
B I P R O S P E C T

Dvacátýtřetí ročník
Číslo 4/2013

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

Doc. 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)

Ing. Martina Nováková, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

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

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

RNDr. Vladimír Vala
Teva, 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)

<http://bts.vscht.cz>

BIOPROSPECT

23th Volume
No. 4/2013

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: COMB CZTPP

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,

i v tomto úvodníku posledního letošního čísla našeho Bioprospectu Vám připomínáme konání mezinárodního biotechnologického symposia BIOTECH 2014 a 6. česko-švýcarského symposia, které se uskuteční příští rok, a to ve dnech 11. – 14. 6. 2014 v Národní technické knihovně v Praze-Dejvicích. Rádi bychom Vás požádali, abyste sledovali webové stránky symposia www.biotech2014.cz, které průběžně aktualizujeme. V nedávné době jsme zde uveřejnili předběžný program a zatím rezervujeme část kapacity pro orální prezentace. Připomínáme, že termín pro zaslání abstrakt pro přednášky se neúprosně blíží a vyprší 15. ledna 2014. Postupně také na webu zveřejňujeme loga firem či institucí, které nám definitivně potvrdili spolupráci při organizaci symposia. Znovu Vás všechny a všechny Vaše spolupracovníky a známé co nejsrději zveme k aktivní i pasivní účasti. Budeme velmi rádi, když informaci o konání symposia zašlete svým zahraničním kolegyním a kolegům. Pevně věříme, že hodnotný profesní program i pečlivě vybraný soubor společenských a kulturních aktivit ocení všichni účastníci. Velmi se těšíme na představení aktivit firem a institucí formou výstavních stánků, inzerátů, reklamních spotů i dalších forem propagace. Pořadatelé symposia jsou připraveni s Vámi projednat způsob propagace a domluvit se na podmínkách spolupráce. Od výrobních podniků, distributorů i dalších organizací bychom uvítali vypsání stipendií pro účast studentů (t.j. zaplacení jejich účastnického poplatku).

Vědeckým pracovníkům připomínáme možnost publikace přehledných článků z jejich oboru ve zvláštním čísle prestižního časopisu *Biotechnology Advances* (impakt faktor trvale kolem 10). Za podmínek placené aktivní účasti a splnění kritérií požadovaných vydavatelem časopisu i publikaci původních sdělení ve zvláštním čísle *Bioprospectu*.

V Bruselu bude 4. prosince 2013 udělena významná cena „Chemistry for the Future Solvay Prize“, která je udělována každé dva roky a je spojena s odměnou 300 000 Euro. Cena byla vyhlášena u příležitosti 150. výročí založení chemické společnosti Solvey panem Ernestem Solveyem, který byl významným podporovatelem vědeckého výzkumu. Výkonný výbor společnosti Solvey rozhodl vytvořit cenu, která by podporovala základní výzkum a ukázala na významnou úlohu chemie při řešení problémů světa a přispívající lidskému pokroku. Kandidáty na cenu navrhuje nomináční výbor složený z 15 významných vědců, který hodnotí významné výsledky dosažené v oblasti biochemie, materiálových věd, biofyziky a chemického inženýrství. Vítěze vybere nezávislá porota pod předsednictvím prof. Hakana Wennerströma (University of Lund, Švédsko). Vzhledem k tomu, že společnost Rhodia

se stala součástí holdingu Solvey byla zrušena cena „Rhodia Pierre-Gilles de Gennes Prize for Science and Industry“ založená v r. 2008 a de facto nalezne pokračování v popisované ceně „Chemistry for the Future Solvay Prize“.

Laureátem ceny „Chemistry for the Future Solvay Prize“ se v roce 2013 stal prof. Peter G. Schultz (ředitel California Institute for Biomedical Research) za práci souhrnně označenou jako „styčná plocha chemie a věd o životě“. Za tímto názvem se skrývají nové metody syntesy molekul s novými chemickými a biologickými vlastnostmi, které nalézají uplatnění v chemii, materiálových vědách a medicíně. (Podrobnější informace o aktivitách prof. Schultze lze nalézt např. na www.solvey.com).

Překotný rozvoj experimentálních technik a informačních technologií, zejména zpracování množství experimentálních dat a tvorba nejrůznějších typů databází, vytvářejí platformu pro studium velmi složitých jevů (např. vzájemné souvislosti mezi různými metabolickými jevy a jejich příčinami). Ze široké palety studovaných problémů bychom dnes rádi upozornili na několik aktuálně studovaných problémů.

Všeobecně je známo, že člověk má dva typy pohlavních chromosomů, ženy mají 2 chromosomy X, zatímco muži mají jeden chromosom X a jeden chromosom Y. Chromosom Y je tedy reprezentantem mužství, resp. samčího pohlaví u ostatních živočichů. Ukázalo se, že v průběhu evoluce se chromosom Y stále zkracuje a nese stále méně genů a tudíž i méně informací. Tento trend ireversibilní degradace chromosomu Y je obecným jevem u všech živočichů. Bylo zjištěno, že před 166 miliony let nesl chromosom Y 1669 genů, zatímco dnes jich má u lidí jen 45. Výpočtem se dá stanovit, že chromosom Y ztrácí za milion let asi 10 genů. Nemusíme se tedy obávat, že v nejbližší době muži vymrou. Podle výše uvedených podkladů by se tak mohlo stát za 4,6 milionu let. Je tedy otázkou, zda v té době budou ještě lidé na planetě nebo si příroda (evoluce) zvolí jiný způsob zachování druhu jak je to ostatně známo u jiných živočichů. (Zájemci o tuto problematiku se mohou více dočíst např. v záznamu přednášky prof. Darrena Griffina (University of Kent), kterou přednesl na webovém semináři Americké chemické společnosti (www.acswebinars.org/end-of-men).

Mezi aktuální problémy patří otázka, do jaké míry ovlivňuje zdraví člověka jeho životní styl a co je vlastně skutečnou příčinou těchto změn. Životní prostředí, strava, kouření, ale také stárnutí vyvolávají zejména změny v metylaci segmentů DNA, aniž by docházelo ke změnám sekvence. Jedná se tedy o epigenetické změny, které ovlivňují funkce určitých genů a způsobují změny metabolismu a následně poškození

některých orgánů a rozvoj nemocí. (Petersen A. K. et al.: Epigenetics meet metabolomics. Human molecular genetics, 2013)

Z plejády nových diagnostických metod nás zaujal nový přístup k rychlé diagnóze chřipky. Chřipka se obtížně diagnostikuje, neboť se často zaměňuje s různými onemocněními, zejména respiračními. S tím je často spojen nekvalifikovaný způsob léčby. Ukazuje se, že účinná medikace antivirotyky musí být aplikována do dvou dnů po objevení příznaků nemoci. Testy s virovými kulturami trvají 3 – 10 dní a tím zabraňují efektivní antivirové léčbě. Nový diagnostický test vychází z poznatku, že hlavními antigeny chřipkového viru jsou hemagglutinin a neuraminidasa a na základě jejich stanovení interakcí s příslušnými sacharidy a vznikajícím barevným signálem lze určit i kmen chřipkového viru. Zavedení rychlého diagnostického testu jistě umožní i snížení chřipkové mortality. Uvádí se, že v USA

zemře každý rok na chřipkové onemocnění cca 36 000 pacientů (www.cli-online.com, A new approach to early diagnosis of influenza).

Odborné články v tomto čísle jsou věnovány fibrinogenu a především jeho modifikaci při oxidačním stresu, dále pak problematice stanovení testosteronu, biologickým účinkům a toxicitě kadmia a receptoru CD36, který se účastní mnoha metabolických procesů.

Závěrem tohoto úvodníku bychom Vám rádi popřáli **příjemné prožití vánočních svátků, pevné zdraví, pohodu a mnoho úspěchů v soukromých i profesních aktivitách po celý rok 2014. Těšíme se na setkání na našem symposium i pokračující celoroční spolupráci.**

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová



BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium

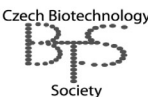
with Exhibition

June 11-14, 2014
Prague,
Czech Republic

BioTech 2014 will concentrate on latest achievements in **microbial biotechnology**, the key technology for bio-based economies. **Lectures will focus on:**

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

Abstracts will be published in **Book of Abstracts** (ISBN), selected fulltexts and reviews in **special issues** of **Bioprospect** and **Biotechnology Advances**.
Rich social program is prepared for symposium participants.
For more details and registration check the website www.biotech2014.cz



MODIFIKACE FIBRINOGENU PŘI OXIDAČNÍM STRESU

Jana Štikarová

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, jana.stikarova@uhkt.cz

Úvod

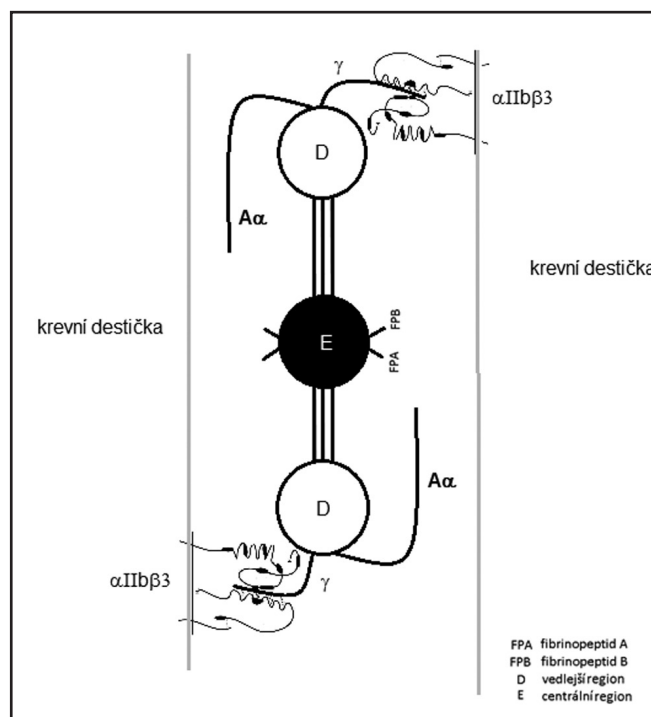
Oxidační modifikace fibrinogenu byla pozorována u řady různých onemocnění: kardiovaskulární onemocnění, rakovina, diabetes, Alzheimerova či jiné neurodegenerativní choroby, revmatoidní artritida a další. Pokud zadáme v databázi PubMed dotaz „fibrinogen modification“ získáme kolem 700 odkazů. Část z nich se týká modifikace povrchu různých materiálů používaných při přípravě cévních náhrad a jiných pomůcek pro snížení adsorpce fibrinogenu, adheze destiček a koagulace krevní plazmy. Asi polovinu odkazů tvoří vedle fosforylace¹, glykosylace nebo přeměny arginylových zbytků na zbytky citrulinu² (probíhající při revmatoidní artritidě) oxidační modifikace. Během posledních dvou desetiletí přineslo studium oxidačních modifikací molekuly fibrinogenu mnoho zajímavých informací, které byly využity i v diagnostice. Stanovení rozsahu modifikace fibrinogenu již bylo navrženo v diagnostice pankreatitidy³, rakoviny vaječníků¹, či k posouzení přítomnosti oxidačního stresu⁴ obecně. Publikované práce se sice shodují v názoru, že vyvolané strukturní změny molekuly fibrinogenu ovlivňují tvorbu fibrinové sítě a jeho schopnost vázat krevní destičky, ale není úplně jasné, zda jsou výsledné dopady modifikace fibrinogenu spíše protrombotické či krvácivé. Ve většině případů je zatím fibrinogen modifikovaný *in vivo* spojován s rizikem trombotických komplikací.

Fibrinogen

Fibrinogen je plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa. Skládá se ze tří párů neidentických řetězců α , β a γ . Na N-koncích α a β řetězců se nacházejí fibrinopeptidy A a B, které vystupují z centrálního regionu (E). Ten je tvořen N-konci všech řetězců, kdežto dva vedlejší regiony (D) obsahují C-konce řetězců β a γ . Řetězec α prochází vedlejším regionem a vytváří vlastní α C doménu.

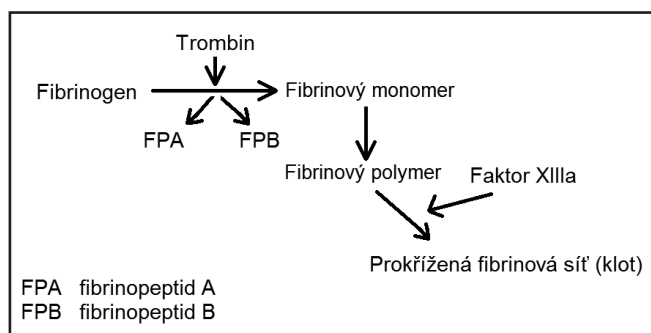
Fibrinogen je důležitým prvkem hemostázy. Na zástavě krvácení v případě poškození cévy se podílí dvěma způsoby. Prvním je přímé spojování jednotlivých krevních destiček molekulami fibrinogenu (Obr. 1). Agregací a adhezí krevních destiček v místě poškození vzniká hemostatická zátká. Dalším krokem je tvorba fibrinové sítě, jež ji zpevňuje. Tvorba sítě začíná odštěpením fibrinopeptidů z fibrinogenu, které je katalyzováno trombinem. Vzniká tak fibrinový monomer, jehož polymerizací se tvoří tzv. protofibrily a následně i fibrinová síť prokřížená katalytickým působením glutamyltransferasy (koagulačním faktorem XIIIa) (Obr. 2)⁵.

Vznik hemostatické zátky a její odstranění jsou důležité pro zachování hemostázy. Porušení rovnováhy při koagulačních pochodech může vyústit v ucpání neporaněných cév, vznikem trombu uvnitř cévy. Veškeré



Obr. 1: Agregace krevních destiček za účasti sekvence na γ -řetězci (γ 400 – 411).

změny struktury fibrinogenu mohou významně ovlivnit jak tvorbu fibrinové sítě, její degradaci i interakci fibrinogenu s krevními destičkami a dalšími tělisky a buňkami v krvi, krevní stěně a v subendotelu. Významné posttranslační modifikace fibrinogenu jsou způsobeny působením různých látek vznikajících během tzv. oxidačního stresu.



Obr. 2: Schéma polymerace fibrinu.

Fibrinogen je v plazmě, hlavně vzhledem ke své velikosti a koncentraci, bílkovinou nejnáze modifikovatelnou produkty oxidačního stresu⁶. Tato jeho náchylnost a důležitá role při procesu tvorby trombu představují možnou souvislost se zvýšením trombotického rizika u pacientů.

Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako stav organismu, při kterém je porušena dynamická rovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty⁷. Prooxidanty představují v definici oxidačního stresu látky způsobující či podporující oxidaci cílových molekul. Antioxidanty jsou pak látky, které inhibují tvorbu prooxidantů a inhibují oxidaci. Většinu oxidantů lze zařadit do jedné ze dvou velkých skupin, kterými jsou reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species). Mnoho oxidačních látek je v organismu fyziologicky přítomno, avšak jejich produkce je přísně regulována. Nacházejí se v signálních drahách nebo se účastní přirozené imunitní obrany. Při obraně organismu proti cizorodým látkám, bakteriím a podobně jsou buňkami vytvářeny při metabolismickém vzplanutí velice účinné oxidanty jako je peroxid vodíku nebo chlornan produkovaný z peroxidu vodíku a chloridových iontů působením myeloperoxidasy. Dojde-li k narušení rovnováhy zvýšenou produkcí prooxidantů, např. při zánětlivých procesech, nebo při selhání antioxidační obrany, reagují vznikající velice reaktivní látky i mimo vymezené oblasti působení a tím dochází k poškození organismu. Mezi prooxidanty patří nízkomolekulární látky jako volné radikály, singletový kyslík, anion radikál hyperoxidu, peroxid vodíku, uve-

dený chlornan a další a také enzymy, které je produkují (NADP(H) oxidasa – NOX, xanthin oxidasa, myeloperoxidasa a další). Jako antioxidanty slouží nízkomolekulární látky jako tokoferol, kyselina askorbová, kyselina močová, glutathion, flavonoidy apod a enzymatické systémy snižující koncentraci prooxidantů (glutathionperoxidasa, katalasa, superoxiddismutasa, thioredoxin reduktasa). Účinkem produktů oxidačního stresu může být modifikována v podstatě jakákoli nízkomolekulární či makromolekulární látka včetně DNA, proteinů, lipidů, polysacharidů^{7,8,9}. Mohou být oxidovány také koenzymy/kofaktory, ztrácející tak své vlastnosti potřebné ke správnému fungování enzymatických systémů. Například při oxidaci koenzym NO syntasy tetrahydrobiopterinu, dochází místo produkce NO k tvorbě hyperoxidu¹⁰. Při oxidační modifikaci bílkovin může docházet k jejich fragmentaci i zesíťování a různým způsobem mohou být modifikovány boční řetězce aminokyselinových zbytků. Vznikají například nové reaktivní karbonylové skupiny, chlorderiváty a nitroderiváty aminokyselinových zbytků tyrosinu a tryptofanu, dochází k oxidaci disulfidových vazeb postupně za vzniku sulfenových, sulfinových a sulfonových funkčních skupin, thioether v methioninu je oxidován na sulfoxid a podobně (Tab. I)¹¹. Uvedené modifikace aminokyselinových zbytků byly pozorovány i u fibrinogenu.

Tab. I: Modifikace aminokyselin – přehled¹⁰

modifikace	aminokyselina	zdroj oxidace
disulfidy, glutathion	Cys	vše, ONOO ⁻
methionin sulfoxid	Met	vše, ONOO ⁻
karbonylové skupiny (aldehydy, ketony)	Většina	Vše
oxo-histidin	His	γ-záření, MCO, ¹ O ₂
dityrosin	Tyr	γ-záření, MCO, ¹ O ₂
chlortyrosin	Tyr	HOCl
nitrotyrosin	Tyr	ONOO ⁻
modifikace tryptophanilu (N-formyl)kynurenin	Trp	γ-záření
hydro(pero)xy deriváty	Val, Leu, Tyr, Trp	γ-záření
chloraminy, deaminace	Lys	HOCl
Adukty produktů lipoperoxidace (MDA, HNE, acrolein)	Lys, Cys, His	γ-záření, MCO
Adukty oxidace aminokyselin	Lys, Cys, His	HOCl
Adukty glykoxidace	Lys	Glukosa
prokřížení, agregáty a fragmentace	některé	Vše

Vysvětlivky: MCO – kovem katalyzovaná oxidace; vše – γ-záření, MCO, ¹O₂, HOCl, ozón

Fibrinogen a oxidační stres

Při objasňování vzniku oxidačních modifikací v molekule fibrinogenu byly v řadě prací využity látky, které se vytvářejí za patofyziologických podmínek oxidačního stresu. Takto vyvolané změny v molekule sice ovlivnily schopnosti fibrinogenu ve všech publikovaných pracích, ale jejich závěry jednotné nejsou. Někteří autoři se přiklání ke snížení schopnosti modifikovaného fibrinogenu tvořit fibrinovou síť^{6,12}, jiní naopak popisují její rychlejší tvoření^{13,14}. Tato nejednotnost se týká i interakce fibrinogenu s krevními destičkami.

První práce v této problematice byly vykonány týmem kolem E. Shacter. Fibrinogen, modifikovaný oxidačním systémem, obsahujícím železité ionty a kyselinu askorbovou, produkujícím hydroxylové radikály, vykazoval signifikantně sníženou schopnost tvořit fibrinovou síť. V takto modifikovaném fibrinogenu byly detegovány nově vzniklé karbonylové skupiny a dityrosiny^{6,15}.

S přibývajícím experimentálními výsledky využívajícími různé oxidační systémy, se rozšířilo spektrum pozorovaných výsledných strukturních i funkčních změn způsobených v molekule fibrinogenu.

Vadseth et al¹³ používali k modifikaci fibrinogenu peroxidusitan vzniklý rozpadem 3-morpholinosydnoniminu. Z modifikovaného fibrinogenu se rychleji tvořila fibrinová síť, jež měla následně i odlišnou strukturu v porovnání s kontrolní. Jejich práce tak spojila nitrovaný fibrinogen s trombotickými komplikacemi¹³. Nowak et al. však dospěli k rozdílným výsledkům. Podle této skupiny způsobené změny snižují schopnost tvořit fibrinovou síť¹⁴.

K pozměnění struktury fibrinogenu byly použity i různé thiohy. Homocystein a jeho thiolakton svou přítomností ovlivnily tvorbu a vlastnosti fibrinové sítě. Vzniklá vlákna mají menší průměr, jsou těsněji sbalená a mají vyšší rezistence vůči fibrinolýze¹⁶.

Fibrinogen vystavený působení γ -záření způsoboval zvýšení agregace krevních destiček, zvýšení indukce IL-8 v endoteliálních buňkách, narušení mikrorheologických vlastností, snížení deformability erytrocytů, změnu viskozity a klotovacích parametrů, zvýšenou formaci komplexů mezi krevními destičkami a leukocyty¹⁷.

Velký rozvoj studia modifikovaného fibrinogenu *in vivo* nastal v posledním desetiletí. V naprosté převaze je modifikovaný fibrinogen spojován se zvýšením rizika trombózy u pacienta.

Nejčastější skupinou onemocnění spojenou s modifikovaným fibrinogenem jsou kardiovaskulární choroby. V České republice nejvíce umírají lidé s ischemickou chorobou srdeční. V případě pacientů s touto chorobou dochází k nitraci fibrinogenu. Byl nalezen o 30 % vyšší obsah nitrovaných skupin fibrinogenu než u kontrolních vzorků¹³.

Modifikovaný fibrinogen byl detegován i při infarktu myokardu, srdečním selhání, diabetu a zánětlivým stavům (Tab. II).

Úroveň modifikace proteinů lze ovlivnit i životním stylem. Z plazmy kuřáků byl izolován fibrinogen, který obsahoval více 3-nitrotyrosinových zbytků než kontrolní fibrinogen získaný z plazmy nekuřáků. Síť z něj vytvořená obsahovala více vláken, která však byla tenčí¹⁸.

Tab. II: *In vivo* modifikovaný fibrinogen (příklady častých onemocnění)

onemocnění	nalezené modifikace	odlišnosti v biologické funkci	výsledný efekt
ischemická choroba srdeční ¹³	nitrace	rychlejší tvorba sítě, odlišná architektura sítě	trombotické
akutní infarkt myokardu ²⁰	karbonylace	vyšší agregace krevních destiček	trombotické
post infarkt myokardu ²¹	karbonylace, chlortyrosily	odlišná struktura fibrinové sítě	trombotické
akutní koronární syndrom ²²	–	odlišná struktura fibrinové sítě, pomalejší degradace fibrinové sítě	trombotické
srdeční selhání ²³	oxidace fibrinogenu	–	–
diabetes mellitus ²⁴	glykace	snížená permeabilita a degradace fibrinové sítě, odlišná struktura fibrinové sítě	trombotické
popáleniny ²⁵	karbonylace	ovlivnění agregace krevních destiček	–
zánětlivá onemocnění ²⁶	nitrace	rychlejší tvorba sítě	trombotické
Kouření ¹⁸	nitrace	odlišná struktura fibrinové sítě	trombotické

Vezmeme-li v úvahu výsledky získané ze studia vzorků od pacientů a porovnáme-li je s údaji získanými *in vitro*, lze v souhrnu říci, že výsledný efekt závisí na množství vzniklých modifikací, jejich umístění v řetězci a látce, která je vyvolala^{15,19}. Nitracce byly opakovaně prokázány ve spojitosti s fibrinogenem jako rizikový faktor pro vznik trombóz. Při *in vivo* probíhající modifikaci fibrinogenu i dalších bílkovin je působení oxidačního stresu komplexním souborem současně probíhajících reakcí s různými látkami. Silnější a rychleji působící modifikační činidla mohou v celkovém účinku převážet nad působením pomaleji reagujících nebo slabších činidel.

Závěr

Oxidačně pozměněný fibrinogen a další proteiny jsou uváděny v souvislosti se vznikem a rozvojem závažných onemocnění jako jsou neurodegenerativní onemocnění, kardiovaskulární choroby, zhoubná onemocnění či diabetes mellitus. To, do jaké míry se modifikované proteiny účastní geneze jednotlivých chorob nebo

vznikají v jejich důsledku a jsou příčinou komplikací onemocnění, je otázkou, na kterou se stále hledá odpověď. Už samotné průkazné spojení průběhu chorob s oxidačním stresem však naznačuje, že monitorováním oxidačního stresu a jeho ovlivněním je možné podstatně ovlivnit i průběh a dopad onemocnění, tzn. průběh nemoci a rozvoj případných komplikací. Mezi nejzávažnější komplikace patří vznik trombu a jeho možné putování krevním řečištěm. Významnou částí trombotických komplikací je nesprávná aktivace koagulační kaskády (na nevhodném místě a v nevhodném čase) a nadměrná adheze a agregace krevních destiček. Proto je studium oxidačních modifikací fibrinogenu, které mění jeho strukturu a funkci, důležité pro pochopení jejich podílu na vzniku trombóz. Zevrubnějším poznání mechanismu oxidační modifikace a jejího vlivu na vlastnosti fibrinogenu může být ve svých důsledcích cestou vedoucí ke snížení rizika trombóz u patofyziologických stavů a tím ke snížení vznikajících komplikací provázejících řadu jinak odlišných onemocnění.

Literatura:

1. Ogata Y, Heppelmann CJ, Charlesworth MC, et al.: *J. Proteome Res.* 5, 3318 (2006).
2. Gilliam BE, Reed MR, Chauhan AK, et al.: *Pediatr. Rheumatol.* 9, 8 (2011).
3. Schmidt D, Brennan SO: *Clin. Chem.* 53, 2105 (2007).
4. Selmecci L, Seres L, Székely M, et al.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 379 (2010).
5. Weisel JV: *Adv. Protein Chem.* 70, 247 (2005).
6. Shacter E, Williams JA, Levine RL: *Free Radic. Biol. Med.* 18, 815 (1995).
7. Sies H: *Eur. J. Biochem.* 215, 213 (1993).
8. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al.: *World Allergy Organ. J.* 5, 9 (2012).
9. Alfadda AA, Sallam RM: *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 936486 (2012).
10. Štikarová J, Sutttnar J, Pimková K, et al.: *J. Hematol. Oncol.* 6, 58 (2013).
11. Shacter E: *Drug Metab. Rev.* 32, 307 (2000).
12. Piryazev AP, Aseychev AV, Azizova OA: *Bull. Exp. Biol. Med.* 148, 881 (2009).
13. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, et al.: *J. Biol. Chem.* 279, 8820 (2004).
14. Nowak P, Zbikowska HM, Ponczek M, et al.: *Thromb. Res.* 121, 163 (2007).
15. Štikarová J, Kotlín R, Sutttnar J, et al.: *Vnitř. Lék.* 58(Suppl 2), 70 (2012).
16. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, et al.: *Biochemistry* 45, 2480 (2006).
17. Azizova OA, Aseychev AV, Piryazev AP, et al.: *Bull. Exp. Biol. Med.* 144, 397 (2007).
18. Barua RS, Sy F, Srikanth S, et al.: *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 75 (2010).
19. Štikarová J, Kotlín R, Riedel T, et al.: *The Scientific World Journal* 2013, Article ID 359621 (2013).
20. Ragino YI, Baum VA, Polonskaya YV, et al.: *Bull. Exp. Biol. Med.* 145, 412 (2008).
21. Paton LN, Mocatta TJ, Richards AM, et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 48, 223 (2010).
22. Undas A, Szuldrzynski K, Stepień E, et al.: *Atherosclerosis* 196, 551 (2007).
23. Banfi C, Brioschi M, Barcella S, et al.: *Eur. J. Heart Fail.* 10, 244 (2008).
24. Pieters M, Covic N, van der Westhuizen FH, et al.: *Tromb. Haemost.* 99, 691 (2008).
25. Levin GY, Egorihina MN: *Burns* 36, 806 (2010).
26. Heffron SP, Parastatidis I, Cuchel M, et al.: *Free Radic Biol Med.* 47, 1140 (2009).

Souhrn

Štikarová J.: Modifikace fibrinogenu při oxidačním stresu

V České republice jsou tři čtvrtiny úmrtí spojeny s diabetem mellitus, ischemickou chorobou srdeční a s poruchami oběhového systému. Tato onemocnění mají společné i zvýšené riziko trombózy. Ve více než třetině případů se nedaří zdroj trombotických komplikací odhalit. Jednou z příčin vzniku trombóz by mohla být posttranslační modifikace fibrinogenu, jejíž výskyt byl zaznamenán u řady patofyziologických stavů. Změny ve struktuře fibrinogenu ovlivňují jeho funkční vlastnosti, ke kterým především patří schopnost tvořit fibrinovou síť a vázat krevních destičky při tvorbě krevní zátky a trombu.

Klíčová slova: modifikovaný fibrinogen, trombóza

Summary

Štikarová J.: Modification of fibrinogen during oxidative stress.

In the Czech Republic, three-quarters of deaths is associated with diabetes mellitus, ischemic heart disease and circulatory disorders. These diseases have in common an increased risk of thrombosis. In more than a third of cases, the cause of thrombotic complications is unknown. Modified fibrinogen might play role in thrombotic events. Post-translational modified fibrinogen has been observed in many pathophysiological conditions. Changes in the structure of fibrinogen affect its ability to form fibrin net and affect interactions with platelets.

Keywords: modified fibrinogen, thrombosis

STANOVENÍ TESTOSTERONU

Bohdana Havlásková

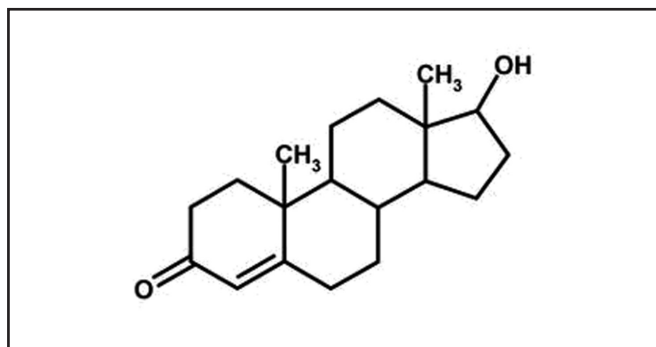
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, havlaskb@vscht.cz

Úvod

Hormony jsou látky produkované endokrinními žlázami a vylučovány do krevního oběhu, odtud jsou pak transportovány k cílovým orgánům. Lze je dělit podle několika kritérií: podle místa vzniku (hormony pankreatu, hormony kůry nadledvinek apod.), dále podle fyziologické funkce (např. pohlavní hormony, růstové hormony), a v neposlední řadě dle chemického původu na hormony peptidové, hormony odvozené od aminokyselin a hormony steroidní.

Steroidní hormony jsou látky lipofilní povahy, které vznikají biotransformací cholesterolu v gonádách a kůře nadledvin^{1,2}.

Řadí se zde mineralokortikoidy, glukokortikoidy a pohlavní hormony, které se dále dělí na androgeny a estrageny. Testosteron, jehož struktura je znázorněna na obrázku (Obr. 1), řadíme do skupiny androgenů².



Obr. 1: Strukturní vzorec molekuly testosteronu

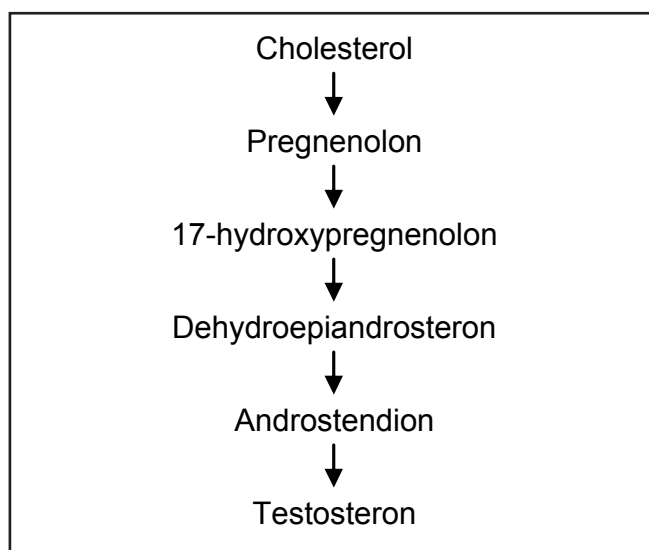
Taktéž lze steroidní hormony dělit na přirozené a syntetické. Přirozené hormony se běžně vyskytují v organismu a jsou produktem metabolických drah, zatímco syntetické hormony jsou připravovány farmaceutickým průmyslem. Takto uměle syntetizované látky slouží především k léčebným účelům. Často jsou však zneužívány při sportu jako doping u lidí a také se nelegálně podávají zvířatům pro zvýšení jejich produktivity chovu. Z těchto důvodů je rozvoj metod na stanovení steroidů stále populárnější a je snaha vyvinout metody méně náročné na instrumentální vybavení s jednoduchým provedením a především s nižšími náklady.

Syntéza testosteronu

Testosteron patří mezi nejvýznamnější zástupce skupiny androgenů. Jeho syntéza probíhá především v intersticiální tkáni varlete Leydigovými buňkami, které jsou vymezeny mezi semenotvornými kanálky. V malé míře je také testosteron produkován nadledvinami³.

V gonádách je reakce stimulována luteinizačním hormonem (LH) a nikoli adrenokortikotropním hormonem (ACTH), jako je tomu u produkce testosteronu nadledvinami³. Prekurzorem pro syntézu testosteronu, jakožto pro steroidní hormony obecně, je choleste-

rol. Zdrojem cholesterolu je krevní lipoprotein nízkodenzitní lipoprotein (z angl. LDL – low density lipoprotein) nebo cholesterol vzniklý syntézou z acetátu. K přeměně cholesterolu na testosteron je zapotřebí několika enzymatických kroků, které jsou převážně katalyzovány skupinou enzymů cytochrom P450. Odštěpením šestiuhlíkatého zbytku z cholesterolu vzniká pregnenolon. Z něj, řadou dalších enzymatických reakcí, vzniká testosteron (Obr. 2)^{4,5}.



Obr. 2: Stručný přehled biosyntézy testosteronu, katalyzované enzymy patřící mezi cytochromy P450.

Inaktivace testosteronu probíhá v játrech, kde je testosteron deaktivován oxidačními reakcemi a následně konjugován s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem a odváděn játry do žluče nebo ledvinami do moče⁶.

Biologické účinky testosteronu

V průběhu prenatálního vývoje plodu zajišťuje testosteron vývoj mužského genitálu a později sestup varlat do šourku. V pubertě poté navozuje růst zevních pohlavních orgánů a také ovlivňuje sekundární pohlavní znaky (př. změna výšky hlasu, růst vousů, vlasů). Ovlivňuje spermatogenezi, metabolismus a tloušťku kůže a také metabolismus vápníku, jehož vlivem se zvyšuje objem kostní hmoty a ukládání vápníku, později ukončuje růst kostí a mění jejich tvar na mužský typ. Anabolicky působí na proteosyntézu, která má vliv na vytvoření větší svalové hmoty. Další důležitou vlastností je stimulace produkce erytropoetinu. Ten má vliv na rychlejší regeneraci tkání⁷.

Účinky testosteronu můžeme tedy rozdělit na androgenní a anabolické. Právě kvůli anabolickým účinkům jsou často testosteron a jeho synteticky připravené deriváty nezákonně zneužívány.

Patobiochemie testosteronu

Poruchy spojené s testosteronem souvisejí s jeho sníženou či zvýšenou tvorbou. Nejběžnější poruchou je jeho nedostatečná produkce a s tím spojený vznik hypogonadismu, který je charakterizován typickými symptomy jako je náladovost, sexuální dysfunkce, snížení svalové hmoty a síly a pokles hustoty kostní tkáně.

Hypogonadismus lze dělit na primární a sekundární. Primární onemocnění má příčinu v defektech gonád, které jsou způsobeny např. genetickými a vývojovými poruchami (např. Klinefelterův syndrom), infekcemi apod.

Sekundární hypogonadismus může být způsoben obezitou, Kallmanovým syndromem, idiopatií nebo vaskulitidou.

Zvýšená hladina testosteronu může být způsobena nádory varlat, nadledvin, ale také jeho zneužíváním (např. při sportu) nebo předčasnou pubertou u chlapců⁷. Referenční hodnoty testosteronu jsou uvedeny v tabulce (Tab. I).

Léčba hypogonadismu

Ke zmírnění účinků hypogonadismu byla vyvinuta řada náhrad chybějícího testosteronu. K léčbě se nejčastěji využívají svalové injekce ve formě různých esterů testosteronu v pozici 17 β -hydroxylové skupiny, což umožňuje jejich použití jako dlouho působící depot. Různé estery mají různý poločas působení.

Ke zmírnění účinků hypogonadismu byla vyvinuta řada náhrad chybějícího testosteronu. K léčbě se nejčastěji využívají svalové injekce ve formě různých esterů testosteronu v pozici 17 β -hydroxylové skupiny, což umožňuje jejich použití jako dlouho působící depot. Různé estery mají různý poločas působení.

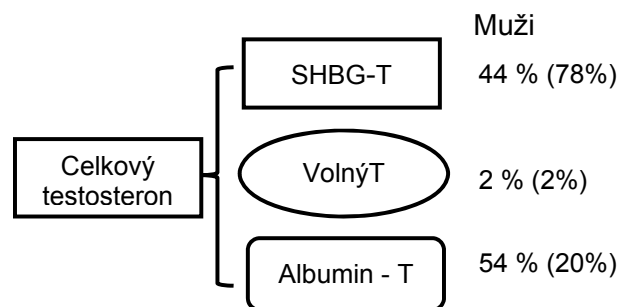
Dále se využívají implantáty, které se aplikují subkutánně ve třech až šesti dávkách jednou za 4 až 6 měsíců. Kvůli nízké efektivitě při orálním podání esterů testosteronu je nutno léčivo podávat i několikrát za den. Nejméně se využívají testosteronové náplasti a gely^{8,9}.

Tabulka I: Referenční hodnoty testosteronu naměřené chemiluminiscenční imunoanalýzou pomocí analyzátoru ADVIA:Centaur na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (ÚLBLD).

Věk	Koncentrace testosteronu v séru nmol/ml	
	Muži	Ženy
0 – 12 let	0,2 – 6,1	0,2 – 0,7
12 – 15 let	0,3 – 27,8	0,3 – 1,4
15 – 50 let	5,4 – 30,4	0,3 – 5,8
≥ 50 let	5,4 – 19,5	0,4 – 4,5

Stanovení testosteronu

V krvi cirkuluje testosteron ve třech formách. Vázaný na sexuální hormony vázající globulin (SHBG), tvořený v játrech, dále vázaný na plasmatickou bílkovinu albumin a třetí formu tvoří volný testosteron (z angl. FT – free testosterone). Pouze volná frakce, jejíž objem činí pouhých 2% z celkového testosteronu, prostupuje buněčnou membránou a reaguje s androgenním receptorem regulující expresi cílového genu. Procentuální zastoupení jednotlivých forem uvádí obrázek (Obr. 3)¹⁰.



Obr. 3: Distribuce cirkulujícího testosteronu u mužů, resp. žen (hodnoty uvedeny v závorce).

Stanovení celkového testosteronu bývá často postačující, avšak výsledky jsou méně spolehlivé. Hodnota celkového testosteronu bývá ovlivňována různými faktory, jako např. obezita, testosteronová či estrogenová léčba, které ovlivňují afinitu k vazebné bílkovině^{11,12}.

Testosteron se stanovuje nejčastěji pomocí chromatografických nebo imunochemických metod. Jednotlivé metody budou následně popsány.

Chromatografické metody

Chromatografické metody slouží jak k preparativním, tak i analytickým účelům a podávají kvantitativní i kvalitativní informace. K detekci steroidních hormonů se nejčastěji využívá propojení s hmotnostní spektrometrií.

Pro jejich schopnost podávat citlivé a specifické výsledky patří chromatografie mezi nejrozšířenější metody ke stanovení steroidů. Nevýhodou je však náročnost přípravy vzorku, doba analýzy a také cena. Z těchto důvodů nejsou příliš vhodné pro rutinní analýzy v klinických laboratořích.

Nejpoužívanějšími metodami jsou GC-MS (z angl. gas chromatography–mass spectrometry) a LC-MS (z angl. liquid chromatography–mass spectrometry).

Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je separační metoda, jejímž principem je distribuce látek mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je plyn (v literatuře je nejčastěji uváděno helium), stacionární fází tvoří pevná (adsorpční GC) či kapalná (rozdělovací GC) složka. Kvůli nízké teplotní stabilitě testosteronu je nutná derivatizace vzorku.

Všechny steroidy nelze rozdělit pomocí GC, proto je velmi časté spojení GC s identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Vzhledem k rozdílným molekulovým hmotnostem je možno jednotlivé molekuly rozlišit v hmotnostním spektru.

GC-MS je metoda s dobrou citlivostí a přesností. Ke kontrole nelegálního zneužívání androgenních anabolických steroidů slouží tato metoda jako potvrzovací¹³.

Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie má velmi podobný princip jako GC, liší se v mobilní fázi, kterou tvoří v tomto případě kapalina (v literatuře často uváděn poměr: methanol – voda (20:80)).

LC-MS je metoda rychlá, specifická a citlivá. Nevyžaduje derivatizaci vzorku, jako je tomu u GC-MS a zahrnuje jednodušší extrakční kroky.

Bylo také publikováno několik metod LC-MS/MS pro analýzu androgenních anabolických steroidů z různých biologických matric, jako je moč, jaterní tuk, vlasy apod^{14,15}.

Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je interakce protilátky s antigenní determinantou, proti které byla protilátka připravena. Využívá se vysoké afinity protilátky k antigenu.

Imunochemické metody lze rozdělit do několika skupin. Podle vytvořeného imunokomplexu se dělí na precipitační, jejímž principem je vytvoření nerozpustného imunoprecipitátu (př. nefelometrie) a na metody neprecipitační, které slouží k detekci nízkých koncentrací antigenu a protilátky, kdy ještě nedochází k tvorbě imunoprecipitátu. V tomto případě se stanovení provádí navázáním vhodné značky na jednoho z imuno-reaktantů¹⁶.

Podle použité značky se neprecipitační metody dále dělí na radioizotopové, enzymové, chemiluminiscenční apod.

Imunochemické metody jsou pro stanovení steroidů, tedy i testosteronu, považovány za alternativní či zcela komplementární k chromatografickým metodám. Vyznačují se svou jednoduchostí, časovou nenáročností a především nízkou cenou. Jejich popularita v posledních letech stoupá.

Radioimunoanalýza (RIA)

RIA metody patří mezi první vyvinuté imunochemické metody pro stanovení testosteronu, nejčastěji používanou značkou je izotop ¹²⁵I. Vzhledem k bezpeč-

nosti práce, nákladům a rychlosti analýzy byly postupem času RIA metody nahrazeny enzymovými metodami¹⁷.

Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)

Mezi další často používané metody ke stanovení testosteronu v klinických laboratořích patří chemiluminiscenční imunoanalýza.

Principem metody je chemická reakce, která vyvolá excitaci elektronů. Při návratu na základní úroveň dochází k vyzáření světla. Jeden z imuno-reaktantů je značen enzymem peroxidasou (nezjišťuje se jeho reaktivita, jako je tomu u EIA). Přidáním substrátu, luminolu nebo izoluminolu, a peroxidu vodíku dochází k chemické reakci. Enzym peroxidasa katalyzuje oxidaci luminolu peroxidem vodíku za vzniku aminoftalátového dianionu v excitovaném stavu, který při návratu do základního stavu vykazuje luminiscenci a vzniká modré světlo^{18,19}.

Imunochromatografický test (ICT)

Imunochromatografický test je založen na principu papírové chromatografie a interakce antigenu s protilátkou. V anglické literatuře se vyskytuje nejčastěji pod zkratkou LFIA (z angl. lateral flow immunoassay). Výhodou metody je minimální příprava vzorku, jednoduché vybavení a především rychlost detekce (cca 15 min).

Imunochromatografického principu bylo využito v práci Inoue *et. al.*, publikované v roce 2007. Pro detekci testosteronu použili elektrochemický imunosenzor. Celý test probíhal na nitrocelulóзовé membráně, přičemž enzymová reakce mezi peroxidem vodíku a křenovou peroxidasou navázanou na testosteronu byla detekována ampérometricky²⁰.

Závěr

Nejrozšířenějšími metodami pro stanovení hladiny testosteronu v krvi jsou metody chromatografické, které poskytují citlivé a specifické výsledky. V poslední době bývají však nahrazovány imunochemickými metodami, jejichž předností je především nízká cena, jednoduchost provedení a časová nenáročnost.

Ve srovnání s chromatografickými metodami jsou metody imunochemické méně specifické, nevýhodou jsou především horší detekční limity a proto jsou mnohdy považovány za metody doplňkové k metodám chromatografickým. Snahou je tedy snížit detekční limity a zvýšit specifitu.

Literatura:

1. Hampl F, Paleček J: Farmakochemie. VŠCHT, Praha (2002).
2. Trojan S: Lékařská fyziologie. 4. vydání, Grada Publishing, Praha (2003).
3. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, et al.: *Science* 173, 1036 (1971).
4. Baird DT, Galbraith A, Fraser IS, Newsam JE: *J Endocrinol.* 57, 285 (1973).
5. Freeman DA, Ascoli M: *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 754, 72 (1983).
6. van Eenoo P, Delbeke FT: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 161 (2006).
7. Nieschlag E, Behre HM, Bouchard P, et al.: *Hum. Reprod. Update* 10, 409 (2004).
8. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 216 (1990).
9. Behre HM, Wang C, Handelsman DJ, et al.: Pharmacology of testosterone preparations. In: Nieschlag E, Behre HM (eds). Testosterone – action, deficiency, substitution. 3rd ed. Cambridge University Press, United Kingdom, 405 (2004).
10. Yeap BB, Wilce JA, Leedman PJ: *BioEssays* 26, 672 (2004).
11. Swerdloff RS, Wang C: *ClinChem* 54, 458 (2008).
12. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1995 (2006).
13. Gaillard Y, Vayssette F, Balland A, Pépin G: *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 735, 189 (1999).

14. Kaklamanos G, Theodoridis G, Dabalís T: *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2330 (2009).
15. Chen Y, Yazdanpanah M, Wang XY, et al.: *Clin. Biochem.* 43, 490 (2010).
16. Králová B, Fukal L, Rauch P, Ruml T: Bioanalytické metody. VŠCHT, Praha (2001).
17. van Peteghem CH, van Look LJ: *Anal. Chim. Acta* 205, 223 (1988).
18. Kim JK, Adam A, Loo JCK, Ong H: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 885 (1995).
19. Van Look LJ, Van Peteghem CH: *Anal. Chim. Acta* 248, 207 (1991).
20. Inoue K, Ferrante P, Hirano Y, et al.: *Talanta* 73, 886 (2007).

Souhrn

Havlásková B.: Stanovení testosteronu

Testosteron, patří do skupiny steroidních hormonů, je u mužů produkován především v Leydigových buňkách. Jeho účinky lze dělit na androgenní (např. sekundární pohlavní znaky) a anabolické (stimulace proteosyntézy, rychlá regenerace). Právě kvůli anabolickým účinkům je často nezákonně zneužíván. Stanovení hladiny testosteronu se provádí metodami chromatografickými nebo stále populárnějšími imunochemickými, které se vyznačují svou jednoduchostí a především nižšími náklady.

Klíčová slova: steroidy, testosteron, stanovení

Summary

Havlásková B.: Detection of testosterone

Testosterone, which belongs to the group of steroid hormones, is among men produced in Leydig cells. Its effects can be identified either as androgenic (e.g. secondary sex characteristic) or anabolic (stimulation of proteosynthesis, fast regeneration). Especially because of anabolic effect it has been largely illegally used. Determination of testosterone level is performed by chromatography methods or nowadays by more popular immunochemical methods, which are simpler and have lower costs.

Keywords: steroids, testosterone, detection

BIOLOGICKÉ ÚČINKY A TOXICITA KADMIA

Melčová Magdalena¹, Knížek Martin¹, Zídková Jarmila¹, Zídek Václav²

¹ Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, melcovam@vscht.cz

² Fyziologický ústav AV ČR v Praze

Úvod

Těžké kovy jsou přirozenou součástí životního prostředí. Běžně se vyskytují pouze v malých koncentracích, ovšem vlivem lidské činnosti jejich množství v prostředí stoupá. Na významu tak nabývá otázka jejich vlivu na lidský organismus.

K člověku se tyto kovy dostávají z různých zdrojů – z kontaminovaného vzduchu, vody, půdy nebo potravin. Hromadí se v organismu a mohou způsobovat poruchy různých biologických funkcí a systémů. Fungují jako katalyzátory oxidačních reakcí biologických makromolekul, proto je jejich toxicita spojována s oxidačním poškozením tkání. Nepříznivé působení redoxně aktivních kovů (měď, železo, chrom) se odvíjí od jejich účasti v redoxních cyklech, při kterých dochází ke vzniku hydroxylového radikálu (např. Fentonovy reakce). Hydroxylový radikál je extrémně reaktivní, tudíž vysoce toxický pro živé buňky. Redoxně inaktivní kovy (olovo, kadmium, arsen, rtuť) nejsou schopny účastnit se těchto redoxních dějů, a proto jejich nežádoucí účinky souvisí s celkovou změnou oxidačního stavu organismu, neboť snižují hladiny jak enzymatických, tak neenzymatických antioxidantů – zejména obsahujících thiolové skupiny. Obecně lze říci, že těžké kovy vyvolávají nebo přispívají ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku a narušují rovnováhu pro- a antioxidačních systémů organismu. Hovoříme pak o tzv. oxidačním stresu^{1,2}.

Kadmium

Kadmium (Cd) je neesenciální prvek 12. skupiny periodické tabulky (dříve II.B skupina) přirozeně se vy-

skytující v půdě, ovzduší i ve vodě³. Jako polutant proniká do prostředí při těžbě zinkových a olovených rud, metalurgických procesech, spalování fosilních paliv či výrobě nikl-kadmiových akumulátorů. Do zemědělské půdy se může rovněž dostat spolu s hnojivy, neboť některé přírodní fosfáty obsahují kromě vápenatých iontů i ionty kademnaté. Vzdušnou cestou se kadmium může přenášet na velké vzdálenosti a nacházet se tak i více než tisíc kilometrů daleko od zdroje emisí³. Americká agentura pro ochranu životního prostředí (US Environmental Protection Agency, EPA) ho řadí mezi 126 sledovaných polutantů a rovněž česká legislativa upravuje podmínky pro jeho použití v průmyslu a pro nakládání s odpady, které ho obsahují, a to podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/95/ES ze dne 27. ledna 2003 o omezení používání některých nebezpečných látek v elektrických a elektronických zařízeních.

Toxicita kadmia

Kadmium a jeho sloučeniny patří mezi karcinogenní látky. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny klasifikuje kadmium jako karcinogen I. třídy, tedy lidský karcinogen. Může vyvolat rakovinu plic, prostaty, slinivky břišní nebo ledvin⁴. Zatím nebyl jednoznačně prokázán jeho teratogenní účinek u lidí, avšak u žen z oblastí s vyšším obsahem kadmia v životním prostředí bylo pozorováno nahromadění tohoto kovu v placentě a děti těchto žen vykazovaly následně nižší porodní váhu než děti, které do styku s kadmiem nepřišly⁵.

Předpokládáný poločas vyloučení kadmia z lidského organismu je odhadován na 10 – 30 let^{2,6}. Po expozici

kadmiumu se může objevit osteoporosa, nehypertonická ischemie, anémie, anosmie, chronická rýma a poškození renálního traktu⁴. Akutní intoxikace se projevuje dysurií, polyurií, dušností, bolestí na prsou, podrážděností, únavou, bolestí hlavy a závratěmi⁶. Chronická expozice člověka je spojena s nevratným poškozením kostí (osteoporosa), plic a renálního traktu^{4,6}. V Japonsku v prefektuře Toyama byla široce rozšířena tzv. nemoc itai-itai (v překladu „bolí-bolí“), kterou je bohužel ještě dnes možné pozorovat u tamních žen starších 50 let. Projevuje se osteomalácií, osteoporosou, bolestivými zlomeninami a dysfunkcí ledvin. Jedná se o otravu kadmii z rýžových polí, která byla zavlažována kontaminovanou vodou z místních zinkových a olověných dolů³.

Zdroje kadmia

Kadmium obsažené v půdě a ve vodě je přijímáno rostlinami a živočichy a dostává se tak do potravního řetězce. Kontaminované potraviny proto představují pro člověka hlavní zdroj expozice tomuto prvku. Nejvíce kadmia se nachází v živočišných produktech – v ledvinách a játrech savců a v některých druzích mořských plodů. Vzhledem ke složení jídelníčku však představují u většiny populace významnější zdroj kadmia potraviny, které ho sice obsahují méně, ale jsou konzumovány v daleko větší míře – jedná se především o zeleninu, cereálie a škrobnaté hlízy. Některé plodiny – například rýže – dokáží akumulovat vysoká množství kadmia, pokud jsou pěstovány na kontaminované půdě. Důležitým faktorem je nejen koncentrace tohoto těžkého kovu v půdě, ale i kyselost půdy, neboť z kyslejších půd je kadmium rostlinami lépe přijímáno³.

Ve srovnání s potravinami je pitná voda zanedbatelným zdrojem kadmia v lidské výživě. Přesto mohou nastat případy, kdy dojde ke zvýšení koncentrace tohoto prvku v pitné vodě vlivem jeho uvolňování z pozinkovaných trubek, kohoutů a jiných součástí potrubí, pokud byl použit méně kvalitní zinek s větším množstvím příměsí kadmia³.

Nezanedbatelným zdrojem kadmia je cigaretový kouř, protože tabák je rostlinou přirozeně akumulující kadmium v listech, a to v relativně vysokých koncentracích. U těžkých kuřáků může dokonce příjem kadmia z kouření převážit nad příjmem ze stravy³.

Samostatnou rizikovou skupinu představují lidé pracující v kovozpracujícím průmyslu neželezných rud, neboť kadmium je častou příměsí rud zinkových a olověných.

Absorpce kadmia

Při vdechování par nebo prachových částic kadmia je absorbováno zhruba 10 – 50 % tohoto prvku. Kuřáci tak přijmou 1 – 2 µg kadmia s každou vykouřenou krabičkou cigaret, což má za následek přibližně zdvojnásobení průměrné expozice oproti nekuřákům a také dvojnásobně vyšší nálezy kadmia uloženého v ledvinách⁶.

Při požití dochází v zažívacím traktu k absorpci přibližně jen 5 % přijatého kadmia⁶. Navíc má tento kov i jeho sloučeniny silný emetický účinek, a tak při požití akutně toxických dávek dojde zpravidla k vyvracení

většiny kontaminovaného pokrmu⁷. Přestože je vstřebávání kadmia trávicí soustavou značně nižší než vstřebávání dýchacím ústrojím, může stoupnout jeho absorpce ve střevech při dietách s nízkým obsahem vápníku, bílkovin, zinku, železa či mědi⁶.

Metabolismus kadmia a mechanismus toxicity

Po vstřebání putuje kadmium v organismu krevním řečištěm navázané na erythrocyty nebo na albumin a následně se usazuje v cílových orgánech. Největší podíl (kolem 50 %) akumulovaného kadmia se nachází v ledvinách a játrech. V játrech vyvolává zvýšenou tvorbu metalothioneinů, proteinů s vysokým obsahem cysteinu, které se podílejí na ochraně organismu před škodlivými účinky těžkých kovů^{2,6}. Akumulace v játrech může vést až k jejich nekróze, která je také jednou ze známek akutní otravy po parenterálním podání⁸. Dále se kadmium velmi často hromadí v kostech, slinivce břišní, nadledvinkách, placentě, plicích, mozku, srdci a varlatech^{2,6}. Vystavení kadmiumu dále způsobuje neuropatologické a neurochemické změny v centrální nervové soustavě, které vedou až ke změnám chování. U pokusných zvířat byl například pozorován nárůst vznehlivosti a hyperaktivita⁸.

Mechanismus způsobující toxicitu kadmia není plně znám a může zahrnovat více faktorů. Kadmium na rozdíl od jiných kovů, jakými jsou například železo nebo měď, nezpůsobuje přímou tvorbu volných radikálů. Přesto studie ukázaly, že se antioxidanty a látky eliminující volné radikály zapojují do ochrany buněk před jeho škodlivými účinky. Je prokázáno, že poměrně brzy po expozici kadmiumu dochází v tkáních k peroxidaci lipidů. Kadmium dále vykazuje vysokou afinitu vůči glutathionu a tvoří s ním komplex, který je vylučován žlučí, čímž výrazně snižuje hladinu využitelné formy tohoto neenzymatického antioxidantu v organismu. Rovněž inhibuje aktivitu antioxidantních enzymů včetně katalasy či superoxiddismutasy. Kadmium má nepříznivý vliv i na aktivitu dalších enzymů, na veškeré thiolové skupiny proteinů a na obranný systém buňky obecně. Všechny tyto faktory přispívají ke vzniku oxidačního stresu⁶.

Poškození buněk vyvolané kadmii

Kadmium zasahuje do mnoha metabolických pochodů v buňce a jeho vysoké koncentrace mohou vést až k buněčné smrti. Většina iontů těžkých kovů má vysokou afinitu k ligandům jako jsou fosfáty, puriny, porfíny, cysteiny a histidiny. Konkrétně kadmium pak reaguje s polythiolovými skupinami v buněčných makromolekulách nebo v nich nahrazuje zinek, pokud ho obsahují. Takovým příkladem mohou být metalothioneiny nebo enzymy karboxypeptidasy⁹.

Malondialdehyd je znám jako indikátor peroxidace lipidů a byl objeven ve zvýšeném množství v játrech a ledvinách po expozici kadmiumu. Důvody peroxidace lipidů po vystavení kadmiumu nejsou zcela známy, ale předpokládá se, že výkyvy v hladinách glutathionu a metalothioneinu umožňují volným radikálům (jako je hydroxylový HO· nebo superoxidový O²⁻) napá-

dat dvojné vazby v membráně lipidů, a tím dochází k nárůstu míry peroxidace⁶.

Kadmium vyvolává oxidativní změny DNA, jakými jsou například tvorba 8-hydroxydeoxyguanosinu či vznik zlomů na řetězcích DNA a chromozomové abe- race. Tyto změny byly pozorovány v různých typech buněk, včetně buněk ledvin a jater. Oxidativní poško- zení DNA je spojováno se zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů a interakcí kadmia s enzymy opravujícími DNA. Příkladem přímého napadení molekuly DNA kadmíem je vznik vnitrořetězcových bifunkčních adenin-thymino- vých aduktů poté, co došlo ke kovalentnímu navázání kademnatých iontů na N7 centra adeninu a guaninu⁵. Poškozením DNA a inhibicí jejího opravného systému může kadmium v organismu vyvolat vznik nádorů⁴.

Vysoké koncentrace kadmia, odpovídající akutní expozici tomuto kovu, indukují smrt buňky. Zda dojde k programované (apoptose), nebo neprogramované buněčné smrti (nekrose) závisí na dávce kadmia a také na typu buňky. Účinek kadmia vedoucí k apoptose je zprostředkován různými signálními drahami, které spouští buď kaspasa-nezávislou, nebo kaspasa-závislou apoptosu. Kaspasa-nezávislá cesta vede ke ztrátě po- tenciálu na mitochondriální membráně. Dochází k uvol- nění apoptosu indukujícího faktoru (AIF) a endonuklea- sy G z mitochondrie a k jejich přemístění do jádra, kde se podílejí na kondenzaci a degradaci chromatinu^{10,11}.

Cestu závislou na kaspasách tvoří kaskáda reakcí katalysovaných cysteinovými proteasami zvanými kas- pasy. Na začátku kaskády se vyskytují kaspasy označo- vané jako iniciační, které se podílejí na přenosu signálu a aktivačním štěpení exekučních kaspas, čímž dochází k amplifikaci apoptotického signálu. Exekuční kaspasy poté proteolyticky štěpí tzv. substráty smrti, mezi něž patří proteiny řídící opravu DNA, proteiny cytoskeletu nebo antiapoptotické proteiny, a tím zajišťují vlastní průběh apoptosy¹².

Literatura:

1. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, et al.: *J. Exp. Bot.* 52, 364 (2001).
2. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N: *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529 (2001).
3. <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>, staženo 14. 10. 2013.
4. Latinwo LM, Badisa VL, Ikediobi CO, et al.: *Int. J. Mol. Med.* 18, 477 (2006).
5. Fernández EL, Gustafson A-L, Andersson M, et al.: *Toxicol. Sci.* 76, 162 (2003).
6. Patrick L: *Altern. Med. Rev.* 8, 106 (2003).
7. Horák J, Linhart I, Klusoň P: Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. 1. vyd. VŠCHT Praha, 88 (2004).

Souhrn

Melčová M., Knížek M., Zídková J., Zídek V.: Biologické účinky a toxicita kadmia

Kadmium (Cd) je neesenciální těžký kov běžně se vyskytující v životním prostředí. Akumuluje se v těle v měkkých tkáních, zejména v ledvinách a játrech. Nachází se v potravinách (zelenina, obiloviny, škrobnaté hlízy), vodě, tabákových listech. Do prostředí proniká jako vedlejší produkt při těžbě a zpracování neželezných rud, při spalování fosilních paliv nebo při použití fosfátových hnojiv. Akutní toxicita je spojena především s vdechováním par kadmia a postihuje plíce (dušnost, bolest na prsou, bolest hlavy, závratě). Chronická toxicita se projevuje primárně dysfunkcí ledvin, sekundárně osteoporosou a může vést ke vzniku rakoviny (plic, ledvin, prostaty, slinivky břiš- ní). Toxické účinky kadmia souvisí se snižováním hladin antioxidantů, snižováním aktivity enzymů (včetně antioxidačních), zvyšováním peroxidace lipidů a vyvoláváním oxidativních změn DNA. To vše vede v organismu ke vzniku tzv. oxidativního stresu. Jistou ochranu před škodlivými účinky kadmia poskytuje vyvážená, plnohodnotná strava, ovšem nejdůležitější zůstává prevence nebo alespoň minimalizace kontaktu s tímto těžkým kovem.

Klíčová slova: kadmium, toxicita, oxidativní stres, karcinogen, ledviny, játra, metalothionein, glutathion

Při obou typech apoptosy byl pozorován intracelu- lární nárůst hladiny vápníku, a je tedy možné, že kad- mím vyvolaná apoptosa je důsledkem poruchy vnitro- buněčné homeostase vápníku¹⁰.

Závěr

Pro širokou veřejnost jsou hlavním zdrojem kadmia kontaminované potraviny, v případě kuřáků (i pasiv- ních) může nezanedbatelný zdroj představovat rovněž cigaretový dým. Nutričně nevyvážená či nedostačující strava může dále zvyšovat riziko toxicity kadmia. Ne- existuje žádná účinná léčba po intoxikaci tímto těžkým kovem, a prevence má tudíž zásadní význam¹³. Světová zdravotnická organizace (WHO) proto vydala následují- cí doporučení³:

- prosazovat účinná opatření ke zvýšení recyklace kad- mia a omezit nerecyklovatelné použití
- snížit emise kadmia (zejména do povrchových vod) z těžby a zpracování neželezných rud, ze spalování odpadů, z fosfátových hnojiv a z čistírenských kalů aplikovaných na zemědělskou půdu
- vyvinout techniky pro bezpečné odstraňování odpadů a odpadních vod obsahujících kadmium
- zakázat kouření na veřejných místech
- snížit riziko expozice kadmii – např. zlepšováním pra- covních podmínek v hutním průmyslu neželezných rud nebo informováním o správném používání hnojiv
- zvyšovat všeobecné povědomí o důležitosti minimali- zace odpadů s obsahem kadmia.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů GAČR 13-04580S, IAA600110902 a MŠMT 6046137305, dále byla financována z účelové podpory na specifický vyso- koškolský výzkum (MŠMT č. 20/2013).

8. Hassoun EA, Stohs SJ: *Toxicology* 112, 219 (1996).
9. Howlett NG, Avery SV: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2971 (1997).
10. Martelli A, Rousselet E, Dycke C, et al.: *Biochimie* 88, 1807 (2006).
11. Eleder P: Diplomová práce. Masarykova univerzita, Brno 2012.
12. Hušková Z: Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Olomouc 2013.
13. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cadmium/docs/cadmium.pdf>, staženo 14. 10. 2013.

Summary

Melčová M., Knižek M., Zídková J., Zídek V: Biological effects and toxicity of cadmium

Cadmium (Cd) is a non-essential heavy metal commonly found in the environment. It accumulates in the soft tissues of the body, especially in the kidneys and liver. It is found in food (vegetables, cereals, starchy roots), water, and tobacco leaves. Cadmium is released to the environment as a by-product of mining and smelting of non-ferrous ores, during the combustion of fossil fuels or during use of phosphate fertilizers. Acute inhalation of fumes containing cadmium affects the lungs causing dyspnea, chest pain, headache, and dizziness. Chronic cadmium exposure primarily affects the kidneys and secondarily the bones causing osteoporosis, and may lead to cancer (lung, kidney, prostate, pancreas cancer). Toxic effects of cadmium are associated with depleting levels of antioxidants, inhibiting the activity of enzymes (including antioxidative ones), increasing lipid peroxidation, and causing oxidative changes of DNA. In the organism, this induces a state of oxidative stress. A well-balanced diet provides protection from the harmful effects of cadmium to a certain extent; however, prevention or minimizing of cadmium exposure remains the most important way of protection.

Keywords: cadmium, toxicity, oxidative stress, carcinogen, kidney, liver, metallothionein, glutathione

ROZMANITÉ FUNKCE PROTEINU CD36 V LIDSKÉM ORGANISMU

Edita Křížová, Petr Svoboda, Vojtěch Škop, Jarmila Zídková

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, krizovaedita@seznam.cz

Úvod

Situace na přelomu druhého a třetího tisíciletí upozorňuje na problematiku civilizačních onemocnění více, než tomu bylo doposud. Do popředí zájmu, a to nejen odborné veřejnosti, se dostávají i zdravotní poruchy souhrnně označované jako metabolický syndrom. Zvláště pak dyslipidemie, hypertenze, obezita a diabetes mellitus II. typu představují značně zvýšené riziko pro výskyt chorob kardiovaskulárního systému, které si vybírají stále rostoucí počet obětí^{1,2}.

V souvislosti s metabolickým syndromem je věnována pozornost i proteinu CD36. Prvotním důvodem je charakter CD36, tj. proteinu širokého účinku, který má vliv na metabolismus sacharidů a lipidů³. U porušené exprese CD36 byl potvrzen výskyt diabetu mellitu II. typu, hypertenze a abnormalit v metabolismu mastných kyselin. Tato skutečnost též podporuje hypotézu o asociaci CD36 s metabolickým syndromem⁴. V neposlední řadě hraje roli i výskyt insulinové resistance u spontánně hypertenzního potkana s mutovaným genem pro CD36⁵.

V tomto článku bude věnována pozornost nejen struktuře, principům regulace a obecné souvislosti proteinu CD36 s metabolismem, ale i dalším funkcím, které proteinu propůjčují celou řadu funkčních názvů.

CD36

Membránový glykoprotein CD36 je jedním z členů evolučně konzervativní rodiny scavengerových receptorů třídy B^{4,5} se schopností vazby negativně nabitých molekul⁶. Příkladem je selektivní příjem esterů cholesterolu do buněk. Široké spektrum buněk, v nichž je CD36 exprimován, zahrnuje cévní endothel, adipocyty, monocyty, makrofágy, krevní destičky, buňky kosterního svalstva, dendritické buňky a jiné^{4,5}.

V cytoplasmatické membráně mnoha buněk⁷ je nutná asociace CD36 s proteinem kaveolinem-1. Tvořená mikrodoména nese název kaveola⁵. Jedná se o invaginovanou membránu, jeden z druhů lipidového raftu. Funkce lipidových raftů spočívá ve schopnosti transportu větších signálních komplexů přes membránu, specifickém příjmu nutrientů nebo v (mezi)buněčné komunikaci a endocytose⁸. Z uvedeného vyplývají tři

možné funkce CD36: receptor pro specifické ligandy, molekula signální dráhy a regulátor funkce kaveoly⁵. Vyznačuje se i schopností interakce s jinými membránovými receptory⁴.

Za evolučně nejstarší funkci CD36 je považován jeho vztah k vrozené imunitě. Díky scavengerové povaze se účastní internalizace modifikovaných lipoproteinových částic nízké hustoty (low density lipoprotein, LDL) makrofágy a směřuje je tak k apoptose. U makrofágů je též zodpovědný za rozpoznání některých komponent bakteriální buněčné stěny^{4,5,9}. Ochranný charakter CD36 zahrnuje též schopnost vazby apoptotických buněk makrofágy. Hovoříme zde o ochraně před zánětem u hojících se ran.

Specifickými ligandy pro CD36 jsou i lipoproteiny o vysoké (high density lipoprotein, HDL) i velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein, VLDL)⁷. Úloha v přenosu mastných kyselin s dlouhým řetězcem (long chain fatty acid, LCFA) v rámci kaveoly propůjčuje tomuto glykoproteinu jeden z jeho dalších názvů, translokasa mastných kyselin (Fatty Acid Translocase, FAT)³.

Prostřednictvím CD36 probíhá i cytoadherence pozměněných erythrocytů postižených původcem malárie, *Plasmodium falciparum*. Přilnutí infikovaných erythrocytů k důležitým orgánům, např. mozku, způsobí selhání funkce imunitního systému⁵.

Jinou významnou úlohou CD36 je inhibice angiogeneze^{5,7}. Svou roli hraje i v preferenci stravy s bohatým obsahem tuku. Interakcí LCFA s chuťovými pohárky exprimujícími tento receptor je spuštěna neurotransmiterová reakce vedoucí k vyšší sekreci pankreatických enzymů⁴.

Struktura CD36

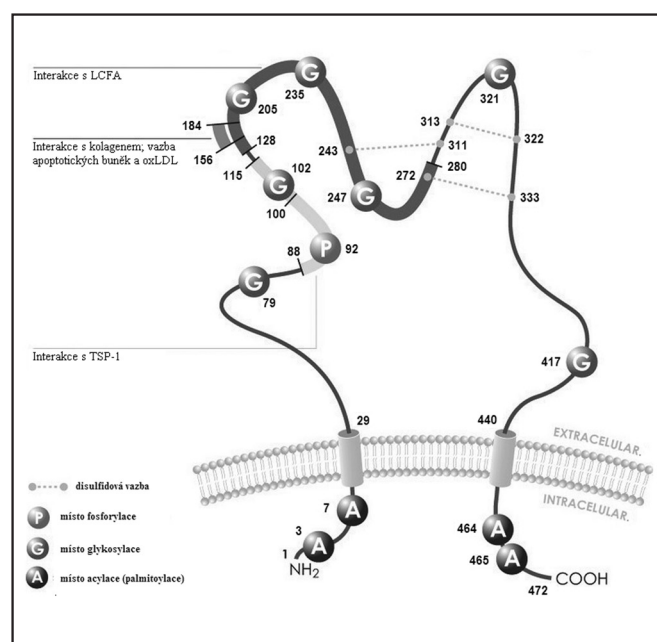
Lidský gen kódující CD36 je umístěn na 7. chromosomu⁹. DNA nese informaci o proteinu o 472 aminokyselinách (AK) o molekulové hmotnosti 53 kDa. Četné N-glykosylace asparaginů pravděpodobně plní ochrannou funkci před účinkem proteas v poškozených tkáních nebo během zánětů. Tkáňově specifické posttranslační modifikace zvyšují molekulovou hmotnost proteinu na 78–92 kDa^{3,4,5}.

Strukturní domény glykoproteinů můžeme rozdělit na 2 transmembránové, 2 intracelulární a 1 extracelulární. Cysteiny krátkých intracelulárních oblastí na C-konci podléhají acylaci (Obr. 1). Palmitoylovými úseky je umožněno kotvení proteinu k vnitřní straně membrány^{4,5}. Upevnění je důležité zvláště v lipidovém raftu⁷. Pro N-konec je charakteristický neodštěpený signální peptid s absencí prvního methioninu³. C-konec s vysokou pravděpodobností zprostředkovává aktivaci intracelulárních signálních drah fosforylací Src kinasy. Tato domněnka je podpořena absencí fosfatasy či GTPasové aktivity a jiných typických projevů signálních molekul⁴. Pro daný úsek je též typická možnost ubiquitinylationu lysinu, sloužící jako značení molekuly určené k degradaci. Celý proces regulace degradace je stimulován zvýšeným obsahem mastných kyselin a inhibován insulinem^{4,11}.

Součástí extracelulární smyčky je hydrofobní oblast, umožňující případnou interakci s cytoplasmatickou membránou. Dále je zde obsažen úsek bohatý na prolin a funkční domény zodpovědné za multiligandový charakter proteinu⁹. Možná variace vazebné afinity řetězce CD36 k thrombospondinu-1 (TSP-1) a kolagenu je uskutečňována fosforylací threoninu v pozici 92^{5,7}.

Funkční oblasti ohraničené AK 93–120 a 155–183, představující potenciální části zodpovědné za vazbu a následnou endocytosu apoptotických neutrofilů, jsou označovány jako CLESH (CD36 LIMP-II Emp Sequence Homology). Úsek 155–183 slouží k vazbě oxidovaných LDL (oxLDL), ale i pokročilých produktů glykace, produktů růstových hormonů, hexarelinu a receptoru EP80317. Mezi AK 28–93 a pravděpodobně i 120–155 se nachází další oblast podílející se na vazbě oxLDL⁹.

Domény s afinitou k membránovému proteinu exprimovanému na povrchu erythrocytů infikovaných *Plasmodium falciparum* jsou vymezeny AK 139–184, 146–164 a 145–171¹².

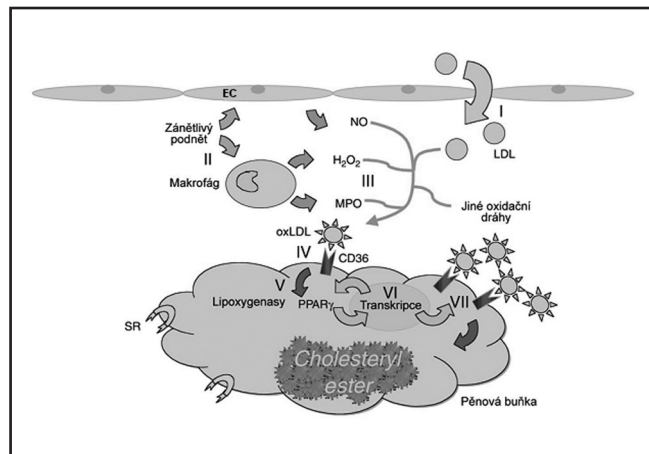


Obr. 1: Schematické znázornění nejdůležitějších oblastí membránového proteinu CD36 (upraveno¹⁰)

Nejvýznamnější funkce CD36 v lidském organismu

Role v rozvoji aterosklerosy

Přímé spojení CD36 s metabolickým syndromem je možné demonstrovat na zapojení proteinu do procesu vývoje aterosklerosy, zánětlivého onemocnění cévní stěny, vedoucí vlivem ukládání tukových látek k zužování arteriálního průsvitu³.



Obr. 2: Děje spějící k tvorbě pěnových buněk, dávajících základ aterosklerotickým lézím. Následkem vyloučení zánětlivých působků poraněnými EB dochází k pronikání monocytů do subendothelu a tvorbě řady oxidačních produktů modifikujících LDL částice. OxLDL jsou pohlceny makrofágy za účasti receptoru CD36. Působením lipoxygenas jsou oxLDL přeměněny na složky aktivující receptorovou molekulu PPAR γ . Celý proces vede ke zvýšené expresi CD36 a hromadění oxLDL (upraveno¹²).

V raném stádiu procesu dochází k dysfunkci endoteliálních buněk (EB). Původcem těchto změn jsou například: hypertenze, kouření¹³, diabetes, obezita, stres a nedostatek pohybu, neboli faktory, které mohou být spojovány se zánětlivým procesem³. Poškozené EB prostřednictvím vylučovaných aktivovaných adhezních molekul a chemokinů přitahují při zánětlivých dějích do prostoru subendothelu monocyty a lymfocyty z krevního řečiště⁹. V této fázi produkují EB a makrofágy oxidativní enzymy myeloperoxidasu (MPO) a syntasu oxidu dusnatého, katalyzující vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku (Obr. 2).

LDL částice, jež prošly do oblasti subendothelu, následně podléhají oxidativním reakcím¹³. Roli scavengerového receptoru na povrchu makrofágů se schopností vazby a endocytosu oxLDL následně sehrává CD36⁹. Na rozdíl od makrofágových scavengerových receptorů třídy A se CD36 vyznačuje afinitou k LDL, které byly vystaveny slabším oxidativním podnětům. Do této kategorie je možné zařadit právě MPO-H₂O₂-NO. Následkem internalizace oxLDL dochází k přeměně makrofágů na pěnové buňky, dávající základ aterosklerotickým plátům⁴. Z tohoto důvodu je vysoká koncentrace cholesterolu, zvláště LDL, v krevní plasmě rizikem pro vznik aterosklerosy¹².

Pěnové buňky, vyznačující se náchylností k apoptose, se stávají prekurzory vzniku aterosklerotického plaku¹³. Zvýšená koncentrace MPO byla prokázána v aterosklerotických lézích, což vede k dalšímu nárůstu atherogenních LDL³.

Výskyt CD36 na krevních destičkách zapojuje tyto krevní elementy do pozdní fáze aterosklerosy. OxLDL se, na rozdíl od nemodifikované formy, v závislosti na své koncentraci váže ke krevním destičkám. Výsledným jevem je po jejich aktivaci agregace a adheze na zvrásněných atherogenních lézích¹³. V případě odtržení vytvořeného thrombu, části léze v pokročilém stádiu onemocnění, dochází k infarktu myokardu a cévní mozkové příhodě¹². Krevní destičky proto mohou být považovány za mechanické pojítko mezi zánětem, oxidativním stresem a hyperlipidemií, umožňující vznik prothrombotického stavu¹³.

Translokasa mastných kyselin

Neméně významnou roli hraje CD36 i díky schopnosti transportu mastných kyselin s dlouhých řetězcem. Tento charakter propůjčuje glykoproteinu CD36 název translokasa mastných kyselin (Fatty Acid Translocase, FAT)⁵.

Struktura α -helixu CD36 s hydrofobními vlastnostmi může být prvkem usnadňujícím přístup lipidů k doméně³. Díky expresi v insulin-senzitivních tkáních¹⁴ tj. kosterní svalovině, srdci a tukové tkáni, hraje glykoprotein CD36 roli v energetickém metabolismu mastných kyselin, ale i v příjmu a využití glukosy⁵. Aktivita proteinu je stimulována insulinem a svalovou kontrakcí¹¹.

Mechanismus účinku dosud objasněn nebyl. Jedná se o usnadněnou difuzi přes cytoplasmatickou membránu v obou směrech. Přenašeč vykazuje schopnost kompetice s albuminem, bílkovinou transportující mastné kyseliny (fatty acid, FA) krví³. Různé teorie hovoří o možnosti přímého spojení FA s CD36 díky vazebné doméně, jiné o asociaci CD36 s proteiny se schopností translokace. Dále je připouštěna možnost asociace s doménou v cytoplasmatické membráně zvyšující její propustnost, nebo utvoření póru pro průchod FA oligomerizací glykoproteinu⁷.

Expresí genu proteinu CD36 probíhá podél celého trávicího traktu od chuťových pohárků po tlusté střevo. Důležitě zapojení do formování chylomikronů je zprostředkované usnadněním transportu FA a cholesterolu¹¹.

U myši s deficitem glykoproteinu CD36 byly skutečně pozorovány zvýšené hladiny cholesterolu, TAG a FA v krvi⁵. V důsledku snížené možnosti využití FA došlo ke zlepšení senzitivity vůči insulinu, což představuje i ochranu před obezitou získanou vysokokalorickou stravou. Mutace v genu mohou mít za následek i dopad na expresi jiných genů, jež ovlivňují fenotyp. Zajímavé je ovšem zjištění vzniku insulinové resistance při ablacii CD36. Odtud plynou úvahy o možných dopadech na organismus v závislosti na tkáni, ve které je CD36 exprimován⁴. Naopak jeho zvýšená exprese, snižující koncentraci FA a TAG v krevní plasmě, souvisí s hyperglykemií a hyperinsulinemií¹¹. Akumulace lipidů uvnitř buněk může být původcem lipotoxicity a tudíž i insulinové resistance⁴.

Ligand thrombospondin-1, inhibitor angiogeneze

Kontrolní mechanismy angiogeneze, novotvorby krevních cév, spočívají v rovnováze mezi pro- a anti-angiogenními růstovými faktory a cytokiny¹⁵. Mezi aktivátory jsou řazeny stimulační faktory s funkcí mitogenů pro EB, např. základní růstový faktor fibroblastů (basic fibroblast growth factor, bFGF) a vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF)¹⁶. K inhibici formace cév dochází z důvodu absence stimulačního faktoru nebo naopak přítomnosti inhibičních faktorů. Příkladem inhibitorů je skupina thrombospondinů (TSP), proteinů odvozených od extracelulární matrix¹⁸.

Kopp *et al.* (2006) ve své studii označují za regulátory angiogeneze trombopoetické buňky, prostřednictvím sekrece TSP¹⁷. Značnou zásobu TSP-1 vykazují v granulách krevní destičky¹⁶. Během angiogeneze, při hojení ran, putují krevní destičky do poškozené cévy a po aktivaci dochází k uvolnění řady faktorů včetně VEGF i TSP¹⁸. Současně dochází ve tkáních k sekreci VEGF v důsledku ischemie a zánětlivých stimulů. Přímým účinkem VEGF migrují a proliferují EB a formují se cévy¹⁵. Všechny tyto účinky jsou zpětně negativně řízeny prostřednictvím TSP-1 a TSP-2¹⁸.

CD36 je receptorem pro TSP-1, zprostředkovávající odpověď na růstové faktory, poranění a cytokiny³ na povrchu EB, monocytů, leukocytů a krevních destiček¹⁶. U krevních destiček glykoprotein CD36 odpovídá za jejich aktivaci a stabilizaci agregátu obsahujícího fibrinogen³. Pro inhibici všech dějů stimulovaných bFGF a VEGF je interakce TSP-1 s CLESH doménou CD36 zcela nezbytná. Prostřednictvím signální kaskády iniciované navázáním TSP-1 dochází k apoptose EB¹⁶. CD36 tak plní funkci spínače pro- a anti-angiogenních procesů. Regulačním prvkem je fosforylace. Fosforylovaný membránový protein CD36 vykazuje afinitu ke kolagenu a tím dochází k angiogenezi. Naopak defosforylovaný protein se vyznačuje afinitou k TSP-1, což vede k inhibici tvorby nových cév^{5,7}.

Schopnost CD36 vázat apoptotické buňky

Membránový glykoprotein CD36 je do kategorie scavengerových receptorů řazen i kvůli schopnosti vázat a indukovat zničení apoptotických buněk. Apoptosa je důležitým krokem pro odstranění buněk nevhodných pro organismus, ať z důvodu jejich poškození, či stárnutí. Následná fagocytosa neutrofilů a monocytů je v závažném stavu klíčovou imunitní odpovědí.

CD36 zprostředkovává odstranění apoptotických buněk dvěma možnými cestami, prostřednictvím fagocytických buněk a buněk dendritických (DC, dendritic cell). Široký rozsah vázaných ligandů umožňuje CD36 rozpoznat často se vyskytující strukturní motivy jak na povrchu buněk apoptotických, tak mikrobiálních³. CD36 rozlišuje specifické lipidy a lipoproteiny buněčných stěn bakterií a β -glukany kvasinek a plísní. U apoptotických buněk jsou detekovány modifikované lipidy, TSP-1⁴ a anionický fosfatidylserin, o němž je vnější membrána obohacena během ztráty své asymetrie. U fosfatidylserinu byly pozorovány oxidace analogické k oxidacím lipoproteinů, jež jsou také rozpoznávány proteinem CD36⁷.

Závěr

Podle dlouhodobých výzkumů hraje u metabolického syndromu roli genetické vybavení, o rozvoji však rozhoduje životní styl s nadměrným příjmem energeticky bohaté stravy o nevhodném složení a sedavým způsobem života¹⁹. Podle odhadů se genetická predispozice vyskytuje až u 50 % populace²⁰. Spočívá v principu úsporného genotypu, který označuje schopnost efektivního zpracování potravy a uložení energie. Takto vybavení jedinci byli dříve v obtížných životních podmínkách zvýhodněni zvýšenou šancí na přežití. Dnes se přednost stává spíše nevýhodou².

Trend zvýšeného výskytu metabolického syndromu, chorob kardiovaskulárního systému a jejich obětí pozorujeme zvláště u západních civilizací. Tato skutečnost vede nejen ke snahám zavést zdravější životní styl, ale

i k hledání genů zodpovědných za metabolické dysfunkce. CD36 se tak díky svému podílu na metabolismu lipidů a glukosy stal jedním z významných kandidátů pro detailnější výzkum. Tento krok je podpořen i zapojením glykoproteinu CD36 do procesů aterosklerózy. Současně přichází i snahy nahlížet na CD36 jako na možný terapeutický prostředek. Nesmí být však opomenuta jeho role v imunitním systému a tudíž i fakt, že jakýkoliv zásah do systému, kterého se CD36 účastní, bude mít následky velkého rozsahu.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů GAČR 13-04580S, IAA600110902, dále byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (rozhodnutí č. 20/2013).

Literatura:

1. Bošanská L: *Metabolický syndrom včera, dnes a zítra*. Postgraduální medicína – Příloha 3, (2010).
2. Svačina Š, Bretšnajdrová A, Češka R, et al. (2006): *Metabolický syndrom* 3th ed., TRITON, Praha.
3. Kontrová K, Zídková J, Palečková P, et al.: *Chem. listy* 100, 17 (2006).
4. Silverstein RL, Febbraio M.: *Sci. Signal.* 2, re3. (2009).
5. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL: *J. Clin. Invest.* 108(6), 785 (2001).
6. deWinther MPJ, Hofker MH: *J. Clin. Invest.* 105(8), 1039 (2000).
7. Febbraio M, Silverstein RL: *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 39, 2012 (2007).
8. Švec A: *Čes.-slov. Patol.* 44(4), 96 (2008).
9. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al.: *Cardiovasc. Res.* 75, 468 (2007).
10. <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2103>, staženo 20. února 2012.
11. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA: *J. Lipid Res.* 50, S86 (2009).
12. Gautam S, Banerjee M: *Mol. Genet. Metab.* 102, 389 (2011).
13. Silverstein RL (2009): *Cleve. Clin. J. Med.* 76, S27 (2009).
14. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, et al.: *Cardiovasc. Res.* 89, 604 (2011).
15. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD: *Vasc. Pharmacol.* 44, 265 (2006).
16. Simantov R, Silverstein RL: *Front. Biosci.* 8, 874 (2003).
17. Kopp H-G, Hooper AT, Broekman MJ, et al.: *J. Clin. Invest.* 116(12), 3277 (2006).
18. Varner JA: *J. Clin. Invest.* 116(12), 3111 (2006).
19. Karen I, Souček L, Bláha V, et al. (2007): *Metabolický syndrom – diagnostika a léčba*, Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře, CDP-PL, Praha.
20. Vaverková H: *Kardiofórum*, 3, 13 (2003).

Souhrn:

Křížová E., Svoboda P., Škop V., Zídková J.: Rozmanité funkce proteinu CD36 v lidském organismu

Nárůst prevalence metabolického syndromu, souhrnně označující rizika pro vznik chorob kardiovaskulárního systému, vedl k hlubšímu zkoumání jeho příčin i důsledků. Zvýšený zájem je věnován hlavním rizikovým faktorům, obezitě, dyslipidemií, hypertensi a diabetu mellitu II. typu. Zájem o významnou roli genetické predispozice přispěl k objevu membránového glykoproteinu CD36.

Souvislost proteinu CD36 s metabolickým syndromem je podmíněna zvláště jeho zapojením do metabolismu sacharidů i lipidů. Mezi jeho rozličné funkce můžeme zařadit: úlohu jako transportéru mastných kyselin s dlouhým řetězcem, podíl na vzniku aterosklerózy a též roli v nespecifické imunitě. Pozornost je u proteinu CD36 věnována i regulační schopnosti v procesu angiogeneze.

Klíčová slova: Metabolický syndrom, CD36, translokasa mastných kyselin, ateroskleróza, angiogeneze, malárie, buněčná imunita

Summary:

Křížová E., Svoboda P., Škop V., Zídková J.: Diverse functions of protein CD36 in human organism

Increasing prevalence of metabolic syndrome, summarizing risks of cardiovascular disease development, gave rise to intense research of its impact, cause and effect. Increased demand is given for the main risk factors, obesity, dyslipidemia, hypertension and diabetes mellitus type II. The interest in significant role of genetic predisposition contributed to location of membrane glycoprotein CD36.

Relation of protein CD36 to metabolic syndrome is conditioned especially with its involvement in saccharide and lipid metabolism. Among his various functions can be included: the role as long chain fatty acid transporter, atherosclerosis development and also the role in nonspecific immunity. Attention is paid to regulatory skills of CD36 in angiogenesis process.

Keywords: Metabolic syndrome, CD36, Fatty Acid Translocase, atherosclerosis, angiogenesis, malaria, cell immunity

O B S A H

Úvodem	53
Biotech 2014	54
Štikarová J.: Modifikace fibrinogenu při oxidačním stresu	55
Havlásková B.: Stanovení testosteronu	59
Melčová M., Knížek M., Zídková J., Zídek V.: Biologické účinky a toxicita kadmia	62
Křížová E., Svoboda P., Škop V., Zídková J.: Rozmanité funkce proteinu CD36 v lidském organismu	65

C O N T E N T S

Editorial	53
Biotech 2014	54
Štikarová J.: Modification of fibrinogen during oxidative stress	55
Havlásková B.: Detection of testosterone	59
Melčová M., Knížek M., Zídková J., Zídek V.: Biological effects and toxicity of cadmium	62
Křížová E., Svoboda P., Škop V., Zídková J.: Diverse functions of protein CD36 in human organism	65

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.

Lowenstein 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