M., Macková M.: Transgenic plants intended for phytoremediation

Genetically modified plants can serve as highly efficient alternative for degradation of various dangerous organic as well as inorganic pollutants. These compounds are persistent toxic xenobiotics difficult to destroy or removal from the environment. The transfer of bacterial degradation genes into plant genome may help to successfull and efficient phytoremediation. It has been confirmed by transfer of the various genes. The article summarizes genetically modified plants, which were already prepared and where the degradation activity or accumulation of xenobiotic compounds and higher viability in the presence of toxic substrate was determinated.

Keywords: phytoremediation, genetically modified plants, organic and inorganic pollutants

POUŽITÍ ENZYMŮ V TEXTILNÍM PRŮMYSLU

Růžena Píchalová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Enzymy jsou biokatalyzátory, které díky své regio- a stereospecifitě nacházejí v současné době široké uplatnění v různých odvětvích průmyslu, kde nahrazují tradiční chemické procesy. Velkou výhodou enzymů je, že obecně nepředstavují žádnou hrozbu pro životní prostředí, jsou aktivní při mírné teplotě, pH a tlaku a jako všechny proteiny podléhají biodegradaci. Enzymově katalyzované reakce také téměř netvoří nadměrné množství vedlejších produktů¹.

V průmyslu tradičně používané rostlinné a živočišné enzymy byly v současnosti téměř nahrazeny enzymy mikrobiálními. Většina z nich je produkována pomocí rekombinantní DNA, což umožňuje pozměnit jejich substrátovou specifitu a současně zlepšit jejich stabilitu. Díky tomu dochází ke zvýšení výtěžků enzymově katalyzované reakce¹.

V textilním průmyslu jsou nejvíce využívány tyto enzymy (viz obr. 1): α -amylasa (odstranění škrobového pojidla, tzv. desizing), pektinasa (vypírání hydrofobních a jiných necelulosových složek bavlny, tzv. scouring), cellulasa (tvorba „použitého“ vzhledu džínovin, tzv. biostoning; potlačení tvorby chlupů a žmolků, tzv. biopolishing), laccasa (bělení džínoviny) a katalasa (ukončení bělení tkanin)².

Desizing

V průběhu tkaní jsou jednotlivá vlákna tkaniny mechanicky namáhána, a proto musí být nejdříve zpevněna potažením ochrannou vrstvou, aby se zabránilo jejich poškození. Tato vrstva je u tkanin z bavlněných

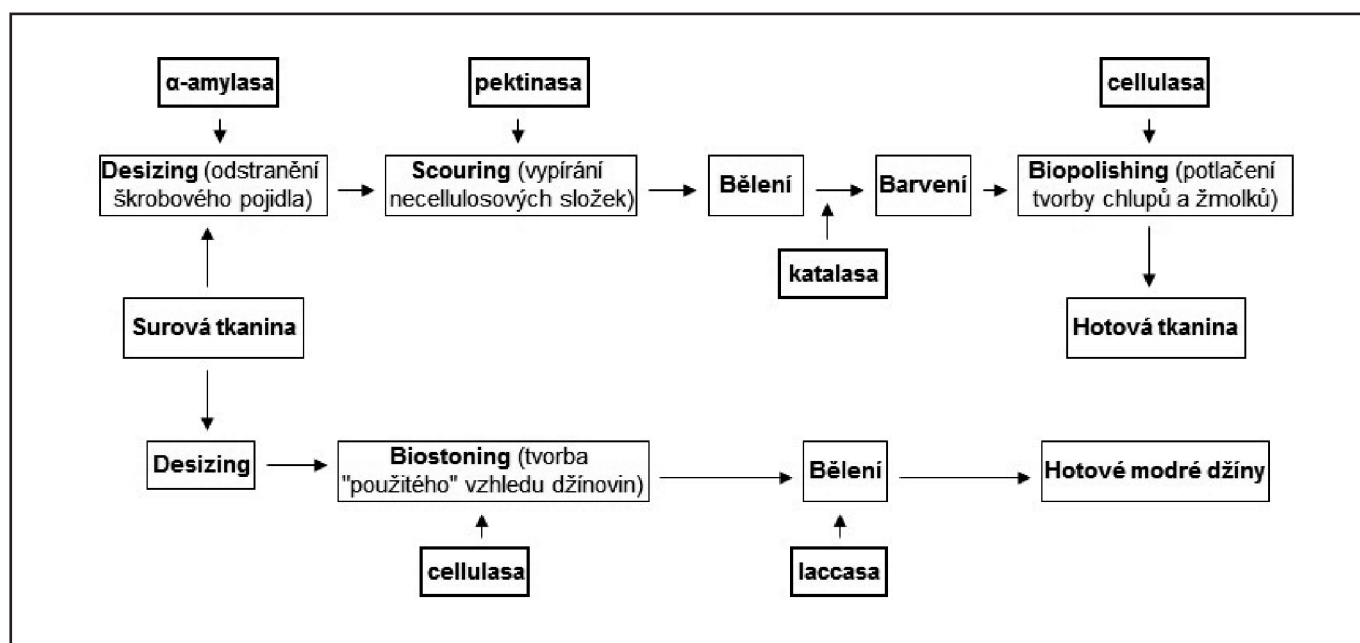
směsí tvořena nejčastěji přírodním nebo modifikovaným škrobem, který bývá kombinován s polymery, jako jsou polyvinyl alkohol (PVA) a karboxymethyl cellulosa (CMC). Dále může obsahovat i malé množství tuků a olejů, které během tkaní snižují tření na povrchu vláken. Ochranná vrstva vláken však způsobuje jejich neschopnost absorbovat vodu, barviva a jiná činidla, a tudíž po dokončení procesu tkaní musí být tato vrstva odstraněna⁴. To se děje pomocí enzymů α -amylasy a lipasy v procesu zvaném desizing^{2, 4}.

α -amylasa (EC 3.2.1.1)⁵ je hydrolasa, která štěpí α (1 $\rightarrow$ 4) glykosidovou vazbu uvnitř polysacharidového řetězce škrobu v ochranné vrstvě vláken za vzniku rozpustných malto-oligosacharidů. α -amylasa je produkována bakterií *Bacillus amyloliquefaciens*, je termostabilní a na rozdíl od tradičního chemického procesu odstranění škrobového pojidla (použití oxidačního činidla, amonium persulfát nebo peroxid vodíku, při vysoké teplotě a pH) nepoškozuje pevnost vlákna tkaniny v tahu^{2, 4}.

Obsahuje-li ochranná vrstva vlákna také triacylglyceroly (TAG), je nutné pro její odstranění použít kromě α -amylasy i lipasu (EC 3.1.1.3)⁵, která TAG štěpí, a tak napomáhá úplnému odstranění této vrstvy. Tkanina získaná tímto procesem má lepší sací schopnosti a je více odolná vůči vzniku proužků a trhlin při dalším zpracování².

Scouring

Tzv. scouring je proces, během kterého dochází ke zvýšení savosti a bělosti bavlněných tkanin díky



Obr. 1: Enzymy používané v textilním průmyslu³.

odstranění necelulosových přírodních složek z bavlněných vláken, tj. tuků, vosků, pektinů a proteinů. Voskové složky a pektiny jsou zodpovědné za hydrofobní vlastnosti surové bavlny, a proto účinnost tzv. scouring procesu přímo ovlivňuje účinnost navazujících kroků (bělení, barvení, biopolishing). Necelulosové složky se tradičně odstraňují varem s alkalickým činidlem, což způsobuje nejen velkou spotřebu tohoto činidla, nutnost zařadit promývací krok, který uvolňuje do odpadních vod látky poškozující životní prostředí, ale i srážení tkanin a změny v jejich mechanických vlastnostech^{6, 7}.

V současné době se již používá alternativní ekologická enzymová metoda^{6, 7, 8}, která využívá pektinasy (EC 3.2.1.15)⁵. Pektinasa štěpí pektin za vzniku menších, ve vodě rozpustných, sloučenin při mírných podmínkách, a proto napomáhá odstranění vosků, olejů a jiných nečistot z vláken tkaniny. Použitím pektinasy dochází ke snížení spotřeby vody a energie a zisku jemnějších tkanin^{6, 8}.

Biostoning a biopolishing

V obarvené džínovině jsou molekuly barviva (indigo) navázané na povrch nití a krátká bavlněná vlákna na povrchu tkaniny, a proto lze jejím opakovaným praním dosáhnout velmi oblíbeného „sepraného“ a „použitého“ vzhledu. V továrnách na textil byla džínovina tkaná do velmi těsných struktur, ve kterých bylo indigo silně vázáno na škrob, a proto byla džínovina sice velmi pevným a odolným materiálem, ale zároveň nepohodlným, dokud byl nový. Proto byla na konci 80. let 20. století zavedena v textilním průmyslu nová metoda, tzv. stone-washing. Džínové oděvy byly prány s pemzou, která částečně odstraňovala barvivo a odhalovala světlý vnitřek nití, a tím způsobovala vybledlý a „opotřebovaný“ vzhled džínových oděvů^{2, 9}.

V polovině 90. let 20. století byl do praxe zaveden alternativní postup využívající mikrobiálního enzymu cellulasy (EC 3.2.1.4)⁵, tzv. biostoning⁹. Během tohoto procesu cellulasa odštěpuje malé konce vláken na povrchu nití, čímž uvolňuje indigo, které lze poté snáze odstranit mechanickým opotřebováním džínoviny během pracovního cyklu. Výhody nahrazení pemzy cellulasou jsou značné: menší poškození praček a kratší doba procedury, pokles množství poškozených oděvů, bezpečnější pracovní podmínky, ušetření životního prostředí pemzového prachu a v neposlední řadě i možnost automatizace celého procesu¹⁰.

Většina přírodních materiálů používaných při výrobě tkanin obsahujících celulosová vlákna, např. bavlna, len a viskosa, má tendenci vytvářet na svém povrchu chlupy a žmolky, což je považováno za jejich značnou nevýhodu. Zabránění tvorbě chlupů a žmolků nebo jejich trvalé odstranění pomocí cellulasy v procesu zvaném biopolishing proto vede ke zvýšení komerční hodnoty celulosových vláken a k produkci vysoce kvalitních oděvů. Enzym cellulasa působí na malá koncová vlákna, která vyčnívají z povrchu tkaniny, a mechanický proces praní tato vlákna odstraňuje a zároveň leští

tkaninu. Hlavními výhodami použití cellulasy jsou: odstranění krátkých vláken a povrchových žmolků, hladký a lesklý vzhled tkanin a sjednocení jejich barvy, vysoká hydrofilita a absorpce vlhkosti a šetrnost k životnímu prostředí¹⁰.

Bělení džínoviny

Světlá a „opotřebovaná“ místa na modré, indigem barvené, džínovině získaná použitím cellulasy (biostoning) nebo pemzy (stone-washing) jsou dále bělena zejména pomocí silného oxidačního činidla chlornanu sodného. Ačkoliv je tento chemický proces velmi jednoduchý, levný a dobře reprodukovatelný, má i řadu nevýhod. Mezi ně patří zejména možné podráždění a zápach z neutralizačních produktů, které nebyly z džínoviny dostatečně odstraněny, značné poškození vláken džínoviny a jejich zpětné obarvování a v neposlední řadě i specifický odstín chlornanem běleného indiga, který ne vždy vyhovuje módním trendům¹¹. Proto je v současné době stále více používána alternativní enzymová metoda využívající oxidoreduktasu laccasu¹¹ (EC 1.10.3.2)⁵.

Laccasa během procesu bělení působí výhradně na molekuly indiga, a tudíž minimalizuje poškození vláken džínoviny. Bělení indiga pomocí laccasy je jednoduchý, ekologický a snadno reprodukovatelný proces, který dosahuje velmi oblíbených a atraktivních světle barevných, do šedé jdoucích odstínů na modré džínovině^{2, 11}.

Bělení ostatních tkanin

Surové bavlněné tkaniny jsou většinou běleny peroxidem vodíku, který musí být před procesem barvení tkaniny odstraněn, aby nedocházelo k jeho reakci s použitým barvivem. Peroxid vodíku se tradičně odstraňuje buď mnohonásobným propíráním bělené tkaniny s vodou nebo přidáním mírného redukčního činidla (např. thiosulfát sodný), které vede k neutralizační reakci. V obou případech se spotřebovává velké množství vody (až 40 l/kg tkaniny)¹².

Alternativní enzymová metoda¹², tj. rozklad peroxidu vodíku katalasou (EC 1.11.1.6)⁵, je jednoduchý a rychlý postup, který může být použit přímo po ukončení procesu bělení. Jeho nespornou výhodou je, že nevyžaduje žádný promývací krok. Bělící činidlo je během něj zcela rozloženo katalasou a zbytky tohoto enzymu nemají žádný vliv na textilní vlákna a barvicí činidla. Katalasa je aktivní při mírné teplotě, a proto na rozdíl od thiosulfátu sodného nevyžaduje zahřívání bělicího roztoku, což vede ke značné úspoře energie. Alternativní enzymová metoda je tudíž na rozdíl od klasické chemické cesty mnohem šetrnější k životnímu prostředí, protože vede ke značnému snížení produkce odpadních vod a spotřeby energie, netvoří vedlejší produkty a urychluje celý proces bělení^{2, 12}.

Závěr

V současné době našla v textilním průmyslu uplatnění celá řada enzymů. Jejich hlavním přínosem je, že

ve srovnání s klasickými chemickými postupy mají mnohem nižší spotřebu energie a vody, jsou šetrnější ke tkaninám a životnímu prostředí a použité enzymy

jako proteiny podléhají biodegradaci. Využití enzymových metod nejen v textilním průmyslu proto představuje obrovský potenciál pro budoucnost.

Literatura:

1. Saha BC, Bothast RJ, Jordan DB: Enzymes, Industrial (Overview), p. 281-294. In *Encyclopedia of Microbiology* (Schaechter M, eds.), Elsevier, Oxford (2009).
2. Rowe HD: *J. Consum. Stud. Home Econ.* 23, 53 (1999).
3. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 345 (2002).
4. <http://www.p2pays.org/ref/10/09230.htm>, staženo 1. 12. 2010.
5. www.brenda-enzymes.org, staženo 1. 12. 2010.
6. Tzanov T, Calafell M, Guebitz GM, Cavaco-Paulo A: *Enzyme Microb. Technol.* 29, 357 (2001).
7. Etters JN, Husain PA, Lange NK: *Text. Asia.* 5, 83 (1999).
8. <http://www.kenencoregroup.com/textile-enzymes-bio-scouring.html>, staženo 2. 12. 2010.
9. Bhat MK: *Biotechnol. Adv.* 18, 355 (2000).
10. Galante YM, De Conti A, Monteverdi R: Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry, p. 311-326. In *Trichoderma & Gliocladium – Enzymes, biological control and commercial applications* (Harman GF, Kubicek CP, eds.), vol. 2, Taylor & Francis, London (1998).
11. http://www.cht.com/cms/cht/cht.nsf/id/pa_dtag74udrl.html, staženo 2. 12. 2010.
12. <http://www.p2pays.org/ref/10/09235.htm>, staženo 2. 12. 2010.

Souhrn

Píchalová R.: Použití enzymů v textilním průmyslu

Enzymy jako biokatalyzátory nacházejí široké uplatnění nejen v textilním průmyslu, kde nahrazují tradiční chemické postupy. Jejich výhodou je, že jsou aktivní při mírné teplotě, pH a tlaku a jako proteiny podléhají biodegradaci. Enzymové metody mají ve srovnání s klasickými chemickými postupy nižší spotřebu vody a energie a jsou šetrnější ke tkaninám a životnímu prostředí. V současné době se v textilním průmyslu používá α -amylasa, lipasa, pektinasa, cellulasa, laccasa a katalasa.

Klíčová slova: průmyslové enzymy, textilní průmysl, desizing, biostoning, biopolishing, scouring, bělení džínoviny, bělení tkanin.

Summary

Píchalová R.: Application of enzymes in textile industry

Enzymes replaced numerous conventional chemical processes not only in textile industry. They can be used under moderate conditions of temperature, pH and pressure and the proteins themselves are biodegradable. Comparing their application to the traditional chemical processes they reduce water and energy consumption, avoid chemical fibre damage and are environmentally friendly. The most commonly used enzymes in textile industry are: α -amylase, lipase, pectinase, cellulase, laccase and catalase.

Key words: industrial enzymes, textile industry, desizing, biostoning, biopolishing, scouring, bleaching.

FARMAKOGENETIKA A FARMAKOGENOMIKA ANEB FARMAKOTERAPIE ŠITÁ NA MÍRU

Dita Mušálková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, dita.musalkova@gmail.com

Úvod

Významným problémem současné medicíny je vysoká různorodost odpovědi jednotlivců na podávání léčiv, které může vést k nežádoucím účinkům, projevům toxicity či absenci terapeutického účinku. Nemožnost předpovídat reakci na podané léčivo vede ke standardizovanému dávkování, které není optimální pro každého. Na farmakoterapii má totiž vliv řada faktorů, například snížení renálních nebo jaterních funkcí, probíhající onemocnění, interakce léků, věk, životní styl, strava, atd. Avšak významným zdrojem

variability účinků léčiv jsou genetické faktory, které ovlivňují vstřebávání, metabolismus a eliminaci léčiv, a tím predisponují jedince k charakteristické odpovědi na léčbu.

Vztahem mezi genetickou dispozicí jedince a účinkem podávaných léčiv se zabývá farmakogenetika a farmakogenomika. Tyto pojmy jsou často používány synonymně, ale farmakogenetika se zabývá spíše vlivem jednotlivých genetických polymorfismů, zatímco farmakogenomika zkoumá daný vztah na úrovni celého genomu (resp. transkriptomu). Cílem farmakogeno-

miky je individualizovaná medicína, která na základě genetických testů dokáže zvolit vhodný typ a dávku farmaka.¹

Letmý pohled do historie

Pozorování odlišností v reakci na podané léčivo jsou nejspíš tak stará, jako je používání léčiv samotné. Jedno z prvních farmakogenetických zjištění je připisováno Pythagorovi, který si všiml, že někteří lidé po požití syrových bobů rostliny *Vicia faba* onemocní (tzv. favismus), zatímco jiní nikoli.² Podstata tohoto jevu byla objasněna až za 2400 let. Jedná se o defekt enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, který po pozření těchto bobů, stejně jako po podání antimalarika primachinu, kyseliny acetylsalicylové, fenacetinu nebo sulfonamidů vede k hemolytické anémii.

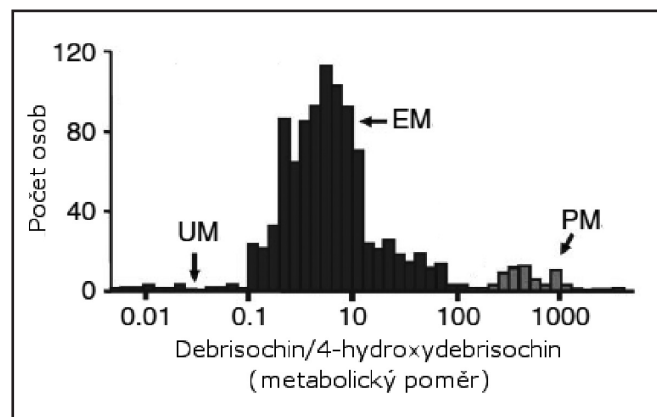
V roce 1902 při zkoumání alkaptonurie Sir Archibald E. Garrod předložil hypotézu, že příčinou vedlejších účinků léčiv jsou vrozené odlišnosti v biochemických procesech.³

Teprve v padesátých letech 20. století ale dochází k ustavení farmakogenetiky jako takové, když jsou popsány tři případy farmakogenetických interakcí. První z nich je zmíněná hemolytická anémie po podání primachinu, druhá je protrahovaná apnoe po podání svalového relaxantu sukcylnylcholinu v důsledku změněné kinetiky butyrylcholinesterasy a třetí je pomalá acetylace antituberkulotika isoniazidu v důsledku mutace genu *N*-acetyltransferasy 2 vedoucí k periferní neuropatii.⁴

Samotný pojem „farmakogenetika“ byl použit Friedrichem Vogelem v roce 1959 a v roce 1997 se poprvé objevuje termín „farmakogenomika“. Jedná se tedy o velmi mladý vědní obor, který ale má své specializované časopisy (The Pharmacogenomics Journal, Pharmacogenetics and Genomics) a databáze (PharmGKB).

Biotransformace léčiv

Nejčastější genetickou příčinou variability farmakokinetických vlastností léčiv jsou variace v nukleotidové sekvenci genů jaterních enzymů – tzv. polymorfismy.



Obr. 1: Farmakogenetika CYP2D6. 1011 osob je zde rozděleno na základě metabolického poměru na pomalé metabolizátory (PM), extenzivní metabolizátory (EM) a ultrarychlé metabolizátory (UM).⁴

Přítomnost polymorfismu v genu může pozměnit enzymovou aktivitu nebo může vést i k úplnému deficitu, pokud je zcela zabráněno vzniku funkčního enzymu. Lidé s kompletním deficitem jsou označováni jako pomalí metabolizátoři. Jestliže je defekt metabolické cesty nekompletní, jedná se o intermediární rychlost metabolismu. Méně často vzniká ultrarychlý typ metabolismu, který je způsoben neobvykle vysokým množstvím plně funkčního enzymu. Jestliže v genu nejsou přítomny funkčně významné polymorfismy, jde o rychlý (extenzivní) typ metabolismu, což se považuje za „normu“ v populaci (obr. 1).⁵

Dostupná farmakogenetická vyšetření

Existují dvě základní metody určení aktivity enzymů, které se podílejí na biotransformaci léčiv. Jedná se o stanovení fenotypu nebo genotypu. Při stanovení fenotypu, tj. aktuální aktivity enzymu, je podána jedna dávka modelového léčiva, které je metabolizováno pouze tím enzymem, který stanovujeme. Jako parametr aktivity enzymu se potom používá tzv. metabolický poměr (poměr podané látky a jejího metabolitu). Pro specifické proteiny cytochromu P450 se používají např. kofein, warfarin, aj.⁵ Při stanovení genotypu je aktivita enzymu stanovována nepřímo, prostřednictvím detekce mutací v genu příslušného enzymu. Stanovení genotypu a fenotypu není zcela ekvivalentní. Zatímco genotyp pacienta se po celý jeho život nemění, aktuální aktivita enzymu osciluje a je závislá i na jiných než genetických faktorech.

V současnosti je dostupná jen hrstka farmakogenetických vyšetření. Jedním z prvních enzymů, pro které je k dispozici komerčně vyráběný genetický test (firmy Prometheus), je thiopurin *S*-methyltransferasa (TPMT). Tento jaterní enzym se podílí na metabolismu thiopurinů (např. azathioprinu a 6-merkaptopurinu), což jsou látky používané jako imunosupresiva a k léčbě neoplazií. TPMT je přeměňuje na neaktivní a netoxické metabolity. U pacientů s deficiencí TPMT (vyskytuje se s incidencí 1:300) byly popisovány fatální myelosuprese způsobené vysokými koncentracemi účinných metabolitů – thioguaninových nukleotidů. Proto se v současné době před zahájením léčby substráty TPMT doporučuje u všech pacientů farmakogenetické vyšetření, které detekuje jednobázové polymorfismy v genu *tpmt*, a na jehož základě může být upravena léčebná dávka.⁶

Mezi další farmakogenetické testy patří testování receptoru HER2 pro trastuzumab (Herceptin), translokace BCR-ABL pro imatinib (Gleevec), receptoru EGF pro gefitinib a erlotinib, testování genu dihydropyrimidin-dehydrogenasy (*dpg*) pro 5-fluorouracil a několik dalších.⁷

Nejdůležitějším polymorfním enzymovým systémem metabolizujícím léčiva je rodina proteinů P450. Tyto enzymy vznikají v játrech a oxidují cizí chemické látky. Z 57 genů enzymů P450 byly identifikovány tři (*cyp3A4*, *cyp2D6* a *cyp2C9*), které mají obzvláště velký význam při metabolismu léčiv. Vliv polymorfismů

na aktivitu CYP2D6 byl objeven už v sedmdesátých letech 20. století, kdy byl studován účinek antihypertensiva debrisočinu. Tuto látku si vzali i členové laboratoře, a když vedoucí laboratoře zkolaboval kvůli vážné hypotenzi, byla provedena studie, která vedla k objevení CYP2D6.⁸ Dalším příkladem je kodein, jehož schopnost tišit bolest je závislá na oxidaci na morfin pomocí CYP2D6. U 10 % lidí s určitým polymorfismem kodein vůbec nepomáhá, protože není dostatečně oxidován. Stejně tak na polymorfismech *cyp2D6* závisí i účinnost antidepresiv, jako je např. Prozac.

S-warfarin je metabolizován enzymem kódovaným genem *cyp2C9* a u malé části pacientů s polymorfismem snižujícím jeho aktivitu může vzniknout velmi vážné krvácení, pokud se nesníží dávka léčiva.⁹ Polymorfismus *cyp2C9* je významný také pro metabolismus antidiabetika tolbutamidu, který u pomalých metabolizátorů způsobuje hypoglykemie. V osmdesátých letech byl dokonce z trhu stažen lék perhexilin, který byl u vzácných případů polymorfismu *cyp2D6* toxický pro játra a nervy.¹⁰

Bylo odhadnuto, že zhruba 80 % nežádoucích účinků souvisí právě s polymorfismy enzymů P450. Proto se několik firem zabývá výrobou DNA mikročipů sloužících k jejich identifikaci a některé nemocnice je již začínají používat.

AmpliChip CYP450

Ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze byla 15. června 2005 uvedena do provozu diagnostická metoda AmpliChip CYP450 (firmy Affymetrix a Roche), která slouží při volbě léčby a individualizaci terapeutické dávky léků metabolizovaných převážně produkty genů *cyp2D6* a *cyp2C19*. Jedná se o první farmakogenetický čip na světě, který je určen pro využití v běžné lékařské praxi.

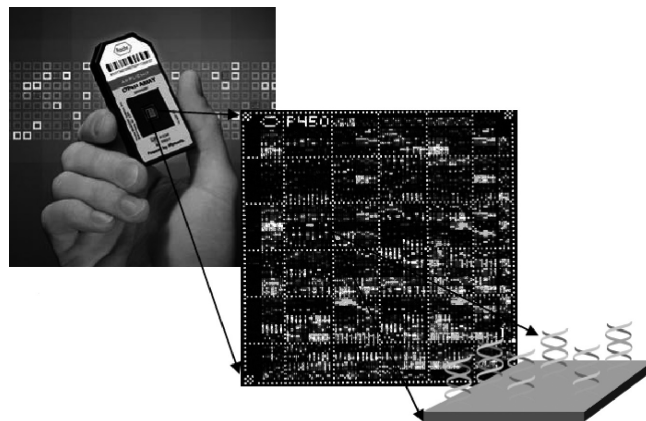
Dvě metabolické cesty, související s produkty genů *cyp2D6* a *cyp2C19*, se podílejí na odbourávání asi 30 % běžně používaných léčiv, jako jsou např. některé betablokátory, antiarytmika, antidepresiva, antipsychotika, analgetika nebo inhibitory protonové pumpy. Oba dva geny jsou funkčně polymorfní, což znamená, že v populaci nacházíme tzv. pomalé, střední, rychlé i ultrarychlé metabolizátory (u CYP2D6).¹¹

U pomalých metabolizátorů, jejichž výskyt je v naší populaci cca 3 – 8 %, lze obecně očekávat značnou kumulaci léčiv v organismu a rozvoj projevů toxicity a nežádoucích účinků. Naopak u ultrarychlých metabolizátorů, jejichž výskyt je u CYP2D6 2 – 3 %, koncentrace léčiv nedosahuje terapeutické koncentrace, a proto se nedostavuje ani požadovaný účinek léčby.⁵

Diagnostický postup AmpliChip CYP450 vychází z detekce 29 polymorfismů v genu *cyp2D6* (včetně duplikace a delece genu) a 2 hlavních polymorfismů v genu *cyp2C19*. Pomocí metody PCR je namnožen příslušný úsek DNA purifikované z analyzované lidské krve. Fluorescenčně značené fragmenty DNA se na základě komplementarity bazí hybridizují se specifickými jednořetězcovými oligonukleotidy (sondami)

na čipu, který má rozměry cca 1,5 x 1,5 cm (obr. 2). Čip se poté oskenuje a digitální obraz je zpracován a vyhodnocen počítačovým programem, který ve výsledné zprávě uvádí i předpokládaný fenotyp.

Limitujícím faktorem pro větší rozšíření tohoto testu je prozatím jeho poměrně vysoká cena (350-400 USD za čip) a především pořizovací cena vlastního systému firmy Affymetrix.



Obr. 2: AmpliChip CYP450¹²

Využití farmakogenomiky

Výše uvedené testy se specializují na stanovení polymorfismů určitého genu, respektive aktivitu určitého enzymu. Nicméně, celkový efekt většiny léčiv není ovlivněn jenom jedním genem, ale souhrou mnoha genů, které kódují proteiny zapojené do metabolismu a transportu léčiv a jejich receptory. Například vysoká oxidační aktivita enzymů cytochromu P450 spojená s nízkou konjugací aktivitou glukuronyltransferasy může mít za následek přítomnost vyššího množství toxických metabolitů. Tímto jevem se zabývá již zmiňovaná farmakogenomika, která se snaží identifikovat rozhodující činitele při odpovědi na podání léčiva, přičemž využívá informací z projektu Lidského genomu a pokroků v technologiích (mikročipy) a bioinformatice. Spojení genomických testů a především řádné fenotypizace pacientů je nezbytné pro určení povahy většiny účinků léčiv.¹³ Od farmakogenomiky se očekává, že pomůže identifikovat nové cíle pro léčiva a pomůže vyvinout léčiva, která budou cílená pro určité jedince s definovaným genetickým profilem. Díky farmakogenomice bude možné zachránit některá léčiva ve vývoji před jejich stažením, protože bude možné identifikovat jedince, u kterých se může objevit nežádoucí toxický účinek léčiva.^{14, 15}

Jako příklad zde může být uvedeno antiepileptikum felbamát. Toto léčivo bylo testováno na relativně malém souboru méně než 2000 lidí, a protože nemělo žádné vedlejší účinky, bylo v roce 1993 v USA schváleno. Během roku ho začalo brát více než 100 000 lidí, z nichž 34 získalo aplastickou anémii (13 úmrtí) a 23 utrpělo selhání jater (5 úmrtí). Tyto závažné události vedly k významnému omezení použití felbamátu či k odebrání licence, což zname-

nalo obrovskou ztrátu investic a času vloženého do vývoje tohoto léku, ale hlavně ztrátu důležitého antiepileptika, které by u drtivé většiny lidí dobře a bezpečně fungovalo.⁸

Závěr

Podle získaných údajů způsobují např. v USA nežádoucí účinky léků hospitalizaci přibližně dvou milionů pacientů a mají za následek 100 000 úmrtí ročně. Jsou čtvrtou až šestou nejčastější příčinou úmrtí.¹⁶ V evropských zemích jsou zodpovědné za hospitalizaci více než 10 % pacientů. Navíc miliony lidí dostávají léky, které jim vůbec nepomáhají. Například tzv. beta-blokátory, které mají snižovat krevní tlak, jsou neúčinné

u třetiny pacientů a mnoho antidepresiv nefunguje u poloviny lidí, kteří je užívají.¹⁰

Rizikové pacienty lze přitom odhalit pomocí farmakogenetických vyšetření, které predikují aktivitu příslušného enzymu. Tato predikce je platná po celý život pacienta a pro všechna léčiva metabolizovaná vyšetřeným enzymem. Na základě tohoto vyšetření lze pak volit alternativní léčebný postup u pacientů, kteří spadají do skupiny s vyšším rizikem vyplývajícím z léčby, nebo upravit dávkování léčiva. Vyšetření jsou sice finančně náročná, ale ve srovnání s náklady na řešení komplikací léčby, kterým by bylo možné předejít při znalosti genotypu, to nejsou zbytečně vynaložené náklady.

Literatura:

1. Šeda O, Šedová L: *Klinická farmakologie a farmacie* 19, 116 (2005).
2. Hood E: *Environmental Health Perspectives* 111, 1 (2003).
3. Mancinelli L, et al.: *AAPS J.* 2, 29 (2000).
4. Wang L: *Systems Biol. Med.* 2, 3 (2009).
5. Slanař O: *Farmakoterapie* 3, 296 (2005).
6. Evans WE, Relling MV: *Nature* 429, 464 (2004).
7. Flockhart DA, et al.: *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 86, 109 (2009).
8. Goldstein DB, et al.: *Nature Reviews Genetics* 4, 937 (2003).
9. Matýšková M, Čech Z: *Klinická biochemie a metabolismus* 17, 215 (2009).
10. Abbott A: *Nature* 425, 760 (2003).
11. Zima T, et al.: *Labor Aktuell* 03, 4 (2006).
12. http://www.roche-diagnostics.cz/download/press/sada_amplichip/amplichip_tecnologie.pdf (24. 11. 2010).
13. Gurwitz D, Pirmohamed M: *Pharmacogenomics* 11, 469 (2010).
14. Evans WE, Relling MV: *Science* 286, 487 (1999).
15. Evans WE, et al.: *The New England Journal of Medicine* 348, 538 (2003).
16. Phillips KA: *The Journal of the American Medical Association* 286, 2270 (2001).

Souhrn

Mušálková D.: Farmakogenetika a farmakogenomika aneb farmakoterapie šitá na míru

Vedlejší účinky léčiv či absence terapeutického účinku jsou významným problémem současné farmakoterapie. Těmto komplikacím se avšak dá u řady léčiv předejít použitím farmakogenetického testu, který odhalí funkčně významné polymorfismy v relevantních genech. Na základě tohoto testu pak lze upravit dávku léčiva či zvolit jiný typ léku. U řady léčiv ale nejsou známy činitele ovlivňující jejich účinek. K jejich odhalení slouží nově vzniklý obor farmakogenomika.

Klíčová slova: farmakogenomika, farmakogenetika

Summary

Mušálková D.: Pharmacogenetics and pharmacogenomics – tailoring the pharmacotherapy

Adverse drug reactions or absence of the therapeutic effect is a substantial problem of the current pharmacotherapy. These complications can be preceded in case of many drugs by using a pharmacogenetic test that reveals functionally significant polymorphisms in relevant genes. On the base of this test the dosage of the drug can be adjusted or another type of a drug can be chosen. However, in case of many other drugs we do not know the factors that influence their effect. There is a new discipline pharmacogenomics that should disclose them.

Key words: pharmacogenomics, pharmacogenetics

MAKROLIDOVÁ ANTIBIOTIKA

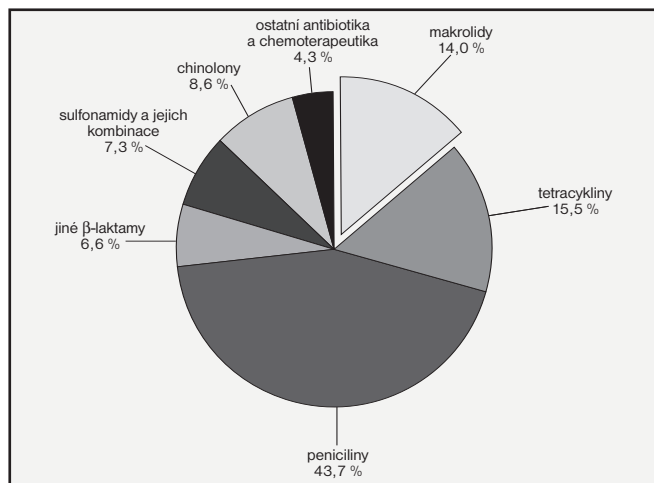
Žaneta Procházková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, zanetaprochazkova@gmail.com

Úvod

Makrolidová antibiotika jsou od poloviny minulého století velmi oblíbenou skupinou antibiotik. Důvodem je relativně nízký výskyt nežádoucích účinků a zejména jejich široké spektrum, které zahrnuje většinu typických a atypických původců komunitních respiračních infekcí.

V roce 2004 byl jejich podíl na celkové spotřebě léků v České republice 14 % (Graf 1). Jejich název je odvozen z chemické struktury tvořené makrocyclickým laktonovým kruhem, na který se připojí jeden nebo více cukrů.¹ V širším slova smyslu se mezi makrolidová antibiotika řadí:²



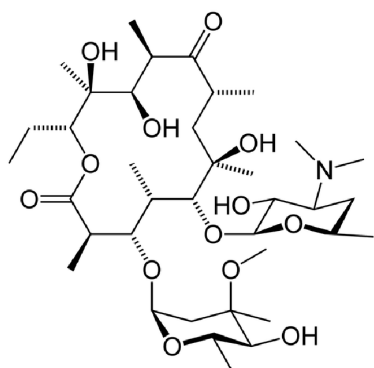
Graf 1: Relativní podíl spotřeby jednotlivých antibiotik a chemoterapeutik ve hmotných jednotkách (DDD/1000obyvatel/den) v roce 2004.

(zdroj: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmakologie/Jsou-vsechna-makrolidova-antibiotika-stejna-z-hlediska-lekovych-interakci/8-10b2.magarticle.aspx>)

- Makrolidy se 14členným laktonovým kruhem (erythromycin, clarithromycin, dirithromycin, troleandomycin, roxithromycin, flurithromycin)
- Makrolidy s 16členným laktonovým kruhem (rokitamycin, josamycin, miokamycin neboli midekamycin, spiramycin)
- Azalidy, tj. látky s 15členným laktonovým kruhem obsahujícím dusík (azithromycin)
- Ketolidy, tj. látky s 14členným laktonovým kruhem obsahujícím v poloze 3 místo sacharidového zbytku ketoskupinu (telithromycin)²

V užším a častěji používaném dělení se rozdělují na:

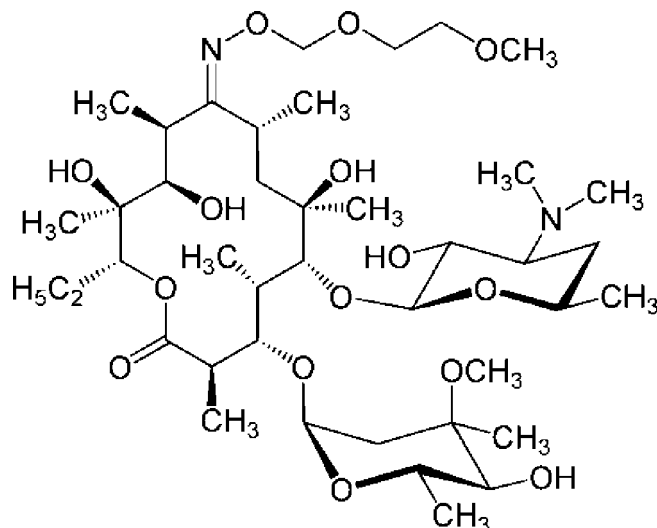
- 1. Původní Makrolidová antibiotika,** která jsou charakterizována přítomností struktury, obsahující velký (12-ti až 16-ti členný) laktonový kruh spojený glykosidickými vazbami s amino skupinou cukru. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou erytromycin (Obr. 1), oleandomycin, triacetyloleandomycin a spiramycin. Erytromycin byl objeven jako první v roce 1952 z metabolického produktu kultur *Streptomyces erythreus*. Je účinný proti gram-pozitivním bakteriím (*Neisseria*, *H. influenzae* a *Legionella pneumophila*) ale ne proti Enterobacteriaceae. Aktivita je závislá na pH, vzrůstá s pH až do hodnoty 8,5.³



Obr. 1: Erytromycin

(zdroj: <http://www.medlibrary.org/medwiki/Erythromycin>)

2. Novější Makrolidová antibiotika jsou semisyntetické molekuly, které se odlišují od organických sloučenin substitučním vzorcem laktonového kruhu. Roxitromycin (Obr. 2) má *in vitro* stejnou aktivitu jako erytromycin. Novější Makrolidová antibiotika jsou léky proti *Legionella pneumophyla*. Dalšími antibiotiky patřícími do této skupiny jsou clarithromycin a azithromycin.³



Obr. 2: Roxitromycin

(zdroj: <http://www.medlibrary.org/medwiki/Rulid>)

Makrolidová antibiotika vytvářejí klinicky významné lékové interakce, jejich schopnost inhibovat cytochrom P450-3A4 klesá v řadě: erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, spiramycin a azithromycin.³

Erytromycin

Erytromycin je makrolidové antibiotikum, jež má stejné nebo velmi podobné antimikrobiální spektrum jako penicilin. Je často používán lidmi trpícími alergií na penicilin. Při respiračních infekcích má větší rozsah u atypických organismů, včetně Mykoplasma a Legionely. Erytromycin se vyrábí z kmene aktinomycet *Saccharopolyspora erythraea*.⁴

Mechanismus účinku

Erytromycin zabraňuje bakteriální aktivitě, zejména ve vyšších koncentracích, ale celý mechanismus působení není doposud znám. Působí především proti Stafylokokům a jeho účinek je založen na inhibici syntézy proteinů reverzibilní vazbou na 50S ribozomální podjednotku. Interferuje s translokací aminoacylů, zabraňuje transferu t-RNA vázané na A místě r-RNA komplexu na P místo r-RNA komplexu. Bez této translokace A místo zůstává obsazené a proto přidání přicházející t-RNA a jejich připojených aminokyselin do začínajícího polypeptidového řetězce neprobíhá. Toto interferuje s produkcí funkčních proteinů a je základem antimikrobiální akce.^{4,5}

Erytromycin je snadno inaktivován žaludeční kyselinou. Je velmi rychle vstřebáván a šíří se do většiny tkání a fagocytů. Vzhledem k vysoké koncentraci ve fagocytech je aktivně transportován do míst infekce, kde se díky aktivní fagocytóze uvolňuje velké množství anti-

biotika. Většina Erytromycinu je metabolizována demethylací v játrech a jeho hlavní eliminační dráha se nachází ve žluči.⁵

Nežádoucí účinky

Erytromycin inhibuje cytochrom P450, zejména pak izoenzym CYP3A4, který může ovlivnit metabolismus mnoha různých léčiv. Pokud působí substráty léků CYP3A4, které jsou členěny podle CYP3A4, jako například simvastatin (Zocor), lovastatin (Mevacor) nebo atorvastatin (Lipitor), společně s erytromycinem, zvýší se hladina těchto substrátů a to vede velmi často ke vzniku nežádoucích účinků. Další skupinou substrátů CYP3A4 jsou léky používané k léčbě migrény, jako je například ergotamin a dihydroergotamin, jejich nežádoucí účinky mohou být výraznější, pokud jsou spojeny s erytromycinem. V minulosti se objevily spekulace o vlivu spojení erytromycinu a jeho metabolitů (jako verapamil nebo diltiazem), patřících do skupiny CYP3A4, na vznik komorové tachykardie a náhlého srdečního selhání.⁵

Erytromycin se nedoporučuje při použití produktů obsahujících klindamycin, a to i aktuální produkty, jako jsou například Duac nebo BenzaClin. Obecně platí, že bychom se měli vyhýbat používání dvou různých derivátů erytromycinu současně.⁴

Roxitromycin:

Roxitromycin je semi-syntetické makrolidové antibiotikum. Používá se při potížích dýchacích a močových cest. Je odvozen od erytromycinu, obsahuje stejný 14-ti členný laktonový kruh. Liší se však N-oximem postranního řetězce připojeného k laktonovému kruhu. V současné době je na trhu pod několika názvy: Surlid, Rulide, Biaxig, Roxar a Roximycin.¹

Mechanismus účinku

Roxitromycinu brání bakteriím v růstu tím, že zasahuje do jejich syntézy proteinů. Váže se na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu, a tím inhibuje translokaci peptidů. Roxitromycinu má podobné antimikrobiální spektrum jako erytromycin, ale je účinnější proti některým gram-negativním bakteriím, především *Legionella pneumophila*. Užívá-li se před jídlem, je velmi rychle vstřebáván a šíří se do většiny tkání a fagocytů. Vzhledem k vysoké koncentraci ve fagocytech, je roxitromycinu aktivně transportován do místa infekce. Během aktivní fagocytózy, se uvolňují velké koncentrace roxitromycinu.⁶

Pouze malá část roxitromycinu je metabolizována. Většina roxitromycinu je vylučována v nezměněné formě do žluče. Roxitromycinu má méně interakcí než erytromycinu, protože má nižší afinitu k cytochromu P450.⁶

Rezistence

Vznik rezistence k antibiotikům je evoluční proces. Antibiotika jako například penicilin nebo erytromycin, která byla dříve závažnými léky ztrácejí dnes svůj účinný efekt, protože bakterie se k nim stávají odol-

nější. Působení antibiotik vytváří selektivní tlak, který umožňuje růst odolnějších bakterií v rámci populace. Základní molekulární mechanismy vedoucí ke vzniku rezistence se mohou lišit.¹

Rezistence k makrolidovým antibiotikům může být způsobená řadou příčin. Nejvýznamnější z nich je metylace adeninu zprostředkovaná *erm* geny, jejímž důsledkem je alterace 23S ribozomální RNA na podjednotce 50S ribozomu. Tato událost snižuje nebo znemožňuje vazbu MLS_B antibiotik na jejich cílové místo na ribozomu a fenotypově se projevuje jako zcela zkřížená rezistence mezi těmito antibiotiky. Dalším poměrně častým mechanismem rezistence u skupiny MLS_B antibiotik je eflux řízený *mef* geny, který se fenotypově projevuje jako rezistence jen k 14-ti členným makrolidovým antibiotikům. Všechna makrolidová antibiotika mají sníženou schopnost průniku do buněk gram-negativních bakterií. Mezi vzácné příčiny rezistence patří enzymatická inaktivace strukturálně podobných makrolidových antibiotik nebo specifické ribozomální mutace, které mohou být příčinou samostatné rezistence pouze k určitému makrolidovému antibiotiku.¹

V posledních 15-ti letech byl celosvětově zaznamenán prudký vzestup spotřeby novějších makrolidových antibiotik. Nová makrolidová antibiotika dokonce v některých lokalitách vystřídala penicilin, jako lék pro léčbu streptokokových a pneumokokových infekcí. Vliv makrolidových antibiotik na mikrobiotu člověka i prostředí se sčítá. V zájmu zachování jejich účinnosti je proto nezbytné striktní dodržování specifických indikací. Vysoká a neuvážená spotřeba makrolidových antibiotik s sebou v řadě zemí přinesla vzestup rezistence běžných patogenů na tato antibiotika. Například v Japonsku byla v roce 1974 zjištěna rezistence streptokoků A na erytromycin v 62 % případů, přičemž spotřeba makrolidových antibiotik činila pouze 22 % spotřeby všech antibiotik v této zemi. Po poklesu jejich spotřeby na 8 % klesla v roce 1988 tato rezistence na 2 %. Podobné zkušenosti existují také ze začátku 90 let z Finska. V některých zemích jižní Evropy s vysokou spotřebou těchto antibiotik je pozorován tzv. syndrom sdružené rezistence k makrolidovým antibiotikům, kdy je současně rezistentní 30 – 50 % streptokoků A a pneumokoků.¹

Začátkem devadesátých let minulého století se nová makrolidová antibiotika objevila i u nás. V letech 1992 až 1994 stoupla spotřeba vyjádřena na počet balení čtyřikrát a spotřeba vyjádřená ve financích dokonce na desetinásobek. V roce 1991 bylo u nás k erytromycinu (a současně k dalším makrolidovým antibiotikům) rezistentních pouze 0,3 % streptokoků, a stejně vzácná byla i rezistence pneumokoků. Prudký vzestup rezistence nastal koncem 90 let. V současné době je u nás rezistence k makrolidovým antibiotikům zhruba u 17 % streptokoků A a 7 % pneumokoků. Navíc jsme obklopeni zeměmi, které mají rezistenci pneumokoků k makrolidovým antibiotikům mnohem

vyšší (Slovensko 28 %, Polsko 27 %) a je tudíž pravděpodobné, že rezistentní a multirezistentní klony těchto bakterií k nám mohou pronikat díky migrujícímu obyvatelstvu.¹

Závěr

Rezistence je celosvětovým problémem současnosti. Bakterie se stávají odolnějšími a objevování nových a účinnějších léků trvá dlouho. Nevhodně zvolená

antibiotika, nesprávné dávkování a nevhodné indikace zvyšují však riziko narůstání rezistence běžných bakteriálních patogenů. Znehodnocení antibiotik skupiny MLS_B rychlým nástupem rezistence lze odvrátit pouze zpřesněním indikací makrolidových antibiotik. Jako příklad nám mohou sloužit Japonsko nebo Finsko, kde našli cestu, jak dát makrolidovým antibiotikům šanci a zároveň zabránit zvýšení jejich rezistence.

Literatura:

1. Urbášková P, Marešová V, Jindrák V, et al.: Konsensus používání antibiotik II. *Subkomise pro antibiotickou politiku. Komise pro léčovou politiku a kategorizaci léčiv ČLS JEP.*
2. Suchopar J. Jsou všechna makrolidová antibiotika stejná z hlediska lékových interakcí? *Remedia online* 2005; rubrika – Lékové interakce
3. Hugo a Russell: *Pharmaceutical microbiology*. Blackwell Publishing 2008
4. Cortes J, Haydock FS, Roberts AG, Bevitt JD, Leadlay FP: *Nature* 348, 176 (1990).
5. Ray WA, Murray KT, Meredith S, et al.: *N. Engl. J. Med.* 351, 1089 (2004).
6. <http://www.medic8.com/medicines/Roxithromycin.html>, citováno: 6. 11. 2010

Souhrn

Procházková Ž.: Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika jsou v dnešní době velmi významnou skupinou léků. Důvodem je relativně nízký výskyt nežádoucích účinků a jejich široké spektrum působení. Dvěma nejznámějšími zástupci jsou erytromycin a roxitromycin. V posledních několika letech však stoupla rezistence bakterií proti těmto antibiotikům.

Klíčová slova: makrolidová antibiotika, erytromycin, roxitromycin, rezistence

Summary

Procházková Ž.: Macrolide antibiotics

Macrolide antibiotics are nowadays a very important group of drugs. The reason is the relatively low incidence of side effects and their broad spectrum of activity. The two best-known representatives are erythromycin and roxithromycin. In the past few years, however, increased bacterial resistance to these antibiotics.

Key words: macrolide antibiotics, erythromycin, roxithromycin, resistance

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI POVRCHU BUNĚK A METODY JEJICH STANOVENÍ

Dagmar Pospíšilová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Po dlouhé období existence mikrobiologie jako vědní disciplíny byly mikroorganismy zkoumány jako planktonní, volně suspendované buňky, specifikované na základě růstových charakteristik v nutričně bohatých růstových médiích¹. Ovšem reálné prostředí je jiné a mikroorganismy se musí vyrovnávat s působením mnoha nepříznivých vlivů. Přirozeností většiny mikroorganismů není výskyt v suspenzní populaci, ale naopak adheze a tvorba biofilmu na exponovaném povrchu. Adherované buňky se vyznačují odlišnými vlastnostmi od suspenzních, mají větší schopnost odolávat negativně působícím faktorům vnějšího prostředí, např. zvýšenou odolností k limitujícím a toxickým

vlivům, jako nedostatek živin, přítomnost antibiotických látek apod. Těchto vlastností lze využít v biotechnologiích, např. pro konstrukci stabilních biokatalyzátorů pro čištění odpadních vod. Nicméně adheze a kolonizace povrchu nemusí být jen žádaná. Tzv. biofouling (nežádoucí akumulace mikroorganismů) může být vážným problémem, komplikace může působit v lékařství (např. infekce kontaktních čoček, zubní kaz, kolonizace implantátů) i v průmyslu (např. zanášení teplotních výměníků, vodárenských zařízení na pitnou vodu)². Z těchto důvodů je velmi důležité lépe porozumět fyzikálně-chemickým, biochemickým a genetickým faktorům, které determinují tvorbu, růst a zachování biofilmu.

Pro pochopení velmi komplexního jevu, jakým buněčná adheze je, má nezastupitelné místo fyzikálně-chemická charakteristika povrchu buněk. Vlastnosti povrchu jsou pro jednobuněčné organismy velmi důležité, protože rozhraní mezi buněčnými obaly a vnějším prostředím hraje významnou roli v celkové fyziologii buňky. Vnější povrch buňky zprostředkovává výměnné a adhezivní procesy, účastní se růstu buněk i buněčného dělení a ovlivňuje interakce s imunologickými faktory³. Mezi nejvíce zkoumané vlastnosti povrchu patří hydrofobita, elektrondonor-elektronakceptorní (acidobazické) vlastnosti a povrchový náboj buňky^{4,5}. Dále jsou uvedeny nejčastěji používané metody pro charakterizaci povrchových vlastností obalů buněk: MATH, MATS, měření kontaktních úhlů a určení zeta potenciálu.

Hydrofobita a acidobazické vlastnosti buněčného povrchu

Hydrofobita patří k nejvíce studovaným vlastnostem buněčného povrchu, jelikož je všeobecně uznávána jako determinující faktor adheze buněk⁶. Její hodnota je výsledkem chemického složení povrchu, které je ovlivněno podmínkami vnějšího prostředí⁷ (zejména složením kultivačního media). Hydrofobita povrchu je do značné míry charakteristická a odlišná pro buňky různých skupin mikroorganismů⁵. Mezi metody umožňující stanovení hydrofobity patří HIC, chromatografie pracující na principu hydrofobních interakcí⁸ a určuje hydrofobitu měřením množství mikroorganismů zachycených v hydrofobním gelu, dále adheze mikroorganismů k uhlovodíkům a organickým rozpouštědlům^{9,10} (MATH, MATS) metoda měření kontaktních úhlů⁵ a metoda využívající vazby fluorescenčních kuliček s modifikovaným hydrofobním, nebo hydrofilním povrchem¹¹.

Metoda MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) je jednou z nejběžnějších metod měření hydrofobity buněčného povrchu⁹. Hydrofobita je v této metodě vyjádřena jako procentuální podíl buněk s vysokou afinitou k uhlovodíku (např. hexanu), tzn. podíl, který přejde z vodné do organické fáze. Buněčná suspenze je extrahována malým množstvím uhlovodíku. Po oddělení fází, je organická fáze odstraněna a měří se turbidita (optická denzita) vodné fáze. Hydrofobita je vypočtena podle vztahu⁹:

$$H(\%) = \left(\frac{1-A}{A_0} \right) \times 100$$

kde A_0 je turbidita buněčné suspenze před smícháním s organickou fází a je turbidita vodné fáze po extrakci.

Původ hydrofobity měřené metodou MATH zahrnuje srovnání preference povrchu buňky pro vodnou nebo uhlovodíkovou fázi. Nicméně organismy adherují k uhlovodíkům buď z důvodu afinity k uhlovodíkům, nebo kvůli odporu povrchu k vodě. Afinita mikroorganismů k uhlovodíkům je výhradně determinovaná

Lifshitz-van der Waalsovými silami, protože povrch uhlovodíků nemůže uplatnit acidobazické interakce, metoda MATH tak zanedbává roli elektrostatických vlastností a strukturálních rysů povrchu buňky. Naopak afinita mikroorganismů k vodě je velkou mírou ovlivněna acidobazickými vlastnostmi. Téměř všechny povrchy mikroorganismů jsou schopny tyto interakce uplatnit díky jejich převážně elektrondonornímu charakteru⁶.

Modifikací metody MATH je použití nejen hydrofobních uhlovodíků, ale i jiných rozpouštědel. Potom se jedná o **MATS** (Microbial Adhesion To Solvents). Tato metoda umožňuje charakterizaci elektrondonor-elektronakceptorních, respektive Lewisových acidobazických vlastností, které jsou považovány za původ hydrofobity buněčného povrchu¹². Některé studie uvádějí, že právě interakce vznikající na základě těchto vlastností hrají v procesu adheze důležitou roli^{5,13,14}.

Metoda MATS je založená na srovnání afinity buněk k polárním a nepolárním rozpouštědlům¹⁰. Polární rozpouštědla mohou být acidická, či bazická, ale musí mít podobné Lifshitz-van der Waalsovy komponenty povrchového napětí. Pro určení acidobazických vlastností byly zvoleny tyto dvojice rozpouštědel: chloroform – kyselé rozpouštědlo s elektronakceptorními vlastnostmi vs. hexadekan-nepolární rozpouštědlo, diethylether – silně bazické elektrondonorní rozpouštědlo vs. hexan, ethylacetát – silně bazické elektrondonorní rozpouštědlo vs. dekan.

Rozdíly mezi výsledky obdrženy s chloroformem a hexadekanem a naproti tomu výsledky mezi diethyletherem a hexanem indikují, zda je povrch akceptorem nebo donorem elektronů⁵. Kmeny, které jsou donory elektronů, adherují lépe ke chloroformu, než k hexadekanu, zatímco méně adherují k diethyletheru, než k hexanu.

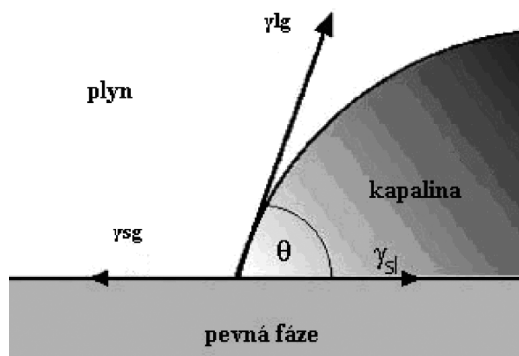
Slabou stránkou těchto metod je, že měření ovlivňují různé faktory, jako např. rozměry zkumavky, doba extrakce a poměr mezi fázemi. Optická densita buněčné suspenze bývá měřena spektrofotometricky, ale suspenze buněk může tvořit shluky. Výsledky jsou pak výrazně ovlivněny sedimentací těžších částic. Podobný problém nastává také při práci s vláknitými organismy¹¹.

Z fyzikálně-chemického hlediska metoda MATH a MATS neměří hydrofobitu buněčného povrchu mikroorganismů, ale vyjadřuje vztahy mnoha faktorů uplatňujících se v procesu adheze. Výsledek této metody nemusí odrážet vlastnosti buněk v situacích běžných v přírodních prostředích.

Další metodou, která je používána k určení hydrofobity nebo hydrofility povrchu a také acidobazických vlastností je **metoda měření kontaktních úhlů**⁶. Při této metodě je určován úhel smáčení (kontaktní úhel) θ , který se vytvoří mezi plynou, kapalnou a pevnou fází v místě styku všech tří fází (Obr.1).

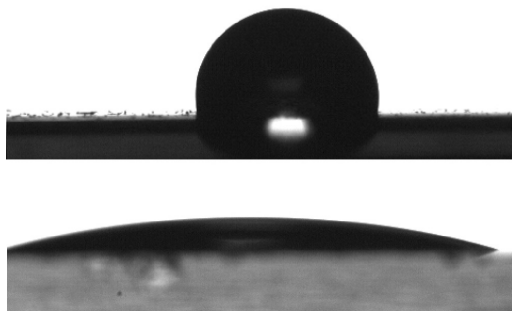
Při kontaktu kapaliny s povrchem tuhé nerozpustné fáze se uplatňují tři mezifázová napětí: mezifázová energie čisté tuhé fáze γ_{sg} , mezifázová energie tuhá fáze-kapalná fáze γ_{sl} , povrchová energie kapaliny γ_{lg} .

Podle velikosti úhlu smáčení je možno charakter povrchů dělit na hydrofilní¹⁶ s úhlem smáčení $\theta < 90^\circ$, a hydrofobní s úhlem smáčení $\theta > 90^\circ$. Při charakterizaci povrchu bakteriálních buněk je používáno jiné rozdělení, které se liší u různých autorů. Je uváděno, že povrch buňky je hydrofilní, pokud je kontaktní úhel nižší než 50° , ale je zmiňována i hodnota 65° . Rozmezí $50 - 65^\circ$ tak bývá někdy označováno jako mezistupeň hydrofility a hydrofobity, povrch je tzv. středně hydrofobní¹³. Acidobazické vlastnosti jsou určovány výpočtem podle Van Osse¹³ po dosažení známých parametrů testovacích kapalin.



Obr. 1: Kontaktní úhel θ na pevném povrchu¹⁵

Měření kontaktních úhlů metodou přisedlé kapky je založeno na snímání profilu kapky utvořené na zkoumaném povrchu při použití tří kapalin se známými povrchovými vlastnostmi⁶ (voda, formamid, bromnaftalen). Získaný snímek (Obr. 2) je počítačově zpracován. Zásadní je při použití této metody příprava vzorku buněčné populace. Je nutné docílit homogenního a rovného povrchu. V literatuře jsou uváděny zejména dvě možnosti. První možností je zachycení vrstvy buněk na filtru⁵ o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$. Filtr je pak přenesen např. na sklíčko, upevněn a přirozeně vysušen. Vysychání je problémovým krokem, jelikož při nedostatečném vyschnutí je na povrchu filtru vrstva kapaliny, která ovlivňuje výsledky měření. Naopak při přílišném vyschnutí dochází ke vsakování testovacích kapalin, nebo k pokroucení filtru, což opět negativně ovlivňuje možnosti měření. Druhou možností je nanesení suspenze na sklíčko pokryté vrstvou agaru¹⁴. I při této variantě dochází k podobným komplikacím, při vysy-



Obr. 2: Kamerové snímky kapky vody na hydrofobním (nahore) a hydrofilním (dole) materiálu

chání agaru může dojít k popraskání jeho povrchu a následně pak také k vsakování testovacích kapalin. Modifikací je nanesení homogenizované suspenze přímo na sklíčko v několika tenkých vrstvách. Přestože je vysychání také problematickým krokem, je oproti dvěma předchozím metodám mnohem jednodušší kontrolovat stav vlhkosti vzorku, a to pouhým okem. Příprava vzorku se může lišit pro různé zkoumané organismy a musí být vždy optimalizována.

Metoda MAC (Micro-sphere adhesion to cell) je založena na vazbě fluorescenčně značených kuliček malého průměru ($0,2 \mu\text{m}$) k buňkám. Povrch těchto kuliček je modifikován tak, aby byl hydrofobní, nebo hydrofilní. Tyto kuličky jsou přidány do buněčné suspenze a hydrofobita je určena mikroskopicky stanovením míry, v jaké došlo k vazbě na buňky. Pokud došlo ke značnému navázání hydrofobních kuliček, vyplývá z toho podle této metody, že i povrch buňky je hydrofobní. Rozhodnutí na základě interakce buněk se syntetickými koloidními částicemi je ale značným zjednodušením a může být zavádějící. Obě funkční skupiny modifikovaného povrchu kuliček totiž nesou negativní náboj (v závislosti na pH), v interakci s povrchem buněk se tak mohou uplatňovat spíše elektrostatické interakce, než hydrofobita¹¹.

Povrchový náboj buňky

Povrchový náboj buněčné stěny je odvozen, stejně jako hydrofobita, od chemického složení buněčného povrchu¹⁷. Závisí na disociaci kyselých skupin, jako jsou skupiny karboxylové, fosfátové a amino- skupiny. Přítomnost kationických a anionických skupin udílí povrchu amfoterní vlastnosti. Stupeň disociace těchto skupin je funkcí pH a aktivity okolního elektrolytu a náboj buněčné stěny tak může být jak pozitivní, tak negativní i nulový³. Pro určení obsahu těchto pozitivních a negativních skupin existuje několik metod: chemická modifikace volných skupin reaktivními činidly (hydrazin, diazomethan), vazba barviv (safranin), potenciometrická titrace izolovaných buněčných stěn¹⁶. Studie prokazují, že v buněčných stěnách převažují skupiny anionické nad kationickými, což je v souladu s poznatkem, že většina bakterií má izoelektrický bod¹⁸ odpovídající hodnotě pH menší než 4. Izoelektrický bod lze určit pomocí **proměření závislosti pohyblivosti buněk v elektrickém poli** (elektroforetické mobility) na pH např. pomocí Dopplerovy laserové velocimetrie (např. přístrojem Zetasizer Nano, Malvern Instruments Ltd., Velká Británie). Většinou je elektroforetická mobilita převáděna na **zeta potenciál** pomocí Henryovy rovnice¹⁹:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot z \cdot f(K \cdot a)}{3\eta}$$

kde je z potenciál zeta, U_E elektroforetická pohyblivost, ε dielektrická konstanta, η viskozita, $f(K \cdot a)$ Henryova funkce.

Elektroforetická stanovení potenciálu zeta se nejčastěji provádějí ve vodném prostředí a při nepřilíživé koncentraci elektrolytu; $f(K.a)$ je v tomto případě 1,5 a nazývá se Smoluchowskiho aproximace. Proto výpočet potenciálu zeta z pohyblivosti je přímočarý pro systémy, které vyhovují Smoluchowského modelu, tj. částice větší než 0,2 mikrometru, dispergované v elektrolytu o koncentraci přesahující hodnotu 10^{-3} M¹⁹. Jako elektrolyt je používán fosfátový pufr, KCl, nebo KNO₃ o různých iontových silách¹⁸. Buněčná suspenze vytvořená pomocí těchto pufrů se převede do květy a je vložena do přístroje. Software naměřená data převede na hodnoty zeta potenciálu.

Hodnota povrchového náboje nelze určit vzhledem k malé velikosti buněk přímo, určení zeta potenciálu je ale užitečnou alternativou, referuje o koloidní stabilitě částic v systému. Čím blíže jsou tyto hodnoty nule, tím jsou částice v systému méně stabilní a mají větší tendenci k flokulaci. Zeta potenciál vyjadřuje vztah mezi povrchem částice a okolní kapalinou. Ionty blízko u povrchu částice se budou silně vázat, zatímco ionty, které jsou dále, se budou vázat volně a budou vytvářet to, co se nazývá difuzní vrstva. Uvnitř difuzní vrstvy existuje pomyslná hranice a některé ionty uvnitř této hranice se budou pohybovat s částicí, když se pohybuje v kapalině; ale některé ionty vně této hranice zůstanou tam, kde jsou – tato hranice se nazývá rovina skluzu. Zeta potenciál je elektrický potenciál nabitých částic na rovině skluzu³.

Hodnota pH izoelektrického bodu (zeta potenciál je nulový) může souviset s adhezivními vlastnostmi buněčného povrchu. Hodnota IEP $\leq 2,8$ může indikovat přítomnost polysacharidů vázaných na povrch buňky, které adhezi inhibují. Naopak bakterie s IEP $\leq 3,2$ tyto polysacharidy neobsahují a adherují lépe. Z těchto zjištění vyplývá, že IEP bakterií může být doplňující informací k hydrofobitě ve zjišťování adhezivních vlastností buněk¹⁸.

Přehledová literatura uvádí kromě měření elektroforetické mobility také další metody pro určení povrchového náboje buněk, např. chromatografie využívající elektrostatických interakcí³. Náplní chromatografické kolony je pozitivně, či negativně nabitý iontoměnič, se kterým buňky interagují v závislosti na jejich povrchovém náboji. Tato metoda je ale časově náročná a výsledek nelze převést na hodnotu zeta potenciálu. Podobně je tomu i při měření metodu dvoufázového rozdělování, kdy je povrchový náboj určován z preference buněk k určité fázi na základě jejich polarity. Metoda analýzy elektroforetické rovnováhy zahrnuje vytvoření gradientu pH v koloně a po nástřiku migraci buněk do své izoelektrické oblasti, umožňuje také zjištěné údaje o elektroforetické mobilitě převést na zeta potenciál, ale díky své časové náročnosti bývá k určení povrchového náboje buněk používána jen zřídka.

Interpretace elektroforetické mobility, zeta potenciálu elektrokinetického náboje buňky, je úkol obtížný kvůli řadě neznámých, které tyto veličiny ovlivňují, přesto při doplnění znalosti souborů fyzikálně-chemických vlastností povrchu buňky měřeného dalšími metodami může přinést zajímavé informace.

Závěr

Znalosti o povrchových vlastnostech buněk, které jsou založeny na molekulárních mechanismech, přináší možnost pochopení celkové buněčné fyziologie. Poznatky získané zkoumáním povrchových vlastností buněk ovšem nemusí být přínosem jen z hlediska akademického. Poznání souvislostí mezi vlastnostmi obalových vrstev (kam patří i složení, nebo přítomnost vázaných exopolymerních látek) a chováním buněk (např. schopností adheze) může mít velký význam pro biotechnologie i medicínu.

Literatura:

1. Dolan RM: *Biofilms: Emerging. Infect Dis.* 8, 881 (2002).
2. McLandsborough L, Rodriguez A, Perez-Conesa D, et al.: *Food Biophys.* 1, 94 (2006).
3. Wilson WW, Wade MM, Holman SC, et al.: *J. Microbiol. Meth.* 43, 153 (2001).
4. Clint JH: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6, 28 (2001).
5. Hamadi F, Latrache H: *Colloid Surf., B.* 65, 134 (2008).
6. Van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ: *Colloid Surf., B.* 11, 213 (1998).
7. Sokolovska I, Rosenberg R, Riez Ch, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7019 (2003).
8. Gannon JT, Manilal VB, Alexander M: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 190 (1991).
9. Geertsema-Doornbusch GI, Van der Mei HC, Busscher HJ: *J. Microbiol. Meth.* 18, 61 (1993).
10. Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ: *Colloid Surf., B.* 7, 47 (1996).
11. Heard J, Johnson BB, Wells JD, et al.: *Colloid Surf., B.* 72, 289 (2009).
12. Van Oss CJ: *Colloid Surf., B.* 5, 91 (1995).
13. Van Oss CJ: *Colloid Surf., A.* 78, 1 (1993).
14. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R: *Colloid Surf., B.* 33, 235 (2004).
15. <http://www.kruss.de/en/theory/measurements/contact-angle/introduction.html> (10.7.2010).
16. <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/BREVAL.pdf> (10. 7. 2010).
17. Martensen M, Reichel M, Kohlweyer U: *Acta Biol.* 21, 207 (2001).
18. Rijnaart HHB, Norde W, Lyklema J, et al.: *Colloid Surf., B.* 4, 191 (1995).
19. Malvern Instruments Ltd., Příručka pro uživatele Zetasizer Nano, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire UK 2004.

Souhrn

Pospíšilová D.: Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu buněk a metody jejich stanovení

Vlastnosti povrchu jsou pro jednobuněčné organismy velmi důležité, protože rozhraní mezi buněčnými obaly a vnějším prostředím hraje významnou roli v celkové fyziologii buňky. Vnější povrch buňky zprostředkovává výměnné a adhezivní procesy, účastní se růstu buněk i buněčného dělení a ovlivňuje interakce s imunologickými faktory. Znalosti o povrchových vlastnostech buněk rozšiřují nejen možnost pochopení fyziologie buněk, ale přináší i informace využitelné v biotechnologiích a medicíně. Tento článek shrnuje nejčastěji používané metody pro zkoumání fyzikálně-chemických vlastností povrchu buněk.

Klíčová slova: povrchové vlastnosti buněk, hydrofobita, povrchový náboj

Summary

Pospíšilová D.: Physico-chemical properties of the cell surface and their determination

The surface properties are very important for unicellular organisms, because interface between cell envelope and outer environment plays an important role in overall physiology of cells. The outer cell surface mediates exchange and adhesive processes, participates in cell growth and division and also influences interactions with immunological factors. Understanding the cell surface properties can shed light on cell physiology and also bring information useful for biotechnology and medicine. This article summarizes the most frequently used methods for studying physico-chemical properties of cell surface.

Key words: cell surface properties, hydrophobicity, surface charge

DŮKAZ PRAVOSTI POTRAVIN ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU DNA TECHNOLOGIEMI

Iva Machová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

V současnosti roste zájem spotřebitelů o informace o původu potravin, ať už z obav o své zdraví (BSE, ptáčí chřipka, slintavka), z náboženských důvodů, z důvodu potravinových alergií, informovanosti o geneticky modifikovaných potravinách nebo na základě zkušeností s nekalými praktikami některých výrobců. Informace na etiketách jednotlivých potravin nejsou dostatečnou zárukou skutečného obsahu výrobku, proto je nutné ověřovat tyto informace pro ochranu spotřebitelů a poctivých výrobců.

Postupy určující pravost potravin mohou přispět i k zachování přírodní rozmanitosti divoce žijících druhů zvířat, která jsou lovena kvůli trofejím, ozdobným předmětům (slonovina), k lidské spotřebě (mořské želvy a jejich vejce) nebo tradiční medicíně (tygr, nosorožec). Jak pravost potravin, tak ochrana biodiversity vyžadují přesné metody pro určení původu v široké škále zvířecích druhů z degradovaných nebo jinak zpracovaných materiálů. Identifikace jednotlivých složek ve zpracované nebo složené směsi není vždy úplně jednoduchá, stejně tak ověření pravosti jednotlivých komponent potravin. Dříve se pravost potravin stanovovala na základě určení druhově specifických proteinů dané komodity¹ imunochemickými nebo elektroforetickými metodami, které však mají své limity. Hlavními problémy byly některé technologické kroky při zpracování potravin, které vedly k denaturaci proteinů nebo fakt, že řada proteinů je tkáňově specifických. Navíc řada komerčních testů byla navržena na detekci plazmatických proteinů, které při náhodné kontaminaci masa

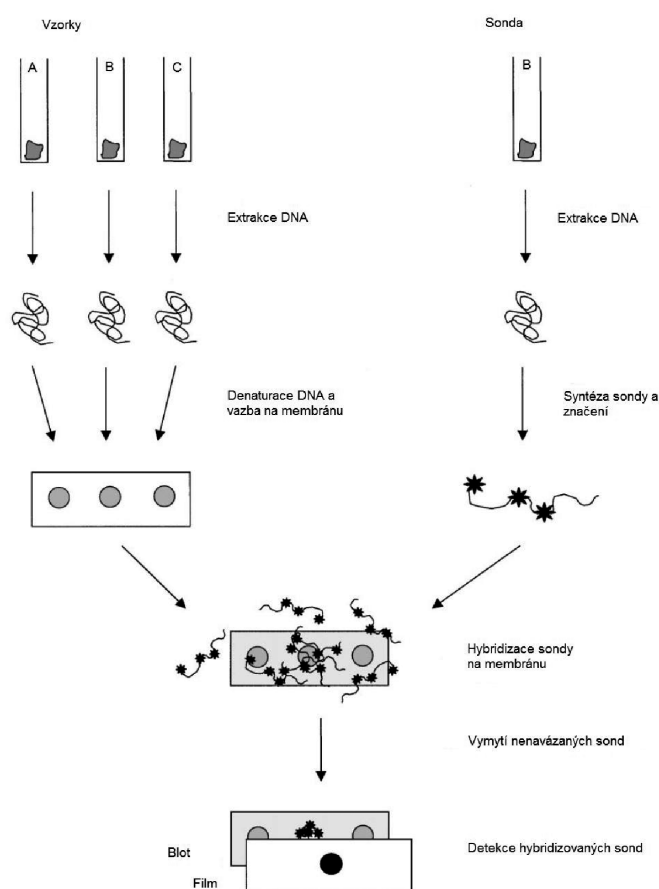
krví jiného živočišného druhu, mohly vést k falešným výsledkům. Tyto nevýhody obrátily pozornost k metodám využívající pro analýzy DNA.

DNA je termostabilnější než většina proteinů, přítomná téměř ve všech buňkách organismu, potenciálně umožňuje získat potřebné informace z jakéhokoliv vzorku stejného původu bez ohledu na původ tkáně. Znalostí DNA sekvence lze získat i více informací než z proteinů, především díky degeneraci genetického kódu a obsahu nekódujících sekvencí. Technologie založené na stanovení nukleových kyselin se v současnosti rychle rozvíjejí a mají velký potenciál pro zjednodušení určování pravosti v oblasti potravinářství².

DNA hybridizace

DNA hybridizace patří mezi první použité, relativně jednoduché metody využívající DNA pro druhové určení masa z potravin. Typické uspořádání takového pokusu je znázorněno na obr. 1. Značené DNA sondy jsou hybridizovány s genomickou DNA kovalentně navázanou na nylonovou membránu v slot- nebo dot-blot formátu. Výzkumy prokázaly, že sondy obsahující vázanou DNA určitého živočišného druhu hybridizují s DNA tohoto druhu s malou křížovou reakcí. Touto metodou byly jednoznačně identifikovány vzorky kuřecího a vepřového masa extrahované z vařeného masa a jiných komerčních produktů, podobně i vepřové ze směsi vepřového a hovězího masa. Sondy pro kozí, ovčí a hovězí DNA vykazují přítomnost mírných křížových reakcí, které jsou dány blízkou homologií některých sekvencí u těchto druhů

zvířat. Částečně lze tyto křížové hybridizace odstranit přidáním neznačené DNA (druhu způsobující křížové reakce) do reakční směsi, ale ani to stále není dostatečné pro rozlišení mezi ovčí a kozí DNA. Pro zvýšení účinnosti identifikace jednotlivých druhů byla pro tvorbu sond využita tzv. satelitní DNA, která se nachází v celém genomu. Použitím takto druhově specifických sond bylo jednoznačně identifikováno maso hovězí, jelení, vepřové, kuřecí, krůtí, králíčí, ovčí a kozí v nezpracovaných produktech³. Druhově specifické sondy mohou být i oligonukleotidy menší než 100 bází a hybridizace je možná i se značně degradovanou DNA. Pomocí DNA hybridizace lze identifikovat i jednotlivá plemena skotu².



Obr. 1: Schematické znázornění testování vzorků pomocí DNA hybridizace. Vzorky A, B, C jsou testovány sondou připravenou ze stejného druhu jako vzorek B.

Metody založené na PCR

Nejvíce metod využívající k identifikaci DNA z potravin je založeno na vysoce specifické amplifikaci jednoho nebo více DNA fragmentů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato metoda má vysoký potenciál díky své rychlosti, jednoduchosti, citlivosti a specifitě. Amplifikace pomocí PCR je založena na hybridizaci specifických oligonukleotidů (primerů) a *in vitro* syntézy milionů kopií DNA vymezené těmito primery. Specifická amplifikace jednoho fragmentu

pomocí PCR následovaná elektroforézou v agarosovém gelu pro určení velikosti tohoto fragmentu je nejjednodušší způsob vyhodnocení přítomnosti vzorku určitého živočišného druhu.

S čím je nutné počítat u PCR metod?

- Krátké fragmenty DNA – v průběhu zpracování potravin jsou potraviny vystaveny řadě tepelných úprav (vaření, pasterace), vysokému tlaku, úpravám pH ($\text{pH} < 4$), ozáření, sušení apod. Těmito úpravami dochází ke značné degradaci DNA, proto metody identifikace takto upravených potravin musí být založeny na analýze velmi krátkých DNA fragmentů (100 – 200 páru bází)⁴.
- Malé množství DNA – DNA není jenom degradovaná zpracováním potravin, ale také se vyskytuje v malém množství, které tak redukuje počet fragmentů vhodných pro molekulární analýzu. Tento problém lze odstranit vyšším počtem PCR cyklů (45-55), kterými lze dosáhnout dostatečného množství amplifikované DNA pro následné analýzy. V malých množstvích se mohou vyskytovat v potravinách i minoritní složky, které byly do potravin přidány náhodně nebo jako složky falšování, proto musí detekční metody poskytovat velice spolehlivé výsledky.
- Kontaminace – PCR je velice senzitivní metoda, proto může někdy docházet přednostně k amplifikaci exogenní DNA namísto hledané DNA.
- PCR inhibitory – mezi látky inhibující PCR metody patří i sloučeniny používající se při přípravě vzorků nebo vznikají při těchto úpravách, jako např. fenolické sloučeniny, polysacharidy (nebo produkty Maillardovy reakce), glykogen, tuky, mléčné proteiny, kolagen, železo nebo kobalt. Proto každá nová testovaná potravina vyžaduje vývoj nové extrakční a amplifikační metody nebo alespoň adaptaci již existující. Některé inhibitory lze neutralizovat přidáním hovězího sérového albuminu (BSA) nebo spermidinu k reakční směsi pro PCR⁴.

DNA markery pro druhovou identifikaci

DNA získaná z potravin projevuje řadu specifických vlastností, které komplikují její detekci. Tyto vlastnosti jsou důvodem, proč je většina identifikačních metod přednostně založena na mitochondriální DNA (mtDNA). Obsah mtDNA uvnitř buňky je až 1000x větší než jaderné DNA, proto je amplifikace této mtDNA snazší než jaderné DNA. Navíc, tento malý cirkulární genom (cca 16 kb u většiny obratlovců) vykazuje maternální dědičnost (jedinci mají jen jednu alelu), je haploidní a nepodléhá rekombinaci, tyto vlastnosti usnadňují stanovení. Ideální DNA marker vhodný pro identifikaci jednotlivých druhů by měl být dostatečně proměnlivý mezi druhy (zejména mezi těmi nejbližšími) a měl být dostatečně prostudovaný u velkého počtu druhů tak, aby umožňoval porovnání nukleotidové sekvence z neznámého vzorku s referenčními vzorky z databází. Tyto podmínky nejlépe splnil gen kódující cytochrom b, který je velice často využíván i při

fylogenetických studiích. Tento gen obsahuje jak konzervativní oblasti, které mohou být použity pro amplifikaci u většiny obratlovců, tak oblasti s vysokou variabilitou, které umožňují studium blízce příbuzných druhů. V případě určování plemen nebo geografického původu je důležitá tzv. vnitřně specifická variabilita např. D – smyčkou (D-loop), mikrosatelity nebo kódujícími regiony. Z uveřejněných studií vyplývá, že nejvíce metod je zaměřeno na cytochrom b, dále pak na 12 S, 16S a D-loop⁵.

Pro potvrzení metod nebo analýzy fragmentů lze využít specifického štěpení fragmentů restrikční endonukleasou (PCR-RFLP), sekvenačních technik, současné amplifikace dvou a více fragmentů s různými primery (multiplex PCR) nebo analýzy jednořetězcového konformačního polymorfismu (PCR-SSCP). Další strategie použitá k identifikaci v potravinách je analýza randomní amplifikované polymorfnní DNA (RAPD) a analýza jednoduchých opakujících se sekvencí (mikrosatelity).

Klíčovým bodem některých analýz potravin je kvantifikace, jako např. u geneticky modifikovaných organismů a alergenů, pro něž jsou přípustné limity stanoveny legislativou. Nedostatky klasické PCR se snaží řešit dvě nově vyvinuté kvantitativní metody, a to kvantitativní PCR (QC-PCR) a PCR v reálném čase (RT-PCR). Možnost použití specifických sond a značených primerů při RT-PCR umožňují kontinuální detekci fragmentů, zvyšuje se tak spolehlivost těchto technik a tím i jejich využitelnost pro analýzy potravin⁶.

PCR-RFLP – analýzy produktů PCR pomocí štěpení restrikční endonukleasou

Pomocí primeru navrženého podle sekvence DNA ovčího satelitu I, který byl použit pro amplifikaci, byla amplifikována ovčí a kozí DNA, nikoliv dalších druhů (skot, prase, kuň, kuře, králík). Následnou sekvenační analýzou těchto PCR produktů byla nalezena 92% homologie, ale zároveň byla odhalena 4 restrikční místa, která byla odlišná u ovce a kozy, a tak bylo možné pomocí restrikčních enzymů tyto dva druhy rozlišit. Pomocí restrikčního enzymu *ApaI* byl PCR produkt o velikosti 374 pb rozštěpen na fragmenty 236 a 138 pb. Kozí DNA neobsahuje toto restrikční místo, proto nedošlo k její naštěpení a rozdíl mezi kozí a ovčí DNA bylo možné vizualizovat na agarosové elektroforéze. PCR-RFLP tak našla široké uplatnění u identifikace druhů masa, včetně rybího².

Multiplex PCR

Přesné určení jednotlivých specifických sekvencí u jednotlivých druhů organismů umožňuje navržení řady druhově specifických primerů. Za specifických podmínek tyto primery vytváří DNA produkty daného druhu. Na základě párování druhově specifických primerů s neselektivním protějškem je možné testovat najednou přítomnost více druhů pomocí několika primerů. Multiplex PCR se používá pro stanovení původu masa i ryb².

PCR-SSCP – jednořetězcová konformační polymorfnní analýza

Pro výše zmiňované metody je znalost amplifikované sekvence DNA nezbytná, ale existují i metody, u kterých není tato informace vyžadována. PCR-SSCP je založena na amplifikaci stejného úseku DNA napříč živočišnými druhy, nejčastěji je použit gen mitochondriálního cytochromu b. Vzniklé dvouřetězcové produkty jsou podrobeny denaturaci, následně jednořetězcové úseky zaujmají specifické sekundární struktury, které jsou závislé na jejich sekvenci. Tyto sekundární struktury vykazují při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu různou elektroforetickou pohyblivost, díky které lze rozlišit jednotlivé druhy. Použitím této metody lze rozlišit sekvence lišící se i o jedinou bázi. Pomocí PCR-SSCP lze rozlišit různé druhy ryb⁷.

RAPD – analýza randomní polymorfnní DNA

Tato metoda využívá libovolné primery nebo náhodně amplifikované polymorfnní DNA markery. Primery jsou krátké, obsahují přibližně 10 bazí. Za vhodných podmínek pro PCR dochází k amplifikaci řady lokusů, které tvoří elektroforetický obraz (vzor), obsahující různě velké signály. Tyto obrazy jsou druhově specifické. RAPD se využívá pro stanovení původu masa a druhu ryb¹.

Porovnání metod – výhody a nevýhody

Aplikovatelnost výše zmíněných metod je závislá na výhodách a nevýhodách jednotlivých postupů. Testy založené na DNA hybridizaci jsou zdlouhavé, ke značení sond se často využívá radioaktivity, která je značnou nevýhodou pro manipulaci a likvidaci takového materiálu. Na druhou stranu, lze za vhodných podmínek touto metodou rozlišit v masě řadu různých živočišných druhů i v případě relativně degradované DNA. Hlavní nevýhodou tohoto postupu zůstává potřeba relativně velkého množství přečištěné DNA.

Testy založené na PCR nepotřebují tolik izolovaného materiálu, díky následným amplifikačním krokům. Ani čistota analyzovaného vzorku není tak zásadní jako pro DNA hybridizaci, ale vzorek pro PCR nesmí obsahovat kontaminanty, které by mohly inhibovat reakci. Použití druhově specifických primerů při stanovení pravosti potravin může být výraznou výhodou pro stanovování více druhů najednou. Pro navržení vhodných primerů je samozřejmě nutné znát primární sekvence, stejně tak pro sestavení vhodných pozitivních a negativních kontrol. U PCR bez použití druhově specifických primerů je nutná následná analýza produktů, například na základě sekundárních struktur. Sekvenování je značně zdlouhavé a technicky náročné, ale lze tak získat řadu informací. Dobré výsledky lze získat i RFLP analýzou produktů PCR, které slouží k vyloučení některých druhů a použitím vhodných restrikčních fragmentů lze i četné druhy identifikovat. Nevýhodou této metody může být občasné neúplné naštěpení nebo vnitřní specifická změna DNA, která může způsobit vymizení nebo tvorbu nového re-

strikčního místa, což vede ke vzniku nespecifického (falešného) produktu. Následně po štěpení restrikními enzymy je vhodné provést analýzu velikosti fragmentů pomocí elektroforézy. Analýza amplikonů pomocí SSCP analýzy je vysoce náročná na podmínky, zvláště pak na teplotu, při které jsou produkty podrobeny analýze

a tak je následná interpretace výsledků občas problematická. Ani SSCP ani RAPD nejsou příliš spolehlivé metody, především pro zajištění stabilních reakčních podmínek, které jsou nutné pro reprodukovatelnost výsledků².

Literatura:

1. Martinez I, Malmheden Yman I: *Food Res Int.* 31, 459 (1999).
2. Lockley AK, Bardsley RG: *Trends in Food Science & Technology* 11, 67 (2000).
3. Buntjer JA, Lamine A, Haagsma N and Lenstra JA: *Eur. Food Res. Technol* 2, 191 (1999).
4. Teletchea F, Maudet C, Hänni C: *Trends in biotechnology* 7, 359 (2005).
5. Mafra I, Ferreira IM, Oliveira P: *Eur. Food Res. Technol.* 227, 649 (2008).
6. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM: *Meat Sci.* 68, 431 (2004).
7. Rehbein H, Mackie IM, Pryde S, Gonzales-Sotelo C, et al.: *Inf. Fischwirtsch* 42, 209 (1995).

Souhrn

Machová I.: Důkaz pravosti potravin živočišného původu DNA technologiemi

Metody PCR se úspěšně využívají při určování původních surovin v masných, mlékárenských a rybích produktech.

Obecně se všechny zmíněné metody dají aplikovat pro odhalení použití levnější suroviny místo dražší, nebo odhalit kvalitu přísad, ale důležitá je i interpretace výsledků. Prozatím neexistuje univerzální přesná metoda, která by jednoznačně dokázala určit druhový původ surovin v potravinách. V tomto článku jsou nastíněny současné výzkumné trendy v oblasti DNA technologií pro určování pravosti potravin.

Klíčová slova: pravost potravin, PCR, DNA hybridizace

Summary

Machová I.: Assay of the authenticity of food of animal origine via DNA technologies

PCR methods have been successfully used in identifying the main ingredients of meat, dairy and fish products.

Generally, all the described methods can be applied to detect the substitution of expensive raw materials for by cheaper ones, or reveal the quality of ingredients, but it is the correct interpretation of results. So far there is no universal exact method, which could clearly identify the origin of the ingredients in foods. This article outlines the current research trends in the field of DNA technology for the determination of food authenticity.

Key words: authenticity of food, PCR, DNA hybridization

O B S A H

Úvodem	43
Zpráva z konference: 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition	44
Mezinárodní rok chemie 2011	44
Jiráková H., Roudná M.: Mezinárodní jednání o biologické bezpečnosti skončila úspěšně	45
Biotech 2011 & 5th Czech – Swiss Symposium	47
Olomouc Biotech 2011	48
Škola molekulárních biotechnologií – pozvánka k účasti	49
Viktorová J. et al: Transgenní rostliny určené pro fytořemediace	50
Píchalová R: Použití enzymů v textilním průmyslu	55
Mušálková D: Farmakogenetika a farmakogenomika aneb farmakoterapie šitá na míru	57
Procházková Ž: Makrolidová antibiotika	60
Pospíšilová D: Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu buněk a metody jejich stanovení	63
Machová I.: Důkaz pravosti potravin živočišného původu DNA technologiemi	67

C O N T E N T S

Editorial	43
Report from the conference: 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition	44
International Year of Chemistry 2011	44
Jiráková H., Roudná M.: International negotiations on biosafety ended successfully	45
Biotech 2011 & 5th Czech – Swiss Symposium	47
Olomouc Biotech 2011	48
School of molecular biotechnology – invitation for participation	49
Viktorová J. et al: Transgenic plants intended for phytoremediation	50
Píchalová R.: Application of enzymes in textile industry	55
Mušálková D.: Pharmacogenetics and pharmacogenomics – tailoring the pharmacotherapy	57
Procházková Ž.: Macrolide antibiotics	60
Pospíšilová D.: Physical and chemical properties of the cell surface and their determination	63
Machová I.: Assay of the authenticity of foods of animal origine via DNA technologies	67

POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

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, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

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

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností