

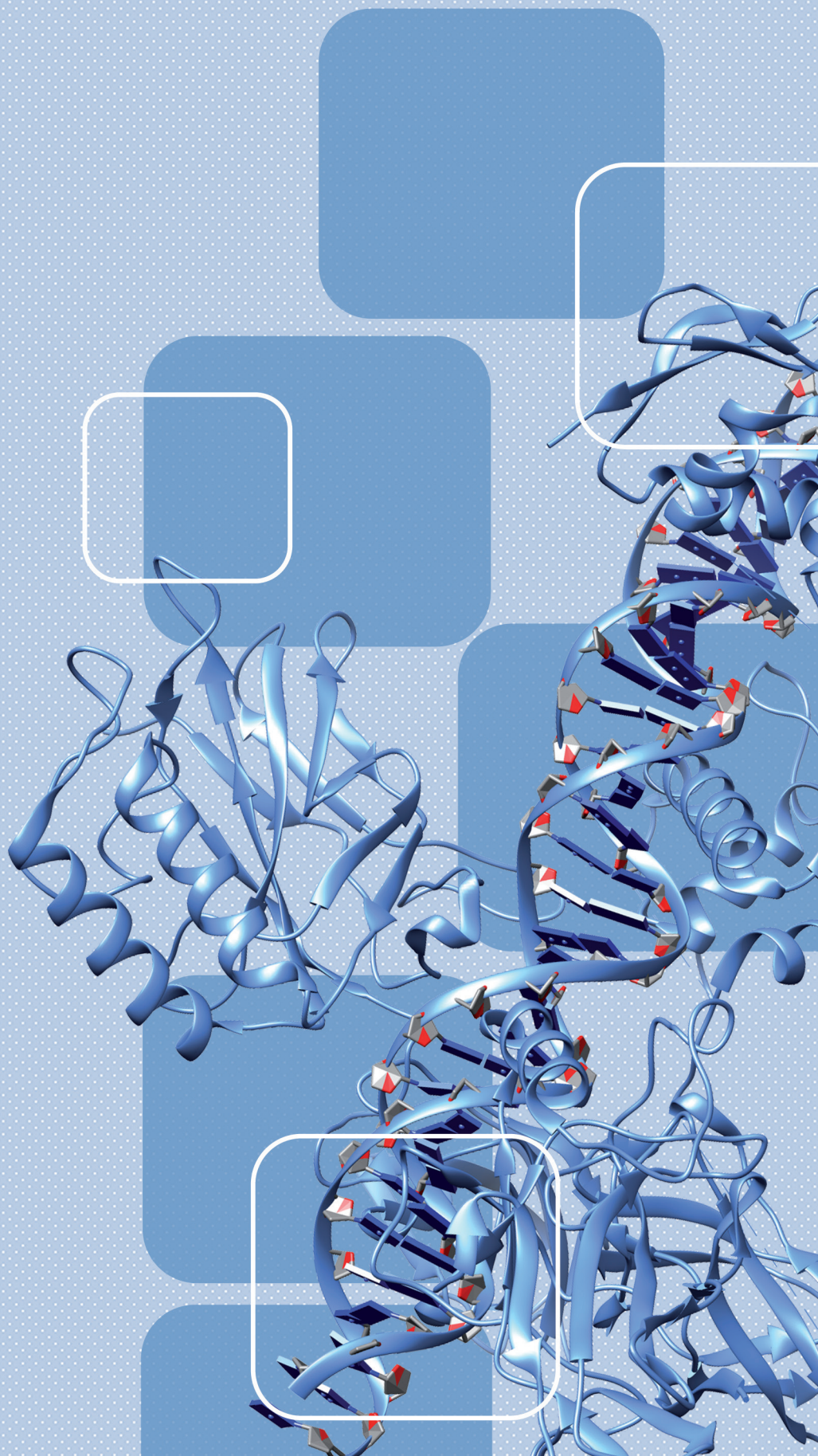
Bio

Ročník 25 • Číslo 4/2015

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

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

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

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

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

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

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

blíží se konec roku, kdy jsme si připoměli 25. výročí založení Biotechnologické společnosti a naší střešní organizace ČSVTS a také 25. výročí vydávání našeho bulletinu Bioprospect. Rádi bychom při této příležitosti poděkovali všem našim členům a příznivcům za podporu a spolupráci, díky nimž jsme dosáhli řady úspěchů. Pevně věříme, že příští léta budou nejméně tak úspěšná jako ta předchozí. Rádi přizpůsobíme aktivity naší společnosti tak, aby vyhovovaly Vaším přáním a požadavkům. Domníváme se, že řada našich členů ještě nevyužívá výhody našeho e-mailového servisu. Záleží jen na Vás, zda budete mít zájem o zasílání aktuálních zpráv. Pokud jste unaveni z přemíry e-mailových zpráv, otevřete si alespoň občas webové stránky naší společnosti (<http://bts.vscht.cz>) a European Federation of Biotechnology (EFB-<http://www.efb-central.org>). Poslední EFB Newsletter přináší přehled biotechnologických konferencí a kongresů v příštím roce. Z těch nejzajímavějších připomínáme 17th European Congress on Biotechnology (ECB 2016), který se bude konat od 3. do 6. července 2016 v polském Krakově (<http://ecb2016.com>) a Biotechnology World Convention, který se uskuteční v období 15. – 17. srpna 2016 v Sao Paulo, Brazílie (<http://world.biotechnologycongress.com>).

Stalo se už zvykem, že si v našem úvodníku připomínáme některá slavná výročí. Letos to bylo již 120 let, co Alfred Nobel sepsal svou třetí a také poslední závěť (zhruba jeden rok před svou smrtí) v níž pověřil švédskou Akademii věd udělováním cen za fyziku, chemii, medicínu, literaturu a mírové snahy a tyto aktivity zajistil založením fondu s částkou 32 milionů švédských korun. Nobelovy ceny byly poprvé uděleny v roce 1901. (Od r. 1969 se ještě uděluje Nobelova cena za ekonomii.) V období 1901 – 2015 bylo vyhlášeno 900 laureátů Nobelových cen (874 osob a 26 organizací). Je snad zajímavé připomenout, že slovo laureát (i když u nás se často hovoří o nositeli ceny) má řecký původ. Je známo z historie, že vítězové v různých disciplínách byli v Řecku obdarováni vavřínovým věncem. Vavřín má latinský název „Laurus nobilis“ (česky

vavříin vznešený či ušlechtilý) z čehož bylo odvozeno slovo laureát.

Nobelova cena se ve všech kategoriích uděluje jedné, dvěma či maximálně třem osobnostem (cena za mír i organizacím) nebo se také v příslušném roce neuděluje vůbec. Ve všech kategoriích, kromě ekonomie, nebyly v některých letech (až překvapivě často) Nobelovy ceny uděleny (v chemii 8x, v medicíně 9x, ve fyzice 6x, v literatuře 7x, za mír 19x). Nobelovy ceny se neudělují zemřelým osobám. Je jen několik případů, kdy laureát zemřel v době mezi vyhlášením ceny a jejím fyzickým udělením. Zajímavým údajem může být i skutečnost, že průměrný věk laureátů v chemii a medicíně je 58 let a ve fyzice 55 let. Nejmladším nositelem Nobelovy ceny byl ve svých 25 letech Lawrence Bragg, který ji získal společně se svým otcem v r. 1915 za krystalografickou analýzu X-paprsky (fyzika). Zajímavé je, že otec a syn získali společně Nobelovu cenu ve 4 případech, ve 2 případech to byly manželské páry (shodou okolností M. Curie s manželem a její dcera s manželem: P. Curie a M. Curie-Sklodovská (fyzika – objev přírodní radioaktivity, 1903), Frédéric Joliot a Irene Joliot-Curie (chemie – objev umělé radioaktivity, 1935). Ženských laureátů bylo v uvedeném období 45, nejvíce za literaturu a mír (4 ženy v chemii, 12 v lékařství a fyziologii a 2 ve fyzice). Někteří laureáti získali dvě Nobelovy ceny (každou v jiném oboru, např. M. Curie-Sklodovská za fyziku a chemii). V chemii získal Nobelovu cenu 2x jen Frederick Sanger (za práci na stanovení primární struktury proteinů, zvláště inzulinu – 1958 a za příspěvky týkající se posloupnosti bází v nukleových kyselinách – 1980).

V souvislosti se vznikem Nobelových cen bychom neměli zapomenout na pražskou rodačku Bertu Suttnerovou, rozenou Kinskou, která byla sekretářkou a dlouholetou přítelkyní Alfreda Nobela a snad to byla právě ona, která utvrdila Nobela v jeho rozhodnutí ocenit kromě významných vědeckých objevů a zajímavé literární tvorby také zásluhy o mír ve světě. Sama se později (v r. 1905) stala první ženskou laureátkou Nobelovy ceny za mír. Její státní příslušnost je uváděna jako rakousko-uherská. Alespoň je po ní v Praze 6 pojmenována ulice.

Jsmo přesvědčeni, že i tentokrát budete spokojeni s výběrem článků, které Vám v tomto čísle předkládáme a s potěšením si je přečtete. Přejeme Vám, abyste v klidu zvládli všechny povinnosti a starosti, které se na Vás hrnou koncem roku a pak prožili v pohodě vánoční svátky, Silvestr i Nový rok. Po celý příští rok Vám přejeme především pevné zdraví, mnoho úspěchů v rodinném i profesním životě a těšíme se na další spolupráci po celý příští rok.

Srdečně Vás pozdravují a myslí na Vás

Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová



ENBIK 2016

Národní bioinformatická konference

13. - 15. 6. 2016

- ENBIK je setkání odborníků zabývajících se zpracováním a analýzou přírodovědných a biomedicínálních dat za použití nástrojů moderní informatiky.
- ENBIK pokrývá obory souhrnně označované jako „life science informatics“, mezi které patří např. bioinformatika či chemoinformatika.

Témata

- Konferenční témata zahrnují všechny aspekty výpočetní biologie, bioinformatiky či chemoinformatiky, jako jsou např. počítačová genomika a proteomika, analýza genové exprese, fylogenetická analýza, systémová biologie, strukturní bioinformatika, počítačový návrh léčiv, bioinformatické a chemoinformatické algoritmy či modelování biomolekul.

Další informace

- Jednacím jazykem je čeština či slovenština.

- Místo konání:

Zámecký hotel Maxmilián, zámek Loučeň, okres Nymburk
<http://www.zamekloucen.cz/zamecky-hotel-maxmilian>

<http://www.enbik.cz/enbik2016>

Kontakt

Doc. Daniel Svozil
Laboratoř informatiky a chemie

adresa: VŠCHT Praha
Technická 5
166 28 Praha 6
e-mail: svozild@vscht.cz
telefon: +420 220 444 391



Anaerobní kompostování a výroba elektrické energie

Anaerobní kal je polotuhá hmota obsahující organické a anorganické látky a je obýván rozmanitým společenstvím mikroorganismů. Běžně vzniká při čištění odpadních vod. Může být využit v kapalném stavu pro výrobu bioplynu, kde zmíněné mikroorganismy postupně degradují přidávané substráty za vzniku směsi převážně methanu a CO₂. Po odvodnění, za účelem snížení objemu, může být kal spálen, uložen na skládku nebo kompostován. Kompostování slouží k vytvoření degradované organické hmoty, která je následně vrácena do půdy. Následující práce ukazuje, že je možné spojit kompostování s produkcí elektrické energie.

Hang Yu a kol. využili mikrobiální palivovou celu (microbial fuel cell, MFC) k produkci elektřiny z odvodněného kalu pomocí mikroorganismů v něm obsažených. MFC se běžně používá ke studiu produkce elektřiny pomocí mikroorganismů, kde kombinuje anaerobní degradační procesy s elektrochemickou oxidací = konverze chemické energie na elektrickou. Systém obsahuje dvě komůrky oddělené membránou propustnou pro kationty. V anodovém prostoru obsahujícím mikroorganismus a „palivo“, probíhají oxidační procesy, při nichž se elektrony přenášejí na anodu. Z anody se elektrony přenášejí vodičem na katodu, která je ponořena do roztoku elektrolytu. Současně dochází k putování protonů přes membránu do katodového prostoru. Z katody se přenášejí elektrony na rozpuštěnou látku, ta redukuje kyslík, který s protony vytvoří vodu (https://en.wikipedia.org/wiki/Microbial_fuel_cell).

V laboratorním měřítku se Hang Yu a ostatním podařilo dosáhnout napětí 0,6 V a silové hustoty 5,6 W/m³. Navíc bylo zjištěno, že v porovnání s běžným anaerobním kompostováním urychlila „bioelektrogenese“ rozklad organické hmoty, kde výsledný rozdíl činil asi 7 %. Je zjevné, že využití odpadního kalu se z energetického hlediska dále diverzifikuje a že je slibným zdrojem pro produkci čistší energie s přesahem do zemědělství.

Hang Yu et al. (2015), Bioresource technology 193, 1-7.

Probiotika bojují proti infekcím způsobeným mikrobiálními biofilmy

Již před stoletím bylo pozorováno, že určité střevní bakterie udržují nebo zlepšují zdravotní stav člověka potlačením růstu toxigenních bakterií. Prospěšné střevní bakterie (používané jako probiotika) byly identifikovány převážně jako zástupci rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Později byla definována teorie střevní toxemie, která popisuje kvalitativní a kvantitativní změny střevní mikroflóry, její metabolické aktivity a lokální distribuce. Díky moderním metodám byly identifikovány zdraví prospěšné kmeny střevních bakterií a popsány mechanismy jejich účinků: pomáhají člověku vstřebávat živiny degradací potravy, soutěží o životní prostor s patogeny a v interakci s epiteliálními buňkami produkují anit-

mikrobiální peptidy. V neposlední řadě jsou důležité pro stimulaci vývoje imunitního systému.

Nyní jsou studovány možnosti využití probiotik proti rozvoji různých typů patogenních biofilmů, které se mohou tvořit v různých částech těla. Nejčastěji se s takovým biofilmem setkáváme v ústní dutině, kde se tvoří zubní plak. Ten může přerůst až v odolný biofilm v důsledku nerovnováhy mezi „domácími“ a patogenními mikroorganismy. Aplikací vhodných probiotik lze potlačit tvorbu takového biofilmu. Například u *Lactococcus lactis* NCC2211 byla zjištěna schopnost začlenit se do biofilmu a tím mimikovat zubní plak. Uvnitř biofilmu moduloval růst bakterie *Streptococcus sobrinus* OMZ176 způsobující zubní kaz. V jiném případě, biosurfaktant produkovaný bakterií *Lactobacillus fermentum* potlačoval schopnost tvořit biofilm u patogena *Streptococcus mutans*. Obecně byla u různých kmenů laktobacilů zjištěna schopnost potlačovat růst, tvořit biofilm a snižovat adhezi u posledně zmíněného patogena. Podobné efekty byly pozorovány například při problémech s močovým traktem nebo u ženské bakteriální vaginózy. Zde byl také zaznamenán významný terapeutický účinek laktobacilů. Další místo, které je osídleno různými mikroorganismy je kůže. Špatná hojitelnost i drobných zranění může spočívat v přítomnosti biofilmů tvořených nežádoucími bakteriemi. Přesto je nutné probiotika dále studovat a zjišťovat jejich terapeutické účinky v daných případech.

Závěrem je třeba dodat, že při aplikaci probiotik je třeba brát v úvahu různé faktory (pH, výběr vhodného kmene atd.), protože existují důkazy o tom, že za určitých podmínek sama probiotika mohou tvořit nežádoucí biofilmy nebo dokonce podporovat rozvoj biofilmů patogenních bakterií.

Claudia Vuotto et al. (2014), International Journal of Oral Science 6, 189-194.

Biodegradovatelné biofilmy pro odchyt cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells, CTCs) pocházejí z primárního nebo metastazujícího nádoru a krevním řečištěm jsou šířeny do jiných částí těla, kde mohou tvořit další ložiska nádoru. Izolace CTCs je zajímavá v tom, že lze získat buňky přímo od pacienta s rakovinou a studovat je za účelem stanovení diagnózy a léčebného postupu. Postup je také šetrnější k pacientovi, protože nevyžaduje invazivní biopsii. Izolace CTCs dosud využívá postupů v makro- a mikroměřítku. V makroměřítku se používá gradientová centrifugace nebo mikrofiltrace. Pro mikroměřítko byly vyvinuty například DNA aptamery imobilizované na silikonových nanovláčkách, kryogely, filmy z uhlíkových nanovláček nebo se využívají interakce calmodulinu s calmodulinem interagujícím s peptidy v prostředí Ca²⁺ iontů. Pro další studium CTCs musí být zachovány dvě důležité podmínky: a) životaschopnost buněk, b) nezměněný fenotyp buněk. Fenotyp může být ovlivněn například

střížnými silami, změnou teploty během procesu, agresivními chemikáliemi nebo UV expozicí.

Skupině Wei Li se podařilo zachytit rakovinné buňky pomocí mikrofluidního zařízení (^{HB}CTC-chip) vybaveného novým biodegradovatelným nanofilmem, na jehož povrchu byly zakotveny protilátky proti různým povrchově specifickým markerům. Základ biofilmu tvoří vrstvy anionických a kationických polymerů. Zde byly vykoušeny kombinace alginátu a kyseliny hyaluronové (anionické) na jedné straně a poly-L-lysinu, chitosanu, diethylaminoethyl-dextranu a polyallylaminhydrochloridu (kationické) na straně druhé. Nanofilm byl uspořádán do pěti vrstev (systémem layer-by-layer), kde na poslední, anionickou vrstvu je navázán biotin, který je k avidinu vázán přes fluorescenční barvičku DyLight 650 pro vizualizaci formujícího se filmu. Na avidin pak byla navázána protilátka proti určitému povrchovému markeru. Na různých variantách filmu bylo testováno jeho formování a také degradace pomocí alginátlyasy nebo hyaluronidasy za účelem uvolnění zachycených rakovinových buněk. Varianta alginát/polyallylaminhydrochlorid vykazovala rovnoměrně rozloženou fluorescenci na povrchu filmu, to znamená, že polymer byl uniformní a také minimální fluorescenci po štěpení alginátlyasou, což svědčí o dobré rozložitelnosti filmu. Takto zkonstruovaný čip byl použit pro zachycení CTCs vpravených uměle do krve a také při reálném odběru od pacienta. V případě uměle vytvořeného vzorku bylo dosaženo 80 % zachycení ze všech aplikovaných CTCs. Z tohoto vzorku bylo poté uvolněno enzymatickou hydrolýzou 95 % buněk, jejichž životaschopnost se blížila 90 %. Ze vzorku pacienta byly CTCs úspěšně zachyceny a uvolněny pomocí alginátlyasy.

Jedná se o další malý krůček na cestě k individuální léčbě?

Wei Li et al. (2015), *Biomaterials* 65, 93-102.

Detektory schopné detekovat nanotoxicitu

V dnešní době jsou nanotechnologie nejen zavedenou vědní disciplínou, ale s jejich produkty se denně setkáváme, aniž bychom si to třeba uvědomovali. Možná je to v tom, že jsou tak „malé“. Vesměs se jedná o různé typy nanočástic používaných v medicíně, potravinářství, kosmetickém průmyslu atd. I když jsou nanomateriály připravovány z inertních prvků jako je např. zlato, na nanoúrovni mohou být tyto látky reaktivní. Tím se nabízí otázka, zda a jak nanočástice interagují s biologickým materiálem a jestli dochází k jeho poškození. Nanotechnologie tedy dala vzniknout novému oboru zvanému nanotoxikologie, která se zabývá toxicitou nanomateriálů (<https://en.wikipedia.org/wiki/Nanotoxicology>). Tento obor se snaží postihnout potenciální rizika pro lidské zdraví spojená s používáním nebo konzumací produktů z nanomateriálů.

V současné době jsou hledány spolehlivé a citlivé metody pro detekci této toxicity. Existují různé spektrofotometrické metody (MTT test, vylučování trypanové modři živými buňkami atd.), které nesplňují požadované parametry pro citlivost, přesnost, jednoduché provedení atd.

V současné době se vyvíjejí a testují celobuněčné čipy, tedy samotným detektorem jsou živé buňky. V tomto přístupu lze spatřovat zjevné výhody: a) buňky jsou právě ty objekty, které mohou být ovlivněny toxicitou, b) veškeré interakce probíhají ve fyziologickém prostředí narozdíl od testů *in vitro*. Výsledky takového testu mohou mít lepší vypovídací hodnotu.

Zvláštní pozornost je věnována neuronům, které jsou obecně citlivé k toxinům, cytotoxickým chemikáliím nebo nádorovým agens a tedy jsou potenciálním kandidátem na konstrukci citlivého detektoru.

Imobilizací neuronu na vodivý povrch elektrody je možné sledovat jeho elektrofyziologický stav, kdy je pomocí elektrochemického přístroje měřena výměna elektronů na rozhraní buňka-elektroda (redoxní aktivita). Změna redoxní aktivity buňky vlivem přítomnosti toxinu nám tedy odráží aktuální kondici buňky. I přesto, že je nutné vyřešit různé technické překážky (adheze neuronů na povrch elektrody, vhodná konstrukce čipu, přesný elektrochemický záznam apod.), již nyní byly úspěšně testovány některé nanomateriály. Md. Abdul Kafi a kol. testovali toxicitu oxidu grafenu, který se v dnešní době studuje jako potenciální materiál pro biomedicínské účely. Na svém povrchu obsahuje mnoho hydroxylových skupin, které jsou vhodné pro navázání různých léčiv. Vzhledem k očekávané expanzi tohoto (a nejen tohoto) nanomateriálu v budoucnosti, je na místě zjistit jeho potenciální toxicitu. Akutní toxicita tohoto materiálu na neurálních buňkách HB1.F3 byla pozorována již při koncentraci 25 mg/ml. Stejně hodnoty bylo dosaženo i pomocí MTT testu. Jiným testovaným materiálem byly kvantové tečky (quantum dots), což jsou nanokrystaly složené převážně z jádra (CdSe) a obalu (ZnS). Tyto materiály nyní hledají uplatnění v elektronice (nahrazení displejů LCD a OLED). V biomedicíně by se mohly využít pro vizualizaci tam, kde nevyhovují běžné fluorescenční barvičky a také by mohly na svém povrchu nést různé ligandy. Navázáním na určitou molekulu by bylo možné sledovat její cestu v živém organismu. Md. Abdul Kafi a kol. opět testovali elektrochemickou metodu versus MTT test. V tomto případě byly pomocí čipu stanoveny nižší koncentrace vyvolávající toxicitu než MTT testem. Výsledky tedy ukazují i na vyšší citlivost redoxního prostředí buňky vůči toxinům než některé metabolické pochody.

Zdá se, že díky neurálním čipům by v budoucnu bylo možné spolehlivě testovat nově vznikající nanomateriály před tím, než vstoupí do průmyslové výroby.

Md. Abdul Kafi et al. (2015), *Nanomaterials* 5, 1181-1199.

zpracoval Tomáš Podzimek, VŠCHT Praha

TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH KMENOVÝCH BUNĚK – BUNĚČNÁ TERAPIE V HEMATOLOGICKÉ PRAXI

Marie Dobrovolná

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; marie.dobrovolna@uhkt.cz

Úvod

Buněčná terapie bývá v současné době často představovaná jako nový trend v medicíně. Pozornost laické veřejnosti je nejčastěji zaměřena na komerční použití produktů buněčné terapie nabízených v reklamách nebo možnosti vyrábět tělesné „náhradní díly“ na míru. V odborném tisku je pak buněčná terapie nejčastěji spojována s výzkumem biologického potenciálu kmenových buněk či s možností přeprogramování buněk a řízení jejich schopnosti dělení na další specializované typy tkání.

Největší takový potenciál mají buňky embryonálních tkání (jsou pluripotentní), mohou z nich vznikat buňky jakýchkoli tkání, ale jejich výzkum a hlavně budoucí možné klinické využití naráží na řadu etických problémů. I dospělí jedinci mají však ve svém těle určité, byť malé, množství kmenových buněk a buněk s potenciálem dalšího vývoje, i když pouze do určitých typů specializovaných buněk a tkání (multipotence). Někde na pomezí mezi embryonálními a dospělými somatickými kmenovými buňkami stojí mírou svého proliferačního potenciálu buňky pupečnickové krve. Ty se spolu s krvetvornými kmenovými buňkami kostní dřeně nebo periferní krve využívají již po několik desítek let pro klinicky osvědčený a nejrozšířenější typ buněčné terapie – transplantaci krvetvorných kmenových buněk. S prohloubením znalostí o příčinách vzniku řady chorob se dá do budoucna předpokládat, že se indikace k tomuto typu buněčné terapie rozšíří i mimo hematologii.

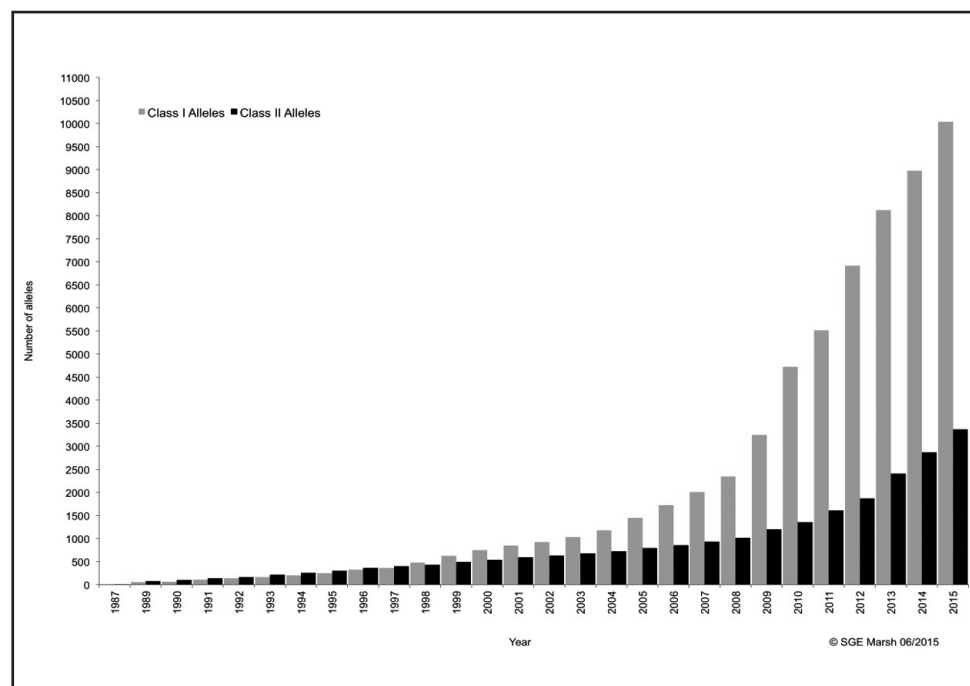
Transplantace kmenových krvetvorných buněk

Náhrada nemocné krvetvorby pacienta převodem (infuzí) zdravých krvetvorných kmenových buněk dárce dává naději na trvalé vyléčení tak závažných onemocnění jako jsou vrozené poruchy krvetvorby (např. některé druhy anémií) nebo poruchy získané během života, nejčastěji malignizací nedospělých krevních buněk (myeloidní a lymfoidní leukémie), nebo vznikem maligního klonu buněk v tkáních přímo souvisejících s krvetvorbou (lymfomy)¹. Transplantace kmenových buněk krvetvorby umožňuje také, zejména u dětí, léčbu poruch imunitního systému (vrozené imunodeficiency) nebo některých metabolických chorob².

Zdrojem hematopoetických kmenových buněk může být kostní dřeň nebo periferní kmenové buňky dárce po stimulaci růstovými faktory nebo buňky pupečnickové krve od příbuzného nebo nepříbuzného dárce. Léčba, při které jsou krvetvorné kmenové buňky získány od pacienta v době bez přítomnosti nemoci (tzv. autologní transplantace)³, je vhodná pouze u méně agresivních druhů onemocnění. U onemocnění, kde je vysoké riziko, že se nemoc opět vrátí a pacient relabuje, jsou aplikovány buňky jiného člověka – příbuzného nebo nepříbuzného (alogenní transplantace). Riziko relapsu je v tomto případě nižší, protože buňky alogenního štěpu po převodu do pacientova organismu začnou v jeho vnitřním prostředí uplatňovat svůj geneticky vrozený „funkční program“ a obnovují nejen krvetvorbu, ale přinášejí také dárcovský imunitní systém, který může působit proti přežívajícím maligním buňkám⁴.

HLA

Tkáňová slučivost (histokompatibilita) je geneticky určená individuální výbavou alelických forem genů HLA systému (Human Leukocyte Antigens)⁵, který představuje hlavní histokompatibilní systém (MHC) člověka známý svým extrémním polymorfismem⁶ (Obr. 1). Geny tohoto systému patří strukturně do imunoglobulinové superrodiny a kódují tři různé třídy polypeptidů, které určují vrozené charakteristiky fungování a regulace imunitního systému.

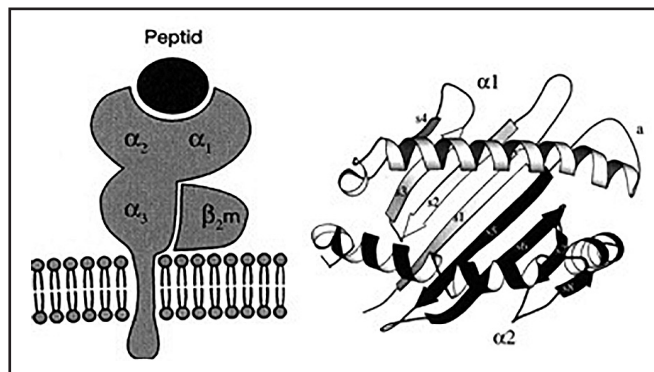


Obr. 1: Přehled počtu známých HLA alel, staženo z <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> dne 6. 8. 2015.

Produkty MHC označované jako molekuly MHC (nebo HLA) byly původně popsány při studiu přenosu tkání, a proto bývají i dnes často označovány jako transplantační antigeny, i když jejich význam je mnohem širší a komplexnější. Zajišťují totiž odlišení vlastních a cizích buněk, selekci při vývoji lymfocytů (odstranění autoreaktivních klonů), rozpoznání intra- i extracelulárních patogenů, určují vnímavost k některým chorobám a s některými onemocněními jsou dokonce asociované⁷.

Rozeznání přítomnosti „cizího“ je založeno na tom, že cizorodý peptidový fragment se váže svou částí na HLA molekulu, je vystavován na povrchové buněčné membráně a zprostředkovává reakci buňky s receptorem Tlymfocytu. Repertoár takto HLA molekulou vázaných peptidů je dán strukturou vazebného žlábků na HLA molekule, ale je také ovlivněn tím, jak se antigen dostává do buňky, jakými mechanismy je degradován a jaké buněčné cesty vedou k vazbě peptidu na HLA molekulu.

HLA systém je rozdělen na tzv. třídy – nejvýznamnější jsou geny HLAA, HLAB, HLAC (HLA I. třídy) a HLADRB1, DQB1 (HLA II. třídy). HLA molekuly I. třídy⁸ (Obr. 2) vystavují peptidy endogenní, tedy peptidové fragmenty vzniklé degradací intracelulárních proteinů (např. při množení viru štěpením bílkovin vzniklých v cytosolu) a exprimují se na všech somatických jaderných buňkách, nejvíce na buňkách aktivních v imunitním systému.

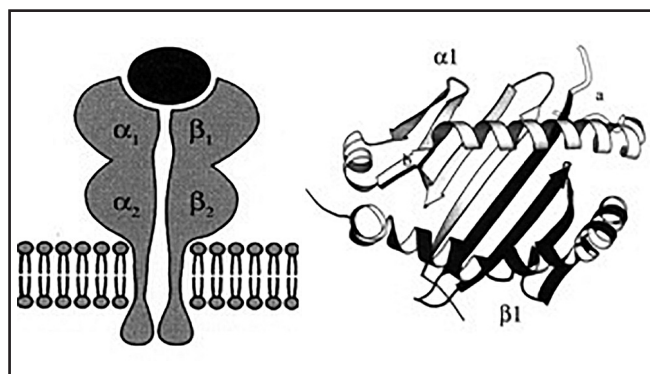


Obr. 2: Schématické zobrazení molekuly HLA I. třídy a tvaru jejího vazebného žlábků (převzato z Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R., Základy imunologie, Triton (2013)). Schematické znázornění transmembránové struktury molekuly HLA I. třídy (vlevo) zakončené oblastí vázající peptidové fragmenty (tzv. vazebný žlábků) a pohled shora na jeho tvar (vpravo).

Molekuly HLA II. třídy⁸ (Obr. 3) naopak váží fragmenty bílkovin extracelulárního původu, které se dostanou do buňky v endosomu a jsou degradovány v jeho kyselém prostředí.

Peptidové fragmenty vázané v komplexu s HLA molekulou jsou vystaveny na povrchu antigen prezentujících buněk (APC), jako jsou Blymfocyty, dendritické buňky a makrofágy, kde je může rozpoznat Tlymfocytární systém. Úkolem tohoto mechanismu je spustit odpověď pouze na takové podněty z prostředí, které vyžadují imunitní reakci a vedou k produkci odpovídajících protilátek proti antigenu⁹.

Studium patogeneze řady onemocnění ukazuje, že vznikají jako důsledek nepřiměřené nebo chybné imunitní odpovědi na patogenní podněty z vnitřního i vnějšího prostředí, a tak se uplatnění buněčné terapie krvetvornými kmenovými buňkami může rozšířit i do dalších lékařských oborů^{10,11}.



Obr. 3: Schématické zobrazení molekuly HLA II. třídy a tvaru jejího vazebného žlábků (převzato z Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R., Základy imunologie, Triton (2013)). Molekula HLA II. třídy (vlevo) má transmembránovou strukturu, její vazebný žlábků je na svých okrajích otevřený (vpravo pohled shora) a umožňuje vazbu delších peptidových fragmentů.

Stanovení HLA shody pro transplantace krvetvorných buněk

HLA genotyp se pro transplantace krvetvorných buněk stanovuje v celkem 5 lokusech HLA I. třídy (A, B, C) a HLA II. třídy (DRB1, DQB1). Stanovení probíhá ve dvou rovinách rozlišení – na úrovni alelických skupin (nízké rozlišení), kdy se blíží sérologickému stanovení antigenů, a vysoké rozlišení s detekcí jednotlivých alel dané alelické skupiny. Pro první předběžné stanovení genotypu a posouzení možné kompatibility stačí vyšetření ve 3 lokusech HLAA, B a DRB1 na úroveň nízkého rozlišení. U pacienta a pro něho vhodného příbuzného či nepřibuzného dárce je pak nutné vyšetření alel ve všech 5 lokusech.

Výběr molekulárně genetické metody závisí na účelu vyšetření¹². V registrech nepřibuzných dobrovolných dárců je hlavním úkolem ekonomicky efektivně typizovat velká množství potenciálních dárců tak, aby z nich bylo možno rychle vyhledat pro konkrétního pacienta vhodného dárce. Zde se uplatňují metody s velkou kapacitou průchodu vzorků a nízkými náklady, jako např. pyrosekvenování (NGS – Next Generation Sequencing)^{13,14}.

Stanovení genotypu pacienta, výběr příbuzného dárce nebo potvrzení a upřesnění genotypu nepřibuzného dárce z registru je naopak úkolem HLA laboratoře transplantačního centra^{15,16}, jejímž cílem je dosáhnout maximálního alelického rozlišení u menšího počtu vzorků. Tyto laboratoře využívají komerční CE IVD kity (*In Vitro* Diagnostic medical device, zdravotnický prostředek určený pro *in vitro* diagnostiku), jak pro izolaci DNA z periferní krve, stěru bukalních sliznic, slin nebo jiných tkání, tak pro PCR amplifikaci a následnou detekci ampliconů.

Analýza se zaměřuje na polymorfismus oblasti vazebného žlábků, který je kódovaný u HLA I. třídy 2. a 3. exonem, u HLA II. třídy 2. exonem. Pro přesné určení pořadí nukleotidů testovaného úseku DNA je vhodná metoda přímého sekvenování (SBT – Sequence Based Typing) Sangerovou metodou. Uvedené exony jsou sekvenovány v obou směrech, pro lokusy HLA II. třídy může být prováděna analýza dalších doplňkových sekvencí v závislosti na použitém kitu. Vyhodnocení je prováděno porovnáním získaných sekvencí s pravidelně aktualizovanou databází v daném lokusu známých alel HLA systému¹⁷ pomocí specializovaného softwaru. K upřesňování nejednoznačných výsledků nebo stanovení na úrovni nízkého rozlišení bývají používány méně přesné metody, např. PCRSSP (PCR se sekvenčně specifickými primery). Při ní jsou používány primery specifické přímo pro daný lokus či alelickou skupinu (odlišné sety primerů) a je založena na detekci bodových mutací (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms). Ke každé primerové směsi je přidán další primerový pár jako vnitřní pozitivní kontrola úspěšné amplifikace. Kombinací metod lze dosáhnout odstranění nejednoznačných výsledků a určení jednotlivých HLA alel.

Výběr dárce

Vzhledem k tomu, že HLA kompatibilita je považována za důležitý faktor¹⁸ úspěšnosti provedené transplantace, je tedy primárně vyhledáván HLA shodný příbuzný nebo nepříbuzný dárce^{19,20}, shoda v krevní skupině není vyžadována, ale pouze upřednostňována^{21,22}.

Prvním krokem k rychlému nalezení vhodného dárce je vyšetření rodiny nemocného, kde se pro 20 až 30 % pacientů najde shodný dárce. Pro ostatní je nutno začít vyhledávání v registrech nepříbuzných dárců, čímž se termín transplantace posouvá o 2 – 3 měsíce. Tento čas je nezbytný pro elektronické vyhledání vhodného dárce podle předběžných dat z registrů, pro navázání kontaktu s potenciálním dárce a ověření jeho zdravotní způsobilosti i ochoty darovat. Doplnění výchozích HLA dat, ev. jejich rozšíření, může odhalit neshodu s pacientem. V této fázi může vypadnout až třetina potenciálních dárců. Proto je vhodné vyšetřovat najednou více možných dárců, ze kterých klinický lékař provede definitivní výběr. Molekulárně genetické vyšetření HLA polymorfismu tento proces hledání dárce zdržuje zcela minimálně. Stanovení HLA polymorfismu pomocí molekulárně genetických metod a zhodnocení kompatibility s pacientem může být provedeno v řádu několika dní od přijetí vzorku do HLA laboratoře transplantačního centra.

Transplantace nesmí být spojena s nebezpečím přenosu zdravotních problémů dárce na pacienta – příjemce. Proto jsou z dárcovství vyloučeni lidé po prodělané léčbě nádorového onemocnění, po transplantaci orgánů a tkání, s krvácivými stavy, s trvalou medikací pro onemocnění srdce, cév, plic, kloubů a zažívacího systému, s diabetem, stejně jako s těžšími formami alergie (přehnaná imunitní reakce na vnější alergenní podnět), epilepsií nebo jinými záchvatovitými stavy. Velká pozornost je věnována ověření infekčních markerů dárce, který by neměl prodělat krví přenos-

né infekce (HIV, žloutenka typu B a C, syfilis, malárie, Creutzfeld-Jacobova nemoc, apod.).

Odběr štěpu musí být bezpečný i pro dárce, který by tedy neměl trpět onemocněním, které by se mohlo v souvislosti s odběrem znovu aktivovat (tuberkulóza, sarkoidóza, autoimunitní onemocnění). Dárce by měl být dále právně odpovědný, netrpět závažnější psychickou poruchou, neměl by kvůli nebezpečí přenosných infekčních nemocí užívat návykové látky ani provozovat rizikový sex.

Transplantace krvetvorných kmenových buněk jako střet dvou imunit

Transplantace prováděná pro osvojení dárce krvetvorby je také procesem adopce dárce imunity. Před převodem štěpu, tj. multipotentních dospělých kmenových buněk (CD34+), musí být pacient „připraven“ na to, aby jeho organismus štěp přijal. Přípravný režim chemoterapií či radioterapií a použitím antithymocytárního globulinu znefunkční nebo výrazně utlumí jeho imunitní systém, což minimalizuje pravděpodobnost imunitní reakce na podaný štěp, a to i v případě shody v testovaných HLA lokusech.

Po transplantaci může nastat reakce příjemce proti štěpu (Host versus Graft – HvG) vedoucí k nepřijetí či odhojení štěpu²³. Včasné přijetí štěpu po transplantaci je nutné pro náhradu krvetvorby a fungování imunity dárce proti infekcím z vnitřního i vnějšího prostředí pacienta (Graft versus Infection – GvI). V případě maligních onemocnění je také žádoucí reakce štěpu proti zbytkové populaci nádorových buněk²⁴ (Graft versus Leukemia – GvL). Vzhledem ke komplexnímu charakteru imunogenicity transplantovaných buněk mohou vyvolat reakci štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease – GvHD), která v různé intenzitě může postihnout kůži a sliznice, zažívací ústrojí či játra. Tyto projevy mohou postihovat i různé orgány najednou a mohou mít akutní nebo chronickou podobu. Chronická GvHD se může demonstrovat podobně jako autoimunitní onemocnění (sklerodermie, Sjögrenův syndrom). Těžké formy GvHD mohou vést až k úmrtí pacienta.

Závěr

HLA geny testované pro stanovení tkáňové kompatibility mezi dárcovskými multipotentními buňkami štěpu a příjemcem představují sice pouze zlomek celého lidského genomu (asi jednu tisícinu), ale díky extrémnímu výskytu jejich individuálních forem (polymorfismu) se dosud ani v rozsáhlých studiích nepodařilo jednoznačně stanovit permissivní HLA neshody ani takové, které by měly být z hlediska celkové úspěšnosti transplantace zcela zakázány. Ukazuje se, že význam neshod se projevuje v kontextu řady nonHLA faktorů, jako je typ aplikovaných buněk (kostní dřeň, periferní kmenové buňky krvetvorby), typ diagnózy, biologický stav pacienta a zejména včasnost provedení transplantace.

Transplantace krvetvorných buněk je v současnosti, i přes řadu stále ještě nejasných faktorů ovlivňujících její úspěšnost, ukázkou buněčné terapie „šité pacientovi na míru“, která dává naději na dlouhodobé přežití

nebo úplné vyléčení jinak nevyléčitelných onemocnění. Celosvětový sběr dat z transplantačních programů jednotlivých center a jejich statistické vyhodnocování přispívá k optimalizaci léčebných protokolů a zdoko-

nalování podpůrné péče o transplantované pacienty, která nezanedbatelně zlepšuje úspěšnost léčby i kvalitu jejich života.

Literatura

1. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, et al.: Hematologie – přehled maligních hematologických nemocí, Grada Publishing, a. s. 2008.
2. Shenoy S, Boelens JJ.: *Curr. Opin. Pediatr.* 27, 9 (2015).
3. Hamadani M.: *Ann. Med.* 46, 619 (2014).
4. Gratwohl A, Baldomero H, Gratwohl M, et al.: *Haematologica*. 98, 1282 (2013).
5. Mehra NK (ed.): The HLA Complex in Biology and Medicine: A ResourceBook. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi 2010.
6. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> dne 6. 8. 2015
7. Brdička R, Didden W.: Genetika v klinické praxi II, Galén 2015.
8. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, et al.: Základy imunologie, Triton 2013.
9. Hauptmann G, Bahram S.: *Curr. Opin. Immunol.* 16, 668 (2004).
10. Díaz D, Alonso JR, Weruaga E: *Methods. Mol. Biol.* 1254, 317 (2015).
11. Díaz D, Muñoz-Castañeda R, Alonso JR, et al.: *Neuroscientist*. (epub 29. 8. 2014).
12. Wassmuth R.: Primer on the HLA System. ecoMED Medizin, Landsberg 2010.
13. Gabriel C, Danzer M, Hackl C, et al.: *Hum. Immunol.* 70, 960 (2009).
14. Holcomb CL, Höglund B, Anderson MW, et al.: *Tissue Antigens*. 77, 206 (2011).
15. Jindra P.: *Transfuze Hematol. dnes*. 19, 70 (2013).
16. Jindra P, Sedláček P, Žák P.: *Transfuze Hematol. dnes*. 20, 6 (2014).
17. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
18. Verneris MR, Lee SJ, Ahn KW, et al.: *Biol. Blood Marrow Transplant.* (epub 6. 6. 2015).
19. Petersdorf EW.: *Curr. Opin. Immunol.* 5, 588 (2008).
20. Weisdorf D, Spellman S, Haagenson M, et al.: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7, 748 (2008).
21. Ozkurt ZN, Yegin ZA, Yenicesu I, et al.: *Transplant. Proc.* 9, 3851 (2009).
22. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeböller H, et al.: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11, 1400 (2009).
23. Ando T, Yujiri T, Nomiya J, et al.: *Exp. Med.* 214, 159 (2008).
24. Weisdorf D, Zhang MJ, Arora M, et al.: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18, 1727 (2012).

Souhrn

Dobrovolná M.: Transplantace krvetvorných kmenových buněk – buněčná terapie v hematologické praxi

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je standardním léčebným postupem pro léčbu maligních i nemaligních hematologických onemocnění a některých poruch imunitního systému. Převod štěpu představuje obnovu krvetvorby, ale také přijetí dárcovské imunity. V případě aplikace buněk příbuzného nebo nepříbuzného jedince je výběr prováděn podle shody v genech HLA systému, který předurčuje charakteristiky imunitního systému a hraje významnou roli v celkové úspěšnosti této léčby. Zkušenosti z tohoto klinického programu přispívají k rozvoji buněčné terapie i pro další onemocnění, u kterých došlo k poškození funkce tkání úrazem nebo nemocí.

Klíčová slova: buněčná terapie, transplantace krvetvorných buněk, HLA geny

Summary

Dobrovolná M.: Haematopoietic Stem Cell Transplantation – cellular therapy in haematological practice

The haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a standard part of treatment protocols for some haematological malignant diseases, inborn errors of hematopoietic and immune system, some metabolic diseases and immunological disorders. The applied graft of haematopoietic stem cells brings to the patient potential reconstitution of haematopoiesis but also engraftment of donor's immunity. The allelic matching in HLA genes, which determine immune system, is considered to be an important factor in HSCT outcome. The experiences of this clinical program contribute to the development of cell therapies for other diseases with loss of tissue or its function due to injury or illness.

Keywords: cell therapy, haematopoietic stem cell transplantation, HLA genes

BIOSYNTÉZA PŘÍRODNÍCH POLYKETIDOVÝCH LÁTEK

Jan Kolek

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; kolekj@vscht.cz

Úvod

V živých organismech můžeme rozlišit dva základní druhy metabolismu. Primární metabolismus zahrnuje především esenciální buněčné reakce, nutné k samotnému přežití a reprodukci organismu (jedná se např. o metabolismus cukrů, nukleových kyselin, lipidů, proteinů atd.). Sekundárním metabolismem vznikají látky zpravidla neesenciální povahy, které však často orga-

nismu poskytují selekční výhodu oproti ostatním konkurentům v okolí či např. možnost přežití v nehostinných podmínkách. Sekundární metabolity často vznikají jedinečnými syntetickými drahami, které navazují na různé meziprodukty primárního metabolismu a jedná se často o biosyntetické dráhy unikátní pouze pro jeden druh či malou skupinu organismů. Dalším zásadním rozdílem je, že na rozdíl od primárních metabolitů

dochází k syntéze produktů sekundárního metabolismu většinou pouze v určité fázi buněčného cyklu. Typicky se může jednat o stacionární fázi růstu, vystavení vnějším stresovým podmínkám (teplota, přítomnost chemikálií, změny pH atd.) či přítomnost kompetujícího mikroorganismu. Sekundární metabolity také často vykazují různé biologické aktivity a řadí se mezi ně např. známé antimikrobiální látky, toxiny, autoregulační faktory, enzymy pro utilizaci neobvyklých substrátů nebo látky zajišťující mezibuněčnou komunikaci či různé další signální molekuly.

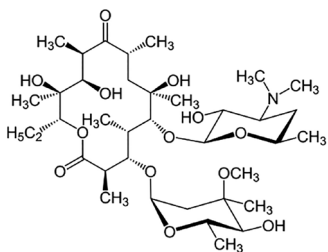
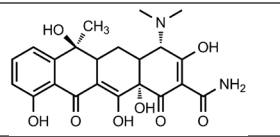
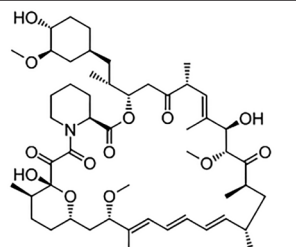
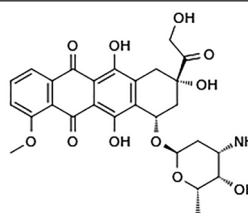
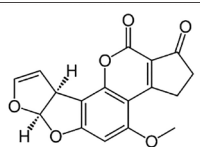
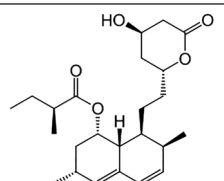
Obrovskou skupinou sekundárních metabolitů jsou polyketidové látky. Do této skupiny patří mnoho klinicky významných látek, jako jsou např. různá antibiotika (makrolidy, tetracykliny), bakteriální a plísňové toxiny (aflatoxiny, mycolakton), imunosupresiva (rapamycin), protinádorové preparáty (doxorubicin), antitumorka, insekticidy a mnoho dalších významných látek. Všechny

polyketidy jsou syntetizovány enzymatickými systémy, které se nazývají polyketid-synthasy. Samotný průběh polyketidové syntézy je děj velmi se podobající syntéze mastných kyselin, se kterou také často sdílí některé enzymy a prekursor. Principem vzniku mastných kyselin i polyketidových látek je postupná kondenzace acyl-CoA substrátů, které jsou postupně spojovány do delších řetězců, které jsou následně různě enzymaticky upravovány.

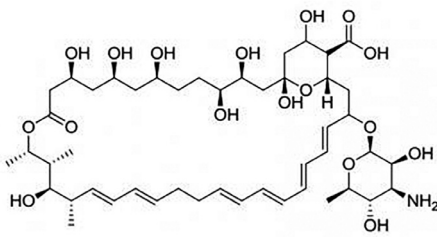
Nejznámější polyketidy a jejich producenti

Typickými producenty polyketidů jsou především prokaryotické organismy (především bakterie spadající do řádu Actinomycetales) a mikroskopické houby. Jejich tvorba byla ale prokázána také např. u některých rostlin či protist¹. Nejznámější a nejvýznamnější polyketidové látky jsou zobrazeny a popsány v tabulce č. I.

Tabulka I: Příklady nejvýznamnějších polyketidů využívaných či sledovaných v klinické praxi.

Látka:	Chemická struktura:	Producent:	Použití:
Erythromycin A		<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (Actinomycetales)	klinicky používané antibiotikum
Tetracyklin		<i>Streptomyces aureofaciens</i> (Actinomycetales)	klinicky používané antibiotikum
Rapamycin		<i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Actinomycetales)	klinicky používané imunosupresivum
Doxorubicin		<i>Streptomyces peucetius</i> (Actinomycetales)	klinicky používaný preparát při chemoterapii nádorových onemocnění
Aflatoxin B1		<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> (Eurotiales)	mykotoxin, častý potravinový kontaminant
Lovastatin		<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Monascus purpureus</i> (Eurotiales) <i>Fusarium pseudocircinatum</i> (Hypocreales)	klinicky používaný přípravek pro snižování hladiny cholesterolu

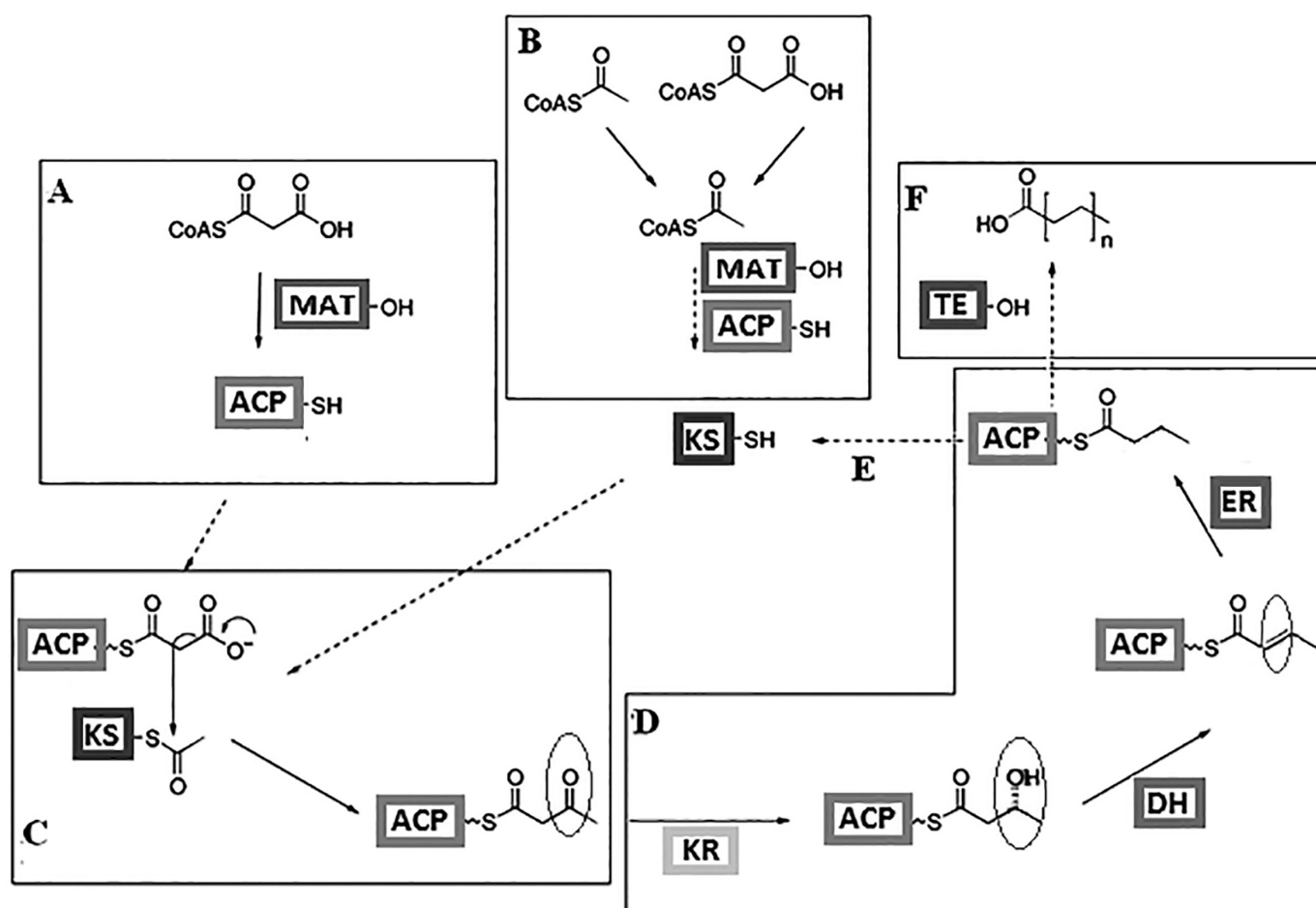
Tabulka I: (pokračování)

Látka:	Chemická struktura:	Producent:	Použití:
Nystatin A		<i>Streptomyces noursei</i> (Actinomycetales)	klinicky používané antimykotikum

Biosyntéza mastných kyselin

Polyketidová syntéza se svým průběhem obecně velmi podobá syntéze mastných kyselin. Syntéza mastných kyselin je v buňkách zajišťována enzymatickými komplexy tzv. synthas mastných kyselin (FAS – Fatty Acid Synthase). FAS se nachází v každé živé buňce a je důležitým enzymatickým systémem primárního metabolismu. Syntéza mastných kyselin je založena na postupné Claisenově kondenzaci malonylových (výjimečně i jiných) podjednotek, které jsou postupně připojovány k tzv. startovací podjednotce. Tou je v tomto případě nejčastěji acetyl, který je odvozen buďto od acetyl-CoA nebo vzniká dekarboxy-

laci malonyl-CoA. Výsledkem je dlouhý acylový řetězec. Během biosyntézy je tato startovací jednotka nejprve navázána na thiolovou skupinu cysteinu enzymu β -ketoacylsynthasy (KS) a dále je malonylová prodlužovací jednotka pomocí enzymu malonyl-CoA:ACP-transacylasy (MAT) navázána z malonyl-CoA na thiolový zbytek specifického proteinu ACP (Acylyl-Carrier-Protein). Po navázání malonylu na ACP katalyzuje KS iniciovaná navázaným acylem první kondenzaci, jejímž výsledkem je vznik β -ketoesteru. V případě bakteriální FAS zprostředkovává tuto prvotní kondenzaci KS typu III (FabH u *E. coli*)². Vzniklý β -ketoester se následně celý váže na ACP (viz Obr. 1).



Obr. 1: Základní schéma průběhu biosyntézy mastných kyselin a polyketidů. (A) vazba malonylu z malonyl-CoA na malonyl-ACP, (B) iniciace KS navázáním acetyl (jeho zdrojem je přímo acetyl-CoA nebo vzniká dekarboxylací malonyl-CoA), (C) kondenzace (přenos malonylu z malonyl-ACP na acyl-KS), (D) tříkrokové odstranění β -kyslíku, (E) přenos rostoucího acylového řetězce z ACP na KS k další kondenzaci, (F) odštěpení finálního produktu při dosažení požadované délky acylového řetězce.

V další fázi následují vždy tři enzymatické kroky vedoucí k odstranění β -kyslíku, který vzniká během každé kondenzační reakce. První reakcí pro odstranění β -kyslíku je redukce ketoreduktasou (KR), následuje dehydratace dehydratasou (DH) a druhá redukce enoylreduktasou (ER). Po proběhnutí těchto tří reakcí je možno připojit ke vznikajícímu řetězci další malonylovou podjednotku a opakovat celý cyklus (viz Obr. 1). V následujících elongačních kondenzacích se uplatňují především KS typu I nebo II (FabB a FabF u *E. coli*). KS I a II jsou velmi příbuzné enzymy, které nelze jednoduše rozlišit na základě jejich sekvence. Přesto však často vykazují rozdílné substrátové specifity (např. KS I se účastní výhradně biosyntézy nenasycených mastných kyselin)².

Reakce postupně pokračuje dalšími elongačními kroky, dokud není dosaženo požadované délky řetězce (nejčastější délka syntetizovaných mastných kyselin je šestnáct uhlíků – kyselina palmitová). Po dosažení této délky se uplatňuje poslední enzym FAS systému – thioesterasa (TE). Výsledný produkt je jeho působením uvolněn ve formě volné mastné kyseliny či acylesteru. Schéma celého procesu vzniku mastných kyselin je zobrazeno na obrázku 1.

FAS systémy se obecně rozdělují do dvou velkých skupin. Systém FAS typu II byl popsán např. u bakterií, některých parazitů, ale také v mitochondriích či chloroplastech. Jedná se o jednotlivé, menší proteiny s mnohaenzymatickými funkcemi, které se postupně podílejí na syntéze mastných kyselin. Oproti tomuto uspořádání FAS typu I je nejčastěji popisován jako jeden velký multienzymový (multidoménový) protein, který obsahuje mnoho katalytických míst pro jednotlivé kroky biosyntézy a zajišťuje všechny kroky biosyntézy. FAS I se typicky nachází u eukaryotních organismů. Toto dělení FAS systémů se stalo základem také pro rozdělení polyketid-synthas, účastnících se biosyntézy polyketidů.

Biosyntéza polyketidů

Biosyntéza polyketidů je stejně jako syntéza mastných kyselin založena na postupné kondenzaci podjednotek acyl-CoA. V buňce je zajištěna mohutnými enzymatickými systémy polyketid-synthas (PKS), které se v mnohém podobají FAS systémům. Nejlépe popsané PKS systémy se nachází především u bakterií a hub. PKS se ale velmi často vyskytují také u rostlin (tvorba flavonů, stilbenů atd.), popř. protist či vzácně i u některých živočichů^{3,4,5}. Od FAS se PKS liší především širokým spektrem substrátů, které mohou jejich enzymy využívat, jako startovací a prodlužovací jednotky. Startovací jednotkou může být nejen FAS systémem klasicky používaný acetyl-CoA, ale běžné je použití např. butyryl-CoA, propionyl-Co, cyklohexyl-CoA nebo i aromatických či zcela specifických startovacích jednotek. Prodlužovací jednotkou může být u PKS kromě klasicky využívaného malonyl-CoA i např. metylmalonyl-CoA, etylmalonyl-CoA, metoxymalonyl-CoA a další molekuly¹. Druhým hlavním rozdílem u PKS je, že vznikající β -ketoester nemusí být vždy podroben kompletnímu tříkrokovému cyklu (KR, DH, ER) vedoucímu k odstranění β -kyslíku, který vzniká při každém připojení prodlužovací jednotky (viz Obr. 1). Před další kondenzací tak mohou proběhnout jen některé nebo žádná z těchto reakcí. Finální polyketidy tedy mohou nést alkylové,

hydroxylové, enylové nebo keto skupiny⁶. Díky častému ponechání keto skupin na vznikající molekule také získaly polyketidy svůj název.

Ve fázi, kdy je rostoucí polyketidový řetězec vázaný na ACP, může proběhnout mnoho dalších modifikací řetězce, který zajišťují přídatné enzymy nebo přímo enzymové domény samotné PKS (oxidace, cyklizace, aromatizace atd.). Po ukončení polyketidové syntézy a fyzického oddělení vzniklého produktu od PKS systému jsou látky často ještě dále modifikovány pomocí přídatných, tzv. „tailoring“ enzymů⁷. Častá je např. metylace, glykosylace, oxidace, další cyklizace nebo aromatizace. Právě rozličnost úprav vznikajícího řetězce, využití různých startovacích a prodlužovacích jednotek a různé další úpravy pomocí dalších přídatných enzymů jsou důvodem obrovské rozmanitosti známých látek vznikajících pomocí PKS.

Rozdělení PKS

Podle vzoru FAS systémů jsou i PKS rozdělovány do skupin I, II a III. V literatuře jsou někdy PKS děleny také na iterativní, modulární a iterativně modulární nebo jsou dokonce díky své složitosti popisovány jako jednotlivé unikátní biosyntetické systémy, které nelze jednoduše zařadit do navzájem jasně oddělených skupin I, II a III⁸.

Celkově využívají PKS systémy dvou hlavních strategií. V prvním případě se jedná o mohutný, multimodulární enzym (PKS I, modulární PKS) ve kterém lze rozeznat jednotlivé moduly (acyltransferasy, ACP, ketosynthasy), které odpovídají za konkrétní kroky polyketidové syntézy⁹. Každý z modulů PKS I zprostředkovává právě jeden krok elongace polyketidového řetězce. Díky tomu, že sekvence PKS I je poměrně konzervovaná napříč organismy a existuje poměrně jasná spojitost mezi sekvencí polypeptidu PKS I a pořadím reakcí, lze poměrně dobře predikovat počet a typ domén výsledného enzymu. Celkově lze tedy z pořadí jednotlivých acyltransferas a geometrie jejich aktivních míst predikovat prekurzor, který bude vložen v určité fázi biosyntézy a tím lze odhadnout i celkovou strukturu výsledné látky¹⁰. Klasickým příkladem PKS I jsou biosyntetické systémy makrolidů, např. modelová polyketidová synthasa DEBS-PKS (6-Deoxyerythronolid B Synthase-PKS) podílející se na biosyntéze antibiotika erytromycinu (viz tabulka I)¹¹.

Druhou skupinou jsou PKS systémy, které využívají enzymatické aktivity nutné pro vznik polyketidového řetězce opakovaně (PKS II, iterativní PKS). Pro jejich zapojení v biosyntéze aromatických bakteriálních polyketidů jsou někdy také označovány jako bakteriální aromatické polyketid-synthasy. Na rozdíl od PKS I systémů jsou enzymové aktivity rozloženy do jednotlivých polypeptidů s různými aktivitami¹². Tyto jednotlivé proteiny přechodně interagují a jsou používány opakovaně během celé biosyntézy. Acyltransferasová doména, která je u PKS I zodpovědná za volbu prekurzoru a její vazbu na ACP, ve shluku genů pro PKS II někdy může zcela chybět. V tomto případě PKS II systém využívá malonyl-CoA acyltransferasu kódovanou synthasou mastných kyselin¹³. Další rozdíl v PKS I a II je ve výběru prekurzoru. Jediný dosud známý prekurzor používaný PKS II je malonyl-CoA (což je také jediný prekurzor používaný FAS). Díky opakovanému (iterativnímu) použití stejných

enzymů během celého procesu biosyntézy je prakticky nemožné učinit jakýkoliv odhad výsledné struktury metabolitu na základě počtu aktivních míst enzymů. Modelovým PKS II systémem je např. PKS typu II podílející se na biosyntéze antibiotika actinorhodinu¹⁴ nebo tetracyklinu¹⁵.

Dalším, zvláštním biosyntetickým systémem, který nemá svůj protiklad ve FAS systémech je PKS typu III (někdy nazýván také modulárně-iterativní PKS). Ten se podílí např. na syntéze chalkonu a dalších metabolitů u vyšších rostlin. Bylo popsáno také několik PKS III systémů u bakterií nebo hub^{16,17}. PKS typu III zastupuje klasicky relativně malý protein (40–47 kDa), který funguje jako homodimerní iterativní PKS. Substrát pro PKS typu III je obvykle malonyl-CoA, který je postupně kondenzován v tetraketidový intermediát, který je později specificky cykлизovaný a případně dále modifikovaný¹⁸. Obě reakce (kondenzace i cykлизace) jsou v případě PKS III systému prováděny v jednom aktivním místě enzymu¹⁶. PKS III nevyužívá narozdíl od ostatních PKS systémů ACP protein, ale iniciuje syntézu přímo na startovací jednotce¹⁹. Tou může být např. acetyl-CoA nebo složitější struktury, jako je např. *p*-kumaryl-CoA a další⁴.

Velká podobnost FAS a PKS systémů umožňuje v některých případech sdílení či nahraditelnost jednotlivých enzymů pro obě dráhy. Typickým příkladem je enzym

MAT, který je tradičně sdílen, jak pro FAS, tak i PKS systém. Byly také popsány látky, které jsou syntetizovány z části FAS i PKS systémem. Zástupci takovýchto FAS/PKS hybridů jsou např. některé komponenty buněčné stěny u mykobakterií²⁰. PKS systémy jsou někdy schopné využívat také enzymů ostatních drah sekundárního metabolismu, jako je tomu např. u PKS-NRPS hybridních systémů, které využívají jak enzymů PKS dráhy, tak i neribozomální peptidové syntézy (NRPS). Příkladem produktu PKS-NRPS systému může být např. myxothiazol izolovaný z producenta *Stigmatella aurantiaca*²¹.

Závěr

Polyketidy jsou velkou skupinou přírodních látek, které vznikají nejčastěji sekundárním metabolismem mikroorganismů. Tyto látky velmi často vykazují různé biologické aktivity, které jsou využitelné např. v medicíně. Zkoumání a bližší poznání průběhu jejich biosyntézy je možné využít např. k umělému posílení jejich produkce nebo k tvorbě nových derivátů již známých polyketidových látek, které by vykazovaly lepší biologické aktivity nebo např. nižší akutní toxicitu.

Poděkování: Práce vznikla za podpory MŠMT (projekt č. MSM 6046137305).

Literatura

1. Staunton J, Weissman KJ.: *Nat. Prod. Rep.* 18, 380 (2001).
2. Rock CO, Jackowski S.: *Biophys. Res. Commun.* 292, 1155 (2002).
3. Zhu G, LaGier MJ, Stejskal F, et al.: *Gene* 298, 79 (2002).
4. Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R.: *Plant. Physiol. Biochem.* 47, 167 (2009).
5. Yu O, Jez JM.: *Plant J.* 54, 750 (2008).
6. Bibb MJ, Biro S, Motamedi H, et al.: *EMBO J.* 8, 2727 (1989).
7. Weissman KJ.: *Methods Enzymol.* 459, 3 (2009).
8. Muller R.: *Chem. Biol.* 11, 4 (2004).
9. Cane DE, Walsh CT.: *Chem. Biol.* 6, 319 (1999).
10. Larsen EM, Wilson MR, Taylor RE.: *Nat. Prod. Rep.* (2015) – in press.
11. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, et al.: *Science* 252, 675 (1991).
12. Hertweck C, Luzhetskyy A, Rebets Y, et al.: *Nat. Prod. Rep.* 24, 162 (2007).
13. Summers RG, Ali A, Shen B, et al.: *Biochemistry* 34, 9389 (1995).
14. Malpartida F, Hopwood DA.: *Mol. gen. Genet.* 205, 66 (1986).
15. Pickens LB, Tang Y.: *Metab. Eng.* 11, 68 (2009).
16. Austin MB, Noel JP.: *Nat. Prod. Rep.* 20, 79 (2003).
17. Katsuyama Y, Ohnishi Y.: *Methods Enzymol.* 515, 359 (2012).
18. Tropf S, Karcher B, Schröder G, et al.: *Chemistry* 270, 7922 (1995).
19. Shen B.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285 (2003).
20. Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, et al.: *Mol. Microbiol.* 24, 263 (1997).
21. Du L, Sanchez C, Shen B.: *Metab. Eng.* 3, 78 (2001).

Souhrn

Kolek J.: Biosyntéza přírodních polyketidových látek

Polyketidy jsou obrovskou skupinou látek řadících se mezi sekundární metabolity. Jsou produkovány především prokaryotními mikroorganismy, ale také např. houbami nebo vyššími rostlinami. Biosyntéza polyketidů je zprostředkována tzv. PKS systémy a obecně se velmi podobná syntéze mastných kyselin. Jedná se o postupnou kondenzaci různých acyl-CoA substrátů, které tvoří delší řetězce a tyto řetězce jsou dále různě enzymaticky upravovány. PKS systémy lze rozlišit na PKS typu I, II a III. Tyto skupiny se od sebe liší v průběhu biosyntézy použitými prekurzory i strukturou vznikajících látek. Polyketidové látky často vykazují zajímavé biologické aktivity a mnoho z nich je používáno v klinické praxi, např. jako antibiotika, antitumorka, kancerostatika atd.

Klíčová slova: polyketidy, PKS, sekundární metabolity, antibiotika

Summary

Kolek J.: Biosynthesis of natural polyketide compounds

Polyketides present a huge family of secondary metabolites which are usually produced by many microorganisms. However, they can be produced also by plants and other eucaryotic organisms. Biosynthesis of polyketides is performed by PKS enzymatic systems. This process is very similar to fatty acid biosynthesis. The base of biosynthesis is consecutive condensation of various acyl-CoA substrates which are formed to the long chain form and enzymatically modified. PKS can be divided into three classes: PKS I, II and III. These groups differ in biosynthesis process, used precursors and also in structure of final compounds. Polyketides often exhibit many biological activities and could be used for example in medicinal practice (like antibiotics, antitumors, cancerostatics etc.).

Keywords: polyketides, PKS, secondary metabolites, antibiotics

VLÁKNITÁ HOUBA *Aspergillus fumigatus* – INFEKCE SPOJENÉ S TVORBOU BIOFILMU

Eva Kvasničková

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; kvasnice@vscht.cz

Úvod

Aspergillus fumigatus je zdánlivě neškodná vláknitá houba, vyskytující se všude okolo nás. Ovšem ve chvíli, kdy dojde ke kontaktu s osobou s výrazně oslabeným imunitním systémem, může způsobit velmi vážné infekce, které mohou mít až fatální následky. *A. fumigatus* je oportunně patogenní plíseň, která způsobuje širokou škálu onemocnění, především dýchacího ústrojí, ale i kontaminace chirurgických materiálů a mnoho dalších komplikací. Faktory virulence tohoto mikroorganismu nebyly dlouho známy. Až v posledních letech se začala vědecká komunita zabývat možností, že by vláknité houby mohly mít schopnost vytvářet biofilm, mikrobiální společenství, které výrazně mění vlastnosti běžně známé u planktonických buněk. Právě tvorba biofilmu je velmi častým důvodem vzniku chronických infekcí, které jsou jen velmi těžko léčitelné doposud známými antimikrobiálními látkami. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby se do širokého povědomí dostaly znalosti o biofilmech vláknitých mikroorganismů a možnostech boje proti infekcím, které způsobují.

Aspergillus fumigatus

A. fumigatus (Obr. 1) je sporulující mikroskopická houba, patří do kmene Ascomycota. Jedná se o termotolerantní mikroorganismus, který je schopen přežívat při teplotě až do 70 °C. Přirozený výskyt tohoto mikroorganismu je především v půdě, kde využívá organickou hmotu¹, velmi často kolonizuje komposty a je jedním z nejvíce přítomných mikroorganismů ve vzdušné mikroflóře². Dlouho byla u této houby známa pouze asexuální forma rozmnožování, ale později se začaly hromadit důkazy o možnosti rekombinace, toku genů napříč populací, přítomnost párovacích typů či exprese pohlavních genů hub. Tak se ukázalo, že *A. fumigatus* má plně funkční sexuální rozmnožovací cyklus, který vede k tvorbě kleistothecia a askospor. Jako teleomorfa *A. fumigatus* byla popsána *Neosartorya fumigata*³.

Světle zelené, výjimečně bílé, konidie vyrůstají v řetězcích bazipetálně ze zelených fialid. Konidie, které se uvolňují do okolní atmosféry, mají průměr dostatečně malý (2 – 3 µm) na to, aby se dostaly až do plicních alveol. Při vdechnutí těchto konidií jsou nejvíce náchylným orgánem pro zasažení plic. Většina jedinců je schopna eliminovat tyto konidie vrozenými imunitními mechanismy, takže byl *A. fumigatus* dříve považován pouze za slabý patogen způsobující alergická onemocnění. Postupně se ovšem situace dramaticky změnila a *A. fumigatus* se stal nejrozšířenějším plísňovým patogenem, který způsobuje závažné až fatální invazivní infekce u imunodeficientních pacientů¹. Až v roce 2005 byla provedena podrobnější studie, která určila, že *A. fumigatus* je spíše saprofytem, než patogenem a k napadení lidského organismu dochází pouze v důsledku

oslabené imunity². V dnešní době je tedy řazen mezi oportunně patogenní mikroorganismy⁵.



Obr. 1: Obrázek vláknité houby *A. fumigatus* pořízený skenovací elektronovou mikroskopií.

Příklady infekcí

A. fumigatus je po *Candida albicans* druhý nejrozšířenější původce houbových infekcí⁶. V dnešní době je 65 % všech těchto infekcí spojeno s tvorbou biofilmu, což souvisí především s rostoucím počtem imunodeficientních pacientů a také se zvyšujícím se využitím biomateriálů v medicíně. Je zřejmé, že se u *A. fumigatus* vyvinuly mechanismy koordinace procesů vedoucích ke tvorbě biofilmu, které negativně zasahují do klinické medicíny a průmyslových procesů⁷.

Chronické aspergilové infekce (plicní aspergilom, aspergilová bronchitida a tracheobronchitida, alergická bronchopulmonální aspergilóza, infekce biomateriálů a další) jsou způsobené právě *A. fumigatus* rostoucím ve formě biofilmu. Oproti tomu onemocnění způsobená invazivními aspergilami jsou více rozptýlená, s častým výskytem angioinvasí (rozšiřování nádorů s vysokou pravděpodobností vzniku vzdálených ložisek nádoru – metastáz) v plicní tkáni. Nicméně i zde jsou propletené vláknité hyfy důležitým faktorem pro vznik infekce. Zejména antifungální léčba je často neúčinná, což může souviset s fenotypem biofilmu⁷.

Aspergilóza je onemocnění, které je spojeno s vysokou mírou úmrtnosti. Největší riziko onemocnění hrozí pacientům s febrilní neutropenií (poklesem počtu neutrofilních granulocytů) získanou například po chemoterapeutickém léčení onkologických onemocnění, pacientům po alogenní transplantaci (transplantovaná tkáň pochází od jedince téhož druhu) krvetvorné tkáně, solidních orgánů (zejména plic) či jiném chirurgickém zákroku, dále pacientům s akutní leukémií, AIDS, pacientům absolvujícím intenzivní léčbu či pacientům s genetickými či funkčními abnormalitami v plicích (například pacienti trpící cystickou fibrózou nebo s chronickým obstrukčním plicním onemocněním)⁷.

Aspergilom

Aspergilom je lokalizovaná infekce, která je tvořena kulovitou spleť hyf a jednoznačně vykazuje vlastnosti biofilmu. Aspergilomy se mohou vyvinout u imunokompetentních pacientů (schopných odpovědět na antigenní podnět), ale většinou vyžadují pro vznik existenci dutin, které jsou často spojeny s předcházejícím onemocněním pacienta tuberkulózou. Některé aspergilomy jsou asymptomatické, nicméně v případě projevu příznaků se jedná nejčastěji o chronický kašel či hemoptýzu (vykašlávání krve či krvavého hleny z dolních cest dýchacích či plic)⁷.

Aspergilová bronchitida

Aspergilová bronchitida je charakterizována bronchiálními houževnatými hleny (obsahujícími mycelia), které vznikají na vnitřní výstelce průdušek, a jsou spojené se vznikem patologického poškození tkání. Tato kompaktní hmota může být následně pacientem vykašlávána. Provedení bronchoalveolární laváže u některých pacientů trpících aspergilózou a následné histologické vyhodnocení získaných vzorků odhalilo přítomnost

velkého množství hyf, ve formě komplexu s mnohobuněčnou extracelulární polymerní matrix (ECM)⁷.

Alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA)

ABPA je imunologicky podmíněné plicní onemocnění, způsobené kolonizací dolních cest dýchacích plísni *A. fumigatus* (Obr. 2).

Často komplikuje život pacientů, kteří trpí astmatem či cystickou fibrózou, protože významně zhoršuje průběh těchto onemocnění. Mezi příznaky doprovázející toto onemocnění patří proximální bronchiektázie (rozšíření průdušek obvykle provázené chronickým infekčním zánětem průdušek), bezprostřední kožní reakce na kontakt s *A. fumigatus* a zvýšení celkové hladiny IgE (imunoglobulinu E) v krvi. Diagnózu je třeba stanovit co nejdříve, protože pacienty s již vzniklými bronchiektáziemi nelze již zcela dekolonizovat a tak vznikají neisté prognózy⁹.

Další infekce

A. fumigatus může vstupovat do hostitele i jinou cestou, než přes dýchací ústrojí (kolonizace různých forem implantátů, ap.), a způsobovat tak další velice vážné infekce, týkající se především infekcí katetrů, kloubních náhrad, kardiostimulátorů, umělých srdečních chlopní a prsních implantátů. Dále bývá spojován se sinus infekcemi, což jsou infekce vedlejších dýchacích dutin nebo jiných anatomických struktur. V roce 2010 bylo dokonce prokázáno, že i přes močové ústrojí může být podpořen vznik aspergilomu⁷.

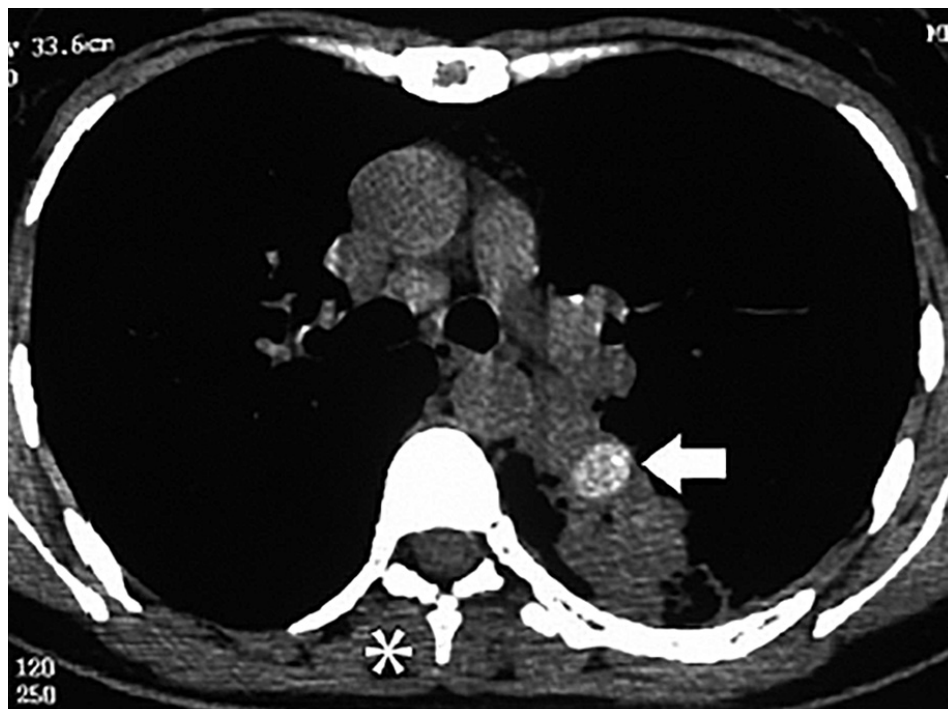
Tvorba biofilmu *Aspergillus fumigatus*

V průběhu posledních let se začalo objevovat mnoho důkazů o možnosti tvorby biofilmu vláknitými houbami. Zcela pochopitelně ale nastává otázka, co je v případě těchto mikroorganismů možné označovat

jako biofilm? Proto byla zavedena definice, která říká, že pokud jsou houby schopné adherovat k povrchu, anebo k sobě navzájem a jsou obaleny exopolymerní matrix, je možné je označit jako mikroorganismy tvořící biofilm⁷.

Nedávné studie naznačují, že tvorba biofilmu *A. fumigatus* může být jedním z nejdůležitějších faktorů virulence. Některé složky buněčné stěny, tvorba enzymů či sekundárních metabolitů a také transportní systémy pro léčiva mohou přispět k vývoji struktury biofilmu, který se vytváří na hostitelských tkáních. Vznikající biofilm je velmi odolný proti většině antifungálních léčebných postupů⁶.

Řada faktorů týkajících se tvorby biofilmu *A. fumigatus* není doposud zcela známa či



Obr. 2. Tomografický snímek plic pacienta trpícího ABPA zobrazuje rozsáhlé bronchiektázie především v pravé plicí pacienta⁸.

objasněna. Jisté ovšem je, že na počátku vzniku chronické infekce *A. fumigatus* je klíčení konidií, vznik mycelia a jeho následná invaze do plicních epiteliálních a endoteliálních buněk⁶. Konidie mohou adherovat na povrch kompatibilního materiálu několika mechanismy, které zahrnují komplexní interakce fyzikální i biologické povahy. Fyzikální vlastnosti podporující adhezi jsou hydrofobicita, elektrostatický náboj a drsnost povrchu. Amfipatické proteiny, zvané hydrofobiny, jsou zprostředkovateli buněčné adheze plísni, a také hrají svou roli při tvorbě vláknitého biofilmu. Hydrofobiny stabilizují adhezi spor na umělé i přírodní hydrofobní povrchy a mohou generovat signály pro morfogenetické změny. Je to skupina malých sekretujících proteinů, jejichž charakteristickým prvkem je osm cysteinových zbytků. Bylo prokázáno, že hydrofobiny *A. fumigatus* jsou zodpovědné za velmi silnou adhezi spor k povrchu. Je zřejmé, že kontakt či přichycení konidií k povrchu jsou nezbytné kroky pro započetí klíčení a následné tvorby hyf⁷.

Hydrofobní ECM, obklopující buňky biofilmu, je označovaná jako mycetoma. Mycetoma je bohatá na polysacharidy (především β -(1,5)-galakto- α -(1,2)-/ α -(1,6)-manan, galaktosaminogalaktan (GAG) a α -(1,3)-glukany), monosacharidy, hydrofobiny, polyoly, proteiny a melanin^{6,10}.

Struktura vláknitého biofilmu *A. fumigatus* je složena z dichotomicky větvených vláken, uzavírajících mezi sebou ostré úhly v různém rozsahu. Velmi důležitou roli pro integritu struktury biofilmu hraje hustota inokulovaných konidií. Nízká koncentrace konidií na počátku procesu dává vznik hustému a snadno rozrušitelnému biofilmu, naopak příliš vysoká koncentrace konidií vede k tvorbě tenkých biofilmů s malým množstvím biomasy. Jako vhodná koncentrace byla stanovena 1.10^5 konidií/ml, kdy jsou produkovány robustní a nejvíce mechanicky odolné biofilmy^{6,7}.

Z hlediska kinetiky je vývoj biofilmu *A. fumigatus* podstatně pomalejší, než vývoj biofilmu *C. albicans*. Lag fáze (adheze a klíčení konidií) probíhá po dobu deseti hodin od inokulace, následně se začnou hyfy proléhat a vytvářet monovrstvu (10 – 16 hodin), až se vyvine složitější struktura biofilmu (16 – 24 hodin). Produkce hydrofobní ECM, která váže hyfy do kohezí struktury, se zvyšuje při zrání biofilmu, kdy se tloušťka biofilmu zvyšuje z 10 na 200 μm ⁶.

Experimentální studie biofilmu *A. fumigatus in vivo* ukázala, že se vytváří různé typy biofilmu, včetně rozdílného složení ECM u různých onemocnění (např. aspergilom či invazivní plicní aspergilózy). Biofilm způsobující aspergilom byl tvořen hyfami obalenými silnější vrstvou ECM, která se skládala z galaktomananu, α -1,3-glukanu a GAG. Oproti tomu biofilm způsobující invazivní plicní aspergilózu nebyl tvořen klasických shlukem hyf, ale oddělenými hyfami. Byl mnohem více odolný, ECM byla méně hustá, tvořená tenčí vrstvou a neobsahovala α -1,3-glukany, což odpovídá funkci α -1,3-glukanů, které způsobují adhezi hyf k sobě navzájem⁶.

Doposud bylo publikováno jen velmi málo poznatků o molekulární biologii a funkční genomice biofilmu *A. fumigatus*. Teprve v roce 2010 byla provedena studie zabývající se transkripčními a proteomickými změnami

při jeho tvorbě. Pro porovnání mycelia planktonických buněk a buněk rostoucích v biofilmu byla po dobu 24 a 48 hodin sledována regulace tvorby proteinů a exprese genů spojených s primárním metabolismem, která poukázala na energetickou závislost vývojových fází mladého biofilmu. Při zrání biofilmu docházelo ke snížení metabolické aktivity, zvýšení počtu hydrofobinů na povrchu buněk a také zvýšení počtu proteinů, které se účastní biosyntézy sekundárních metabolitů, jako je například gliotoxin. Bylo zjištěno, že vznik 36 proteinů je rozdílný u mycelia biofilmu, oproti myceliu planktonických buněk a dalších 78 proteinů se významně mění v průběhu zrání biofilmu. Na základě rozdělení podle FunCat (The Functional Catalogue) se jedná o proteiny, které se účastní metabolismu, proteiny s vazebnou funkcí nebo vyžadující přítomnost kofaktoru a proteiny podílející se na buněčném transportu, usnadněném transportu a dalších transportních cestách⁷. Transkripční profilování dokázalo, že 740 genů (179 genů je v nadprodukcí a 561 genů je utlumeno) je odlišně regulováno u buněk biofilmu oproti planktonickým buňkám. Geny, které byly u buněk biofilmu v nadprodukcí, byly zapojeny zejména do syntézy bílkovin, metabolismu, uchování přebytečné energie nebo to byly geny kódující proteiny s vazebnou funkcí nebo proteiny vyžadující přítomnost kofaktoru. Mnoho utlumených genů bylo zapojeno do přenosu signálu, buněčné diferenciaci, interakce s okolním prostředím, vzniku buněčných komponent, regulace metabolismu a funkčnosti proteinů anebo zániku proteinů či samotných buněk⁷.

Složení buněčné stěny *Aspergillus fumigatus*

Buněčná stěna plísni má zásadní význam pro růst buněk, pro obranu proti imunitní odpovědi hostitele a zároveň je zásobníkem pro efektorové molekuly (antigeny a některé enzymy), které hrají významnou roli při vzniku infekce⁸. Komponenty buněčné stěny *A. fumigatus* hrají hlavní roli při jeho interakci s lidským hostitelem⁶.

Buněčná stěna *A. fumigatus* se skládá téměř výhradně z polysacharidů. Fibrilární jádro se skládá z rozvětveného β -(1,3)-glukanu, ke kterému se kovalentně váží chitin, β -(1,3)-/ β -(1,4)-glukan a galaktomanan. V alkalickém prostředí rozpustná amorfnní frakce se skládá převážně z α -(1,3)-glukanu, který má adhezivní vlastnosti a stabilizuje buněčnou stěnu. Přestože stejné polysacharidy se nacházejí v různých částech *A. fumigatus* (konidie a hyfy), jejich množství a lokalizace jsou rozdílné¹⁰.

Složení buněčné stěny konidií

Konidie mají buněčnou stěnu pokrytou vrstvou hydrofobinů RodAp a RodBp. *RodA* je uspořádán do pravidelného pole tyčinek na povrchu konidií, následovaného vrstvou melaninu. Tyto dvě složky buněčné stěny jsou zodpovědné za hydrofobní vlastnosti a imunologickou inertnost, která svědčí o neschopnosti konidií vyvolat silnou protizánětlivou odpověď cytokinů u hostitelských fagocytujících buněk. Skutečnost, že konidie v dormant-

ním stádiu nejsou rozpoznávány imunitním systémem hostitele, byla prokázána při sledování reakce dendritických buněk a alveolárních makrofágů na extrahované RodAp proteiny, přičemž nebyla zjištěna žádná aktivita imunitního systému. Odstranění hydrofobinové vrstvy chemicky (pomocí kyseliny fluorovodíkové), geneticky (pomocí *DrodA* mutantu) či biologicky (naklíčením konidie) způsobilo aktivování imunitní odpovědi hostitele. Absence hydrofobinů způsobuje odkrytí α -(1,3)-*g*-lukanových řetězců, které zapříčiní aktivaci imunitního systému. To potvrzuje fakt, že konidie v dormantním stádiu mohou být vdechovány bez jakékoliv imunitní odpovědi díky vrstvě hydrofobinů, které dělají konidie pro imunitní systém v podstatě neviditelné¹⁰. Melaninová vrstva (tvořená DHN melaninem), způsobuje stejně jako vrstva hydrofobinů imunologickou inertnost konidií. Ovšem bylo experimentálně prokázáno, že při delecí některého ze tří genů kódujících jeden z prvních tří kroků syntézy melaninu (*PKSP*, *AYG1* a *ARP2*) dojde ke změně buněčného povrchu konidií a dojde k aktivaci dendritických buněk a následné tvorbě cytokinů. U mutací genů v pozdějších fázích syntézy (*Darp1*, *Dabr1* a *Dabr2*) konidie nejsou dendritickými buňkami rozpoznávány. Z toho vyplývá, že přestože melanin jako takový nevyvolává imunitní odpověď hostitele, v případě chybné syntézy může být virulentním faktorem, který změnou složení buněčné stěny konidií způsobí aktivaci imunitního systému¹⁰.

Složení buněčné stěny hyf

Vnější obalová vrstva hyf obsahuje GAG nedávno identifikovaný jako důležitý virulentní faktor infekcí způsobených houbou *A. fumigatus*, který u dormantních konidií zcela chybí. GAG je heterogenní lineární polymer složený z galaktopyranosy (na rozdíl od galaktomananu, který obsahuje galaktofuranosu) a N-acetyl-galaktosaminu, které jsou spojené α -1,4 vazbou. Jakmile konidie vyklíčí v hyfy, vnější vrstvy z povrchu buněčné stěny (vrstva hydrofobinových tyčinek a melaninu) zmizí a odhalí α -(1,3)-glukany (nezbytné pro virulenci *A. fumigatus*), které se tak stanou povrchovou vrstvou. Bylo zjištěno, že v případě nepřítomnosti α -(1,3)-glukanů v buněčné stěně se výrazně snižuje virulentnost daného mikroorganismu¹⁰.

Hyfy rostou buď samostatně, nebo ve formě biofilmu (sít hydrofobních spletenců, obalených ECM). Pokud jsou buňky *A. fumigatus* uspořádány ve formě biofilmu, jsou na povrchu buněčné stěny mycelií α -(1,3)-glukany, které jsou v případě míchané submerzní kultivace umístěny ve spodních vrstvách buněčné stěny¹⁰.

Enzymy a sekundární metabolity

A. fumigatus vylučuje velké množství produktů, včetně degradačních enzymů (proteasy, fosfolipasy), mykotoxinů a dalších sekundárních metabolitů, které jsou škodlivé pro své okolí. Tyto látky usnadňují kolonizaci v plicní tkáni a modulují funkčnost a viabilitu epitelové tkáně. Fosfolipasy jsou klíčové enzymy pro patogenicí

houby. Štěpením fosfolipidů hostitele způsobují nestabilitu membrán a usnadňují průnik do hostitelské buňky. Bylo experimentálně prokázáno, že fosfolipasa D je důležitým faktorem virulence. Mezi mykotoxiny vyvolal největší pozornost gliotoxin, protože má silné imunosupresivní a cytotoxické účinky a byl detekován v průběhu infekcí spojených s *A. fumigatus*. Jeho toxicita tkví především ve snížení počtu neutrofilů při obraně hostitele, pravděpodobně díky zabránění vzniku NADPH oxidasového komplexu v neutrofilech, a tím indukci jejich apoptózy⁶.

Rezistence biofilmu *A. fumigatus*

Bylo zjištěno, že *A. fumigatus* je schopen vytvářet biofilm, který je velmi odolný vůči působení antimykotik. První důkaz o této skutečnosti byl objeven u pacientů trpících aspergilózou⁵.

Antifungální rezistence je pro plísňové biofilmy charakteristická vlastnost. U *A. fumigatus* je míra jeho rezistence závislá na různých vývojových fázích biofilmu. Účinky antifungálních látek byly sledovány v průběhu tří růstových fází biofilmu (8, 12, 24 hodin) a byly prokázány jasné rozdíly v citlivosti vůči použitým látkám v jednotlivých fázích vývoje. Nejcitlivější k antifungálním látkám byl mladý biofilm (8h), oproti biofilmu s prostřední délkou tvorby (12h) či zralému biofilmu (po 24h). Dalšími studiemi bylo potvrzeno, že tyto rozdíly v míře rezistence u jednotlivých fází jsou způsobeny rozdílnou aktivitou efluxních pump. Uvádí se, že tato aktivita se zvyšuje v průběhu dozrávání biofilmu. Transkriptomová analýza ukázala, že maximální aktivita spojená s brzkou vláknitou fází (12h) v definovaných klinických izolátech, a maximální exprese *mdr4* genu (gen kódující transport léků) koreluje s nejvyšším růstem rezistence u 12h populací. Naopak exprese tohoto genu byla minimální u 24h biofilmů, což znamená, že efluxní aktivita závisí na jednotlivých vývojových fázích biofilmu a nabízí se proto možnost, že rezistence biofilmu *A. fumigatus* je dvojité regulována. Zahrnuje aktivitu efluxních pump v brzké až střední fázi vývoje biofilmu a vznik ochranné vrstvy, tvořené extracelulárními polymerními látkami, která se vytváří při maturaci biofilmu⁷.

Reakce buněk uspořádaných v biofilmu na antifungální činidla se oproti planktonickým buňkám výrazně liší. Bylo jasné prokázáno, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimykotik potřebné pro zničení biofilmu jsou až osmkrát vyšší oproti MIC stanovených pro planktonické buňky. *A. fumigatus* se stává stále více odolný vůči polyenům, azolům i echinokandinu (antifungální činidlo). Jako nejúčinnější antifungální činidlo použitelné proti vzniku biofilmu *A. fumigatus* byl určen amfotericin B, dále vorikonazol, kaspofungin a itraconazol⁶.

Závěr

Se zvyšujícím se počtem imunosupresivních pacientů roste i výskyt infekcí způsobených *A. fumigatus*, který velmi snadno adhezuje na lidské tkáně či implantované

materiály používané v lékařství a vytváří velice odolný biofilm. V posledních letech byl učiněn veliký pokrok v poznání některých virulentních faktorů, které jsou příčinou infekčnosti *A. fumigatus*. Byl prokázán vliv jednotlivých komponent buněčné stěny na adhezi *A. fumigatus* k hostitelskému povrchu či na imunologickou inertnost konidií, které snadno a nepozorovaně prochází až do plic, kde následně způsobují nemoci, jako jsou plicní aspergilom, aspergilová bronchitida či alergická bronchopulmonální aspergilóza a mnoho dalších. Dále byl prokázán vliv enzymů a sekundárních metabolitů *A. fumigatus* na usnadnění vzniku infekcí a také byl nastíněn předpoklad pro vznik rezistence

biofilmu *A. fumigatus*, který je často odolný vůči veškerým doposud používaným lékům. Pro navržení nových antifungálních, respektive antibiofilmových metod proti těmto infekcím je nezbytné studovat podrobně mechanismy vedoucí k tvorbě těchto vláknitých biofilmů, pochopit molekulární mechanismy vedoucí ke vzniku jejich rezistence a navrhnout nové látky, které by měly vyšší účinnost a pomohly tak předcházet úmrtí zasažených pacientů.

Poděkování: Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/ 2015) a GAČR grantu 14-23597S.

Literatura:

1. Latgé J-P: *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310 (1999).
2. Tekaia F, Latgé J-P: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 385 (2005).
3. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS: *Nature* 457, 471 (2009).
4. <http://www.pfdd.net/>, staženo 4. 7. 2014
5. Maiorana A, Papi M, Bugli F, et. al.: *Appl. Surf. Sci.* 279, 409 (2013).
6. Kaur S, Singh S: *Med. Mycol.* 52, 2 (2013).
7. Ramage G, Rajendran J, Gutierrez-Correa M, et. al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 324, 89 (2011).
8. Agarwal R: *Mycopathologia* 178, 447 (2014).
9. Greenberger PA: *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 685 (2002).
10. Beauvais A, Fontaine T: *Mycopathologia* 178, 371 (2014).

Souhrn

Kvasničková E.: Vláknitá houba *Aspergillus fumigatus* – infekce spojené s tvorbou biofilmu

Aspergillus fumigatus je oportunně patogenní vláknitá houba, která je schopna vytvářet biofilm, a tím způsobovat velice závažné až fatální onemocnění u imunosuprimovaných pacientů (plicní aspergilom, aspergilovou bronchitidu, alergickou bronchopulmonální aspergilózu, infekci biomateriálů a mnoho dalších). Proto je nezbytné studovat podrobně mechanismy tvorby těchto vláknitých biofilmů, pochopit molekulární mechanismy vedoucí ke vzniku jejich rezistence a případně navrhnout nové látky, které by pomohly předcházet úmrtí zasažených pacientů.

Klíčová slova: *Aspergillus fumigatus*, biofilm, aspergilom, aspergilová bronchitida, alergická bronchopulmonální aspergilóza, infekce tělních implantátů

SUMMARY

Kvasničková E.: Filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* – biofilm-associated infections

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogenic filamentous fungus which is capable forming a biofilm. The biofilm of *A. fumigatus* causes very serious or even fatal diseases of immunosuppressed patients (pulmonary aspergilloma, *Aspergillus* bronchitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, infection of biomaterials and many others). Therefore it is necessary to study the mechanisms of biofilm forming by this filamentous fungus, understand the molecular mechanisms of biofilm resistance and propose new substances for treating these infections.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, biofilm, aspergilloma, *Aspergillus* bronchitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, infection of implants

STILBENY – FYTOALEXINY SE ŠIROKÝM POTENCIÁLEM

Martina Paldrychová

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

Úvod

Vznikající zvýšená rezistence mikroorganismů k antibiotikům vede moderní medicínu stále více k vývoji nových přípravků, které dokážou potlačit mikrobiální infekce¹. Většina fenolových látek izolovaných z rostlin dokáže potlačit tvorbu biofilmu mikroorganismů. Dále jsou fenolové látky schopné neutralizovat bakteriál-

ní toxiny a působit synergicky společně s antibiotiky. Polyfenoly potencují účinek antibiotika, snižují jeho dávku a redukují nežádoucí účinky². Bylo prokázáno, že fenolové deriváty – stilbeny patří rovněž mezi látky s antimikrobiální aktivitou, např. resveratrol zastavuje buněčné dělení gram-pozitivních bakterií *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*¹.

Fenolové látky

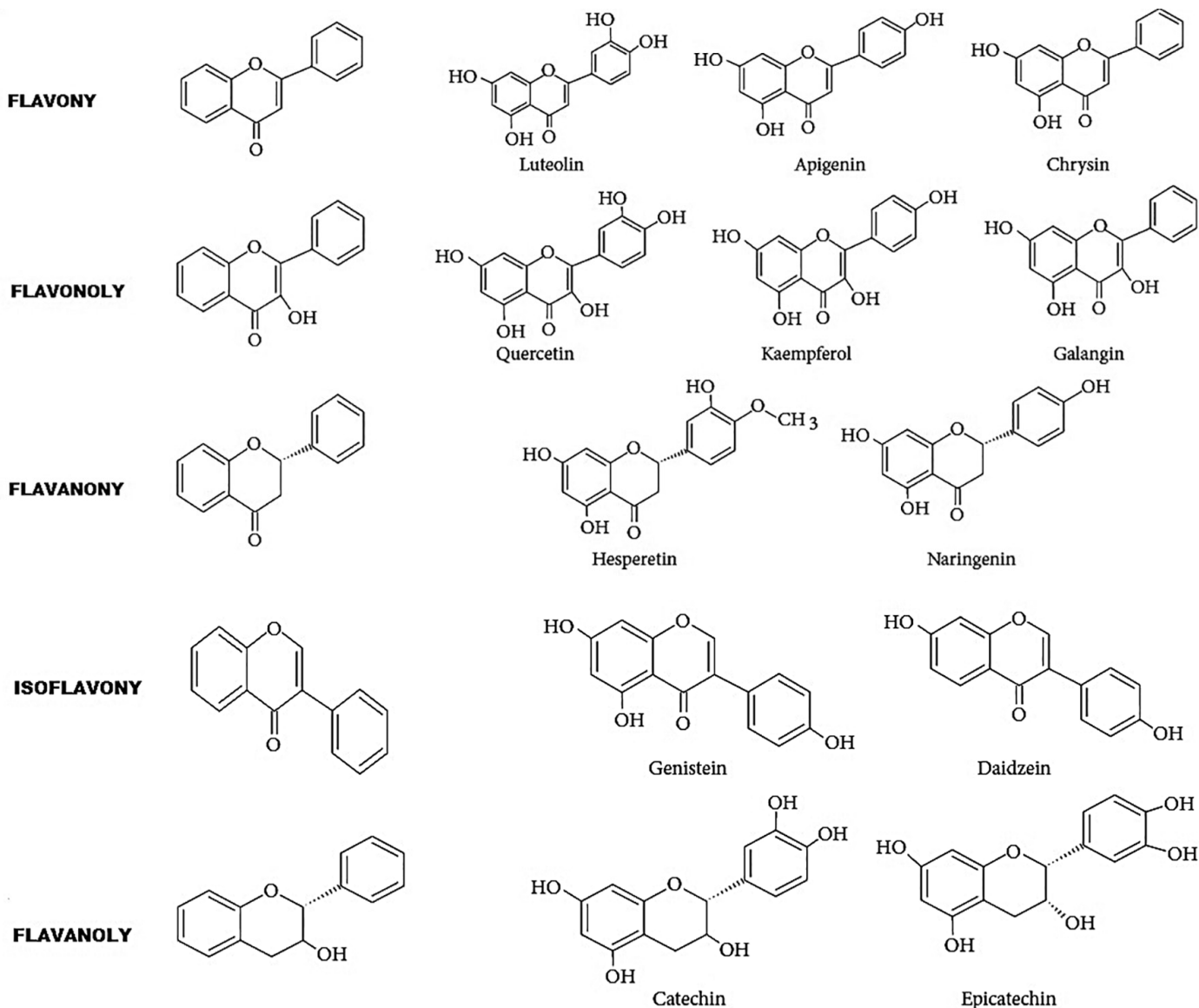
S ohledem na chemickou strukturu dělíme fenolové látky na flavonoidní a neflavonoidní. První z nich – flavonoidy můžeme dále dělit na flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly a isoflavony (Obr. 1). K těmto podskupinám řadíme i tanniny, které vznikají polymerizací flavanolů. Do druhé skupiny neflavonoidních sloučenin patří především fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové), stilbeny, a někdy také lignany, které vznikají oxidativní dimerizací dvou jednotek fenypropanu².

Stilbeny

Stilbeny jsou malou skupinou fenypropanoidů, obsahujících charakteristický 1,2-difenylenový skelet. Biosyntéza těchto látek vychází z fenyalaninu (Obr. 2). Všechny vyšší rostliny jsou schopné syntetizovat

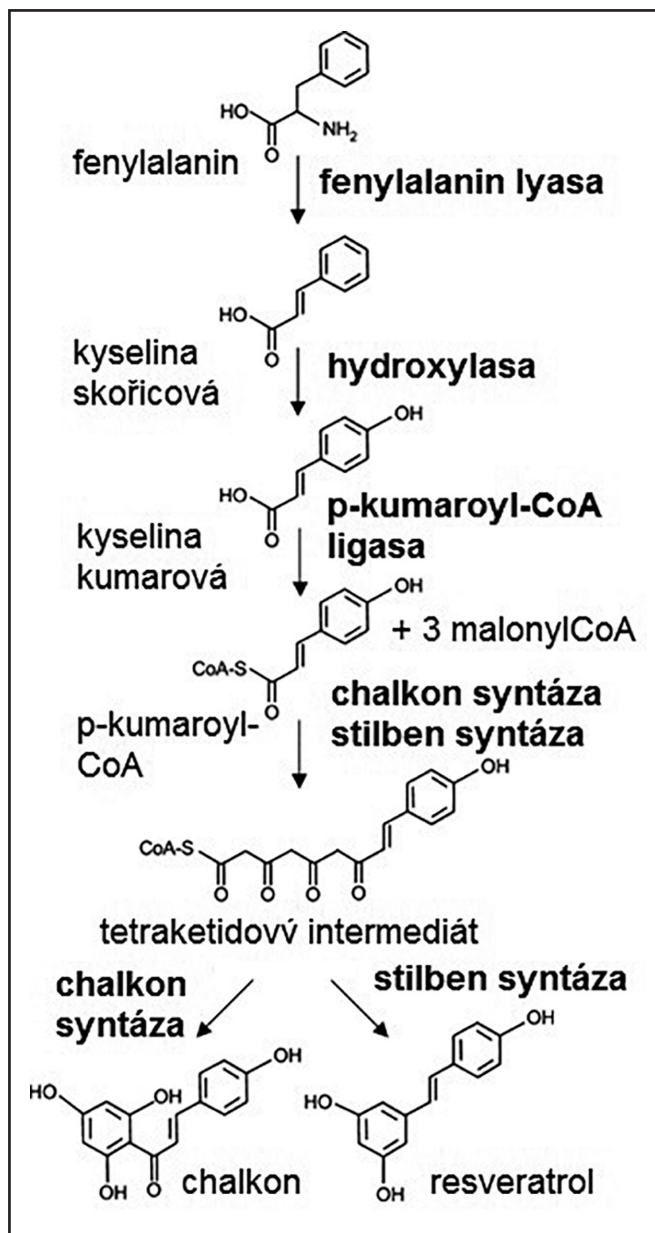
malonyl-CoA a estery derivátů kyseliny skořicové, ale jen omezené množství rostlin je schopno produkovat stilbeny. Klíčovým enzymem v biosyntéze stilbenů je stilben syntáza, která katalyzuje biosyntézu stilbenové kostry ze tří molekul malonyl-CoA a jedné molekuly derivátu esteru kyseliny skořicové (nejčastěji se jedná o CoA-estery kyseliny skořicové nebo kumarové)⁵.

Většina rostlinných stilbenů jsou deriváty *trans*-resveratrolu, přičemž nejběžnější modifikací po biosyntéze je glykosylace. Stilbeny byly izolovány z mnoha čeledí rostlin, např. z vína (Vitaceae), borovice (Pinaceae), arašídů (Fabaceae), brusinek (Vaccinium) a reveně (Rheum). Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny látek patří resveratrol, pterostilben a pinosylvin⁵. Ve fyziologii těchto rostlin hrají stilbeny zásadní roli. Někdy se můžeme setkat také s označením fytoalexiny – podílejí se na obraně proti rostlinným patogenům, býložravcům a slouží také jako odpověď na abiotický stres (např. déšť, ultrafialové záření)².



Obr. 1: Porovnání několika různých flavonoidních struktur³.

Míru antimikrobiálních účinků fenolových látek určuje především množství hydroxylových skupin a také počet a poloha dvojných vazeb v příslušné molekule. Mikrobicidní či mikrobistatická aktivita látek izolovaných z rostlin závisí také na způsobu extrakce, typu mikroorganismu, velikosti inokula a kultivačním médiu⁴.



Obr. 2: Schéma biosyntézy stilbenů².

Resveratrol

Resveratrol, neboli 3,4,5-trihydroxystilben je látka vyskytující se u rostlin ve formě dvou geometrických izomerů E (*trans*) a Z (*cis*), přičemž převažuje *trans* izomer⁷. Poprvé byl izolován v roce 1940 z kořene čemeřice velkokvětě (*Veratrum grandiflorum*)⁶. Současný zájem o sledování přítomnosti resveratrolu v rostlinách a o jeho účinnosti byl vyvolán především tzv. „francouzským paradoxem“. Bylo zjištěno, že v některých částech Francie je úmrtnost způsobená onemocněním koronárních tepen nižší i přes relativně vysoký podíl tuků ve stravě a konzumace vína je jedním z faktorů, které tuto nízkou úmrtnost vysvětlují⁷. Do středu pozornosti ho dále vynesly jeho chemopreventivní, antioxidační a také protizánětlivé vlastnosti⁶. Chemopreventivní aktivita resveratrolu spočívá v ovlivnění všech úrovní karcinogeneze. Dochází k interferenci se signálními drahami zodpovědnými za růst buněk a jejich dělení, apoptózu, zánět, angiogenezi a metastázu⁸. Antioxidační aktivita resveratrolu spočívá v aktivaci proteinu Nrf2, který zodpovídá za tvorbu antioxidačních enzymů (superoxiddis-

mutasy, katalasy a glutathionperoxidasy), čímž pomáhá odstraňovat z buněk reaktivní kyslíkové částice (ROS)⁹.

V lidském organismu se resveratrol absorbuje velice rychle, nejvyšší koncentrace látky v plasmě je dosaženo do 60 minut po konzumaci, přičemž další maximum se objevuje do 6 hodin, což svědčí o reabsorpci metabolitů resveratrolu po střevní hydrolyze¹⁰. Díky intenzivnímu metabolismu dochází k limitaci orgánů více vzdálených od místa absorpce a u těchto orgánů je tedy snížena chemopreventivní aktivita tohoto stilbenů. Je otázkou zda metabolity resveratrolu vykazují podobné účinky jako volný resveratrol¹¹.

Antimikrobiální aktivita resveratrolu

Látky získané z Révy amurské (*Vitis amurensis*) jako jsou piceatannol, *trans*-resveratrol a *trans*- ϵ -viniferin byly studovány jako antimikrobiální látky účinné proti *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sanguis*, což jsou bakterie ústní mikroflóry zodpovědné za tvorbu plaku, zubního kazu a podílejí se také na vzniku paradentózy. Bylo zjištěno, že výše uvedené látky a jejich deriváty pozitivně ovlivňují mikroflóru ústní dutiny a mohly by v budoucnu sloužit jako alternativa k běžně užívaným přípravkům v zubním lékařství. Zvláště *trans*-resveratrol pak prokázal značnou aktivitu proti *S. sanguis*. Po aplikaci koncentrace 25 mg/l dochází k efektivní inhibici glukosyltransferasy B a C. Tyto glukosyltransferasy katalyzují syntézu nerozpustných glukánů ze sacharózy. Jedná se o hlavní faktor virulence při tvorbě zubního kazu¹².

Gram-negativní bakterie *Helicobacter pylori* způsobuje gastritidu, vředy a poruchy trávení. Produkuje enzym ureasu, která katalyzuje přeměnu močoviny na amoniak, tím vytváří v žaludku lokální alkalické prostředí, které zde těmito bakteriím umožňuje přežití. Nízký výskyt této bakterie je spojován s konzumací zeleniny, vína a zeleného čaje. Resveratrol je prokázaným inhibitorem ureasy, jestliže je aplikován v koncentraci, která odpovídá minimální inhibiční koncentraci (MIC), snižuje její aktivitu o 90 %¹¹.

Sledováním vlivu resveratrolu na biofilm gram-pozitivní bakterie *Propionibacterium acnes*, která způsobuje akné, bylo zjištěno, že rozvoj tohoto bakteriálního biofilmu může být tlumen rostlinnými extrakty z *Epimedium brevicornum* a *Polygonum cuspidatum*, které obsahují antibiofilmově aktivní látky icarin, resveratrol a salidroside¹³.

Resveratrol je také prokázaným inhibitorem tvorby biofilmu u bakterie *Vibrio cholerae*. Ovlivňuje spíše faktory virulence než životaschopnost bakterie, proto se předpokládá i nižší rozvoj rezistence. V této souvislosti se jeví jako nová potenciální látka při léčbě cholery. Do budoucna je zapotřebí detailněji popsat molekulární mechanismus tohoto působení, který není doposud zcela znám¹⁴.

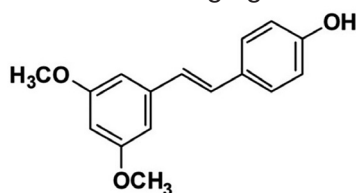
Pterostilben

Z chemického hlediska je pterostilben dimethylovaný resveratrol (Obr. 3). Při inhibici růstu hub *in vitro* má pětikrát vyšší aktivitu než resveratrol. Toxicita stilbenů nebyla doposud uspokojivě vysvětlena. Pravděpodobně

souvisí s jejich schopností pronikat a narušovat lipofilní membrány, přičemž pterostilben, který je méně hydrofilní než resveratrol, proniká těmito membránami lépe⁵. Ačkoli mají resveratrol a pterostilben podobné farmakologické vlastnosti, pterostilben má díky své struktuře řadu výhod. Při orálním podání vykazuje 95 % biologickou dostupnost, zatímco resveratrol pouze 20 %. Jeho poločas rozpadu je sedmkrát delší (105 minut oproti 14 minutám), a tím se prodlužuje doba jeho antioxidačního působení¹⁵.

Stejně tak jako resveratrol i pterostilben ovlivňuje signální dráhy a indukuje apoptózu rakovinných buněk¹⁶.

Dále reguluje glykolýzu, glukoneogenezi a vylučování insulinu z β -buněk pankreatu. U potkanů způsobuje dávka 40 mg/kg obdobný pokles koncentrace glukosy v plasmě jako když je aplikován antihyperglykemický lék metformin v dávce 500 mg/kg¹⁷.



Obr. 3: Chemická struktura pterostilbenu¹⁸.

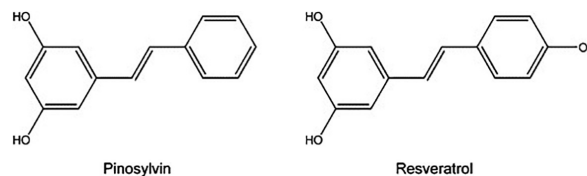
Pterostilben má i hypolipidemické účinky a zpomaluje tak vznik aterosklerózy (poškození tepen, které vzniká v důsledku ukládání lipidů do jejich stěn), působí totiž jako agonista PPAR α receptoru a stimuluje jeho činnost obdobným způsobem jako např. fibráty. Aktivací těchto receptorů dochází k urychlení degradace VLDL a zároveň k poklesu syntézy mastných kyselin¹⁹.

Antimikrobiální aktivita pterostilbenu

Pterostilben může inhibovat tvorbu biofilmu *Candida albicans* a dokonce i narušovat zralý biofilm. Snižuje hydrofobitu buněčného povrchu (jeden z nejvýznamnějších faktorů, které ovlivňují adhezi) a potlačuje tvorbu hyf. Expozice *C. albicans* pterostilbenem vede ke změně exprese genů, které hrají roli při morfologické transformaci, biosyntéze ergosterolu a činnosti oxidoreduktáz. Schopnost pterostilbenu narušovat tvorbu biofilmu souvisí s Ras/cAMP cestou, která reguluje metabolismus, odolnost vůči stresu a průběh buněčného cyklu, ale i filamentaci. Účinek pterostilbenu je snižován předávkem exogenního cAMP¹⁸.

Pinosylvin

Pinosylvin (3,5-dihydroxy-*trans*-stilben) (Obr. 4) je obsažen především v jehličí borovice *Pinus densiflora*



Obr. 4: Chemická struktura resveratrolu a pinosylvinu²¹.

a ve dřevě borovice *Pinus sylvestris*, přičemž obsah této látky se výrazně zvyšuje působením UV záření. Poměrně nedávno byly prokázány protizánětlivé a také anti-proliferační účinky této látky v různých nádorových buňkách²⁰.

Antimikrobiální aktivita pinosylvinu

Pinosylvin má také vysokou antimikrobiální aktivitu a je řazen i mezi antimykotika. Proti *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* (Tab. 1) prokázal vyšší aktivitu než resveratrol²². Vzhledem k těmto vlastnostem se pinosylvin jeví jako slibná látka při použití k ochraně dřeva před některými plísněmi²³.

Tab. 1: Antimikrobiální aktivita resveratrolu a pinosylvinu²²

mikroorganismus	MIC (mg/l)	
	resveratrol	pinosylvin
<i>S. aureus</i>	250	250
<i>E. coli</i>	250	250
<i>C. albicans</i>	250	62,5
<i>S. cerevisiae</i>	250	125

Závěr

Stilbeny mají velký potenciál v léčbě civilizačních chorob, ať už samostatně nebo ve formě doplňků klasických chemoterapeutik. Stále však neproběhlo dostatečné množství klinických studií *in vivo* na to, aby mohla být vyráběna léčiva s obsahem stilbenů. Stejně tak nebyly doposud uspokojivě popsány mechanismy účinků těchto látek na mikroorganismy. Na trhu jsou v současné době pouze potravinové doplňky s vysokým obsahem resveratrolu a dalších fenolových látek, které se získávají extrakcí z hroznů vinné révy (*Vitis vinifera*) a dále prepráty obsahující výtazek z kořene křídlatky japonské (*Polygonum cuspidatum*). Tyto potravinové doplňky jsou indikovány především k podpoře správné funkce oběhového systému.

Poděkování: Financováno z GAČR grantu 14-23597S.

Literatura

- Paulo L, Oleastro M, Gallardo E, et. al.: *Food Res. Int.* 44, 964 (2011).
- Daglia M: *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174 (2012).
- Kumar S, Pandey AK: *Sci. World J.* 2013,162750 (2013).
- Gyawali R, Ibrahim SA: *Food Control.* 46, 412 (2014).
- Chong J, Poutaraud A, Hugueney P: *Plant Sci.* 177, 143 (2009).
- Namasivayam N: *Ann. NY Acad. Sci.* 1215, 60 (2011).
- Filip V, Plocková M, Šmidrkal J, et. al.: *Food Chem.* 83, 585 (2003).
- Shukla Y, Singh R: *Ann. NY Acad. Sci.* 1215, 1 (2011).
- Liu Y, Chan F, Sun H, et. al.: *Eur. J. Pharmacol.* 650, 130 (2011).
- Walle T: *Ann. NY Acad. Sci.* 1215, 9 (2011).
- Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, et. al.: *Canc. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 1246 (2007).

Literatura (pokračování)

12. Yim N, Ha DT, Trung TN, et. al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 1165 (2010).
13. Coenye T, Brackman G, Rigole P, et. al.: *Phytomed.* 19, 409 (2012).
14. Augustine N, Goel AK, Sivakumar KC, et. al.: *Phyto-med.* 21, 286 (2014).
15. McCormack D, McFadden D: *J. Surg. Res.* 173, 53 (2012).
16. Manhal PW, McDonald D, McFadden DW: *J. Am. Col. Surgeons* 211, 56 (2010).
17. Pari L, Satheesh MA: *Life Sci.* 79, 641 (2006).
18. Li DD, Zhao LX, Mylonakis E, et. al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2344 (2014).
19. Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, et. al.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 3403 (2005).
20. Park EJ, Chung HJ, Park HJ, et. al.: *Food Chem. Toxicol.* 55, 424 (2013).
21. Yeo SChM, Luo W, Wu J, et. al.: *J. Chrom. B* 15, 68 (2013).
22. Lee SK, Lee HJ, Min HY: *Fitoterapia* 76, 258 (2005).
23. Roupe K, Halls S, Davies NM: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 148 (2005).

Souhrn

Paldrychová M.: Stilbeny – fytoalexiny se širokým potenciálem

Stilbeny patří do malé skupiny sekundárních metabolitů syntetizovaných fenyl-propanoidovou cestou. Vyskytují se u několika druhů rostlin a hrají důležitou roli při reakci rostlin na biotický a abiotický stres. Mnoho stilbenů jsou antimikrobiální sloučeniny, které jsou syntetizovány z důvodu obrany rostlin proti mikrobiálním patogenům a býložravcům, a jsou klasifikovány jako fytoalexiny. Do této skupiny látek patří např. resveratrol, pterostilben a pinosylvin. Vzhledem k tomu, že rezistence mikroorganismů k antibiotikům se stává celosvětovým problémem, moderní medicína se stále snaží o vývoj nových léků, modifikaci stávajících struktur nebo zvýšení biologické aktivity antibiotik přidáním různých antimikrobiálních látek. Stilbeny mohou být potenciálními látkami při léčbě mikrobiálních infekcí a mají také široký potenciál v léčbě jiných civilizačních chorob.

Klíčová slova: stilbeny, fytoalexiny, resveratrol, pterostilben, pinosylvin

Summary

Paldrychová M.: Stilbenes – phytoalexins with wide potential

Stilbenes are a small family of plant secondary metabolites derived from the phenylpropanoid pathway. They are produced in a several plant species and play an important role in plant responses to various biotic and abiotic stresses. Many stilbenes are antimicrobial compounds synthesized in response to microbial pathogen or herbivore attack and they are classified as phytoalexins. Resveratrol, pterostilbene and pinosylvine belong to this group of substances. Since the antibiotic resistance has become a worldwide problem, the modern medicine is still trying to develop new drugs, to modify existing structures or to increase the biological activity of antibiotics by adding various antimicrobial agents. Stilbenes might be potential agents in the treatment of microbial infections and they also have a wide potential in other civilizational diseases treatment.

Keywords: stilbenes, phytoalexins, resveratrol, pterostilbene, pinosylvine

VYUŽITÍ FOTODYNAMICKÉ TERAPIE V LÉČBĚ KARCINOMU PROSTATY

Vladimíra Pavlíčková, Silvie Rimpelová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; vladimira.pavlickova@vscht.cz

Úvod

Fotodynamická terapie (PDT) je alternativní metodou klasických postupů léčby (chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie) různých typů zhoubných i nezhoubných nádorů. Hlavními výhodami PDT jsou oproti současné léčbě karcinomů minimální nežádoucí účinky, nízká invazivita a bolestivost ve srovnání s operativním zákrokem. Mezi další výhody patří nízká toxicita, ambulantní ošetření a přesné cílení na nádorovou tkáň bez poškození okolní zdravé tkáně. PDT má však i svá omezení. Zásadním problémem je nízký průnik světla do tkáně, díky čemuž byla PDT dlouho využívána pouze pro léčbu povrchově lokalizovaných nádorů. S rozvojem laserů, světelných diod (LED) a optických vláken se však daří tento problém překonat. Tato práce má za cíl seznámit s jedním z nejčastějších typů rakoviny u mužů – karcinomem prostaty, jejím současným způsobem léčby a také s možností léčby pomocí PDT, jejími principy a látkami které se pro léčbu PDT využívají.

Karcinom prostaty

Rakovina prostaty představuje nejčastější typ rakoviny diagnostikovaný u mužů a je druhou nejčastější

onkologickou příčinou úmrtí mužské části populace v západní společnosti¹. V ČR je karcinom prostaty (KP) třetím nejčastějším typem nedermatologických nádorů (po karcinomu plic a tlustého střeva). Nárůst incidence KP je u nás pozorován od počátku 90. let^{2,3}. Vyšší výskyt KP je vysvětlován stárnutím populace, ale také vývojem citlivějších a dostupnějších diagnostických metod, díky kterým je odhaleno více případů rakoviny.

Příčina vzniku KP není stejně jako u dalších typů karcinomů přesně známa. Podíl na jejím vzniku může mít životní styl, stravovací návyky, vnější prostředí, ale i genetické predispozice. Svou roli hraje také věk (více jak polovina všech KP je diagnostikována u mužů starších 65ti let) a etnický původ (nejvíce jsou KP postiženi Afroameričané, nejméně Asiaté)⁴. Rozvoj KP je v poslední době dáván do souvislosti také s nadměrnou produkcí a mutacemi androgenních receptorů (AR)⁵. Androgenní receptory spadají do skupiny steroidních jaderných receptorů a mají nezastupitelnou roli v celé řadě fyziologických procesů⁶. AR zprostředkovávají v organismu účinky mužských pohlavních hormonů nezbytných pro správný vývoj mužských pohlavních orgánů, sekundárních pohlavních znaků a zajištění sper-

matogeneze. Působením endogenně produkováných steroidních hormonů na buňky obsahující AR dochází k nárůstu aktivity cyklin dependentních kinas, stimulaci buněčného cyklu a ke zvýšené proliferaci buněk. Tento běžný fyziologický proces se stává problémem v případě buněk nadměrně produkujících AR, u nichž dochází k rychlému množení a tím k rozvoji nádoru. Porušena je také rovnováha mezi buňkami nově vznikajícími, kterých je několiknásobně více, a buňkami zanikajícími⁷. Nejvíce AR se nachází v buňkách epiteliální tkáně prostaty, kde mají svůj počátek téměř všechny případy karcinomu prostaty. Vlivem androgenů dochází v prostatě rovněž ke zvýšené produkci růstových faktorů, které dále stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci⁸.

Současná léčba karcinomu prostaty

Karcinom prostaty je velmi heterogenní onemocnění vyskytující se v různých stupních vývoje od latentního až po agresivní nádory. Z tohoto důvodu se i metody léčby odlišují a přizpůsobují individuálním potřebám pacientů. Zásadní význam v léčbě má včasná diagnóza.

Samotná léčba obvykle zahrnuje sledování progresu nádoru nebo tzv. aktivní vyčkávání, které se využívá zejména u rizikových skupin pacientů (muži starší 70 let) s pomalu se rozvíjejícími nádory (růst nádoru více jak 10 let). Aktivní léčba může být kurativní nebo paliativní. Při kurativní léčbě dochází k chirurgickému odstranění či zničení lokalizovaného nádoru. Tato léčba zahrnuje radikální prostatektomii (chirurgická kastrace) v kombinaci se zevní radioterapií nebo hormonální léčbou. Paliativní léčba využívá tzv. antiandrogeny (steroidní či nesteroidní) blokující funkci androgenních receptorů, tato léčba má ale jen dočasný efekt (po dobu podávání léku). Administrace antiandrogenů se kombinuje s hormonální léčbou, chemoterapií anebo cíleným ozařováním prostaty. Prostatektomie a radioterapie řeší výskyt nádorů pouze v případě nemetastazujících karcinomů. Léčba pokročilého stadia karcinomu je náročnější z důvodu častého výskytu metastáz postihujících měkkou, ale i kostní tkáň. U pacientů s metastazujícím karcinomem prostaty, kteří jsou léčeni pomocí androgenní deprivace (snížení hladiny hormonů formou chirurgické či chemické kastrace), dochází k častému rozvoji rezistentních karcinomů, které neodpovídají na léčbu antiandrogeny. Progrese takového karcinomu s sebou nese velké riziko mortality. Léčba se proto zaměřuje především na omezení bolesti a prodloužení doby přežití^{9,10,11}.

Současný přístup k léčbě KP s sebou přináší celou řadu mnohdy trvalých nežádoucích účinků, jako je erektilní dysfunkce či inkontinence. Z tohoto důvodu jsou testovány nové metody léčby, které jsou neinvazivní, nebolestivé a s minimem nežádoucích účinků. Mezi tyto metody patří právě fotodynamická terapie.

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie je v mnohých zemích (USA, Kanada, Japonsko, některé státy Evropy) klinicky schválená léčebná metoda hojně využívaná pro léčbu kožních melanomů, zánětlivého akné, lupénky, nemaligních kožních projevů a dalších typů nádorů (plic, jícnu)¹². V ČR je PDT využívána např. v očním lékařství pro léčbu makulární degenerace a myopie, při léč-

bě karcinomu plic, jícnu a keratózách¹³. Využití PDT je stále častěji asociováno také s léčbou pevných nádorů vnitřních orgánů (prostaty, prsu, močového měchýře, apod.)¹⁴. V současnosti se PDT obvykle používá jako paliativní či doplňková léčba k jiným typům terapie nádorů (chirurgický zákrok, chemoterapie).

Princip PDT je založen na selektivní akumulaci fotosenzibilní látky v nádoru a jeho následném ozařování světelnou energií vhodné vlnové délky. Po ozařování absorbuje molekula PS ve svém základním stavu kvantum světelné energie, tím dojde k přechodu PS do vyššího excitačního stavu. Mezisystémovými přechody se pak PS může dostat do tripletového stavu. Reakcí PS v tripletovém stavu s molekulárním kyslíkem dochází k přenosu energie a vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Díky nim pak dochází k destrukci (nekróza, apoptóza, nekroptóza) cílové tkáně. Mezi ROS patří radikály i neradikálové částice. Radikály mají ve svých elektronových orbitalech jeden nebo více nepárových elektronů, patří mezi ně např. hydroxylový ($\cdot\text{OH}$), superoxidový ($\text{O}_2\cdot^-$) nebo hydroperoxylový radikál ($\cdot\text{OOH}$). Vysoká reaktivita radikálů a jejich omezená doba existence je způsobena deficitem elektronů a snahou částice získat další elektron pro doplnění páru. Přeměnami volných radikálů může vznikat druhý typ ROS: singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HClO) a ozon (O_3) které, ač nemají radikálový charakter, jsou velmi reaktivní. Bylo zjištěno, že je to právě singletový kyslík, který má velký podíl při léčbě nádorových onemocnění pomocí PDT^{14,15}.

Vlivem PDT dochází také k poškození cév zásobujících nádor kyslíkem, vyvolání zánětlivé reakce a imunitní odpovědi organismu¹⁶.

Fotosenzibilní látky uplatňující se v PDT

Mezi látky uplatňující se jako fotosenzitizéry patří celá řada barviv, aromatických a heterocyklických organických sloučenin a komplexů¹⁷. První generace PS pro využití v léčbě nádorů byla zkoumána v 60. letech minulého století, kdy byla pozorována fluorescence lézí po aplikaci hematoporfyrinu (HPD). Pro vyšší akumulaci v nádorové tkáni byl následně HPD modifikován a byly vytvořeny jeho deriváty jako např. Photofrin I. Důsledkem modifikace vznikla směs monomerních, dimerních a oligomerních porfyrinů v různém poměru. Oligomerní frakce tvořící základ Photofrinu I je zodpovědná za jeho zvýšenou akumulaci v nádorové tkáni a možnosti jeho využití při fotodynamické diagnostice nádorů. Od roku 1993 je v Kanadě, USA, Japonsku a dalších zemích schválen HPD známý pod komerčním názvem Photofrin II, který slouží pro léčbu nádorů močového měchýře, jícnu a plic¹⁴. Neznalost přesného chemického složení a tedy i konkrétní účinné složky je problémem většiny PS první generace. Dalšími problémy spojenými s užíváním PS první generace je systémová toxicita a dlouho trvající kožní fotosenzitivita po ozařování viditelným světlem (380 – 720 nm), která může přetrvávat i několik týdnů¹⁷. V roce 1962 syntetizoval Winkelman meso-tetra-(4-sulfofenyl)-porfyrin (TPPS₄), který byl na rozdíl od doposud známých HPD chemicky přesně definovanou sloučeninou. Účinnost TPPS₄ byla testována na potkaních s Walkerovým sarkomem. K širšímu využití TPPS₄ však nedošlo kvůli podezření z neuro-

toxických účinků při vyšších dávkách (parenterální podání)¹⁸. V ČR byl posléze vyvinut modifikovaný způsob přípravy TPPS₄, zahrnující závěrečné přečištění preparátu chromatografií na Sephadexu, díky čemuž byla jeho neurotoxicita minimalizována a TPPS₄ byl dále testován pro využití v dermatologii a léčbě karcinomu močového měchýře, do praxe však zaveden nebyl^{19,20}.

Druhou generací PS jsou látky vyznačující se vysokou chemickou čistotou, selektivitou a absorpčními maximy ve vyšších vlnových délkách, které jsou vhodné pro hlubší průnik do tkání (2 – 3 cm). Výhodou je také nízká kožní fotosenzitivita a rychlejší odbourávání z organismu. Mezi PS druhé generace patří modifikované porfyriny vycházející z HPD a jeho derivátů s různě upravenými postranními řetězci. Patří sem např. kyselina 5-aminolevulová (ALA), která nemá sama o sobě terapeutický účinek, slouží však jako prekurzor protoporphyrinu IX (PpIX), který je fotosenzibilní (absorpční maximum při 635 nm)¹⁴. Jak ALA tak PpIX se v těle přirozeně vyskytují jako meziprodukty biosyntézy hemu. Terapeutické zvýšení koncentrace ALA v těle vede ke zvýšení hladiny PpIX a jeho hromadění v nádoru. Po ozáření světlem příslušné vlnové délky pak způsobuje nekrózu buněk. Endogenní PpIX se vyznačuje vysokou citlivostí na světlo, které způsobuje jeho degradaci, díky tomu je zkrácena doba fotosenzitivity kůže na 1 – 2 dny. Výhodou ALA je možnost zevního topického podání, díky kterému je využíván zejména v dermatologii pro léčbu nádorových i nenádorových onemocnění. Nízká lipofilita ALA byla vyřešena syntézou jejích esterů, které lépe pronikají do tkání. Mezi druhou generaci PS můžeme zařadit také degradační produkty chlorofylu, jako jsou např. chloriny nebo feoforbidy a pyrofeoforbidy^{17,21}.

Vývoj poslední - třetí generace PS je zaměřen na selektivní cílení PS do nádorové tkáně s minimální aku-

mulací PS v tkáních zdravých. Toho se snaží dosáhnout prostřednictvím konjugátů s molekulou přenašeče²². Přenašečem mohou být např. protilátky, aptamery, oligonukleotidy, peptidy, lipoproteiny, steroidy či nanočástice. Cílení pomocí těchto molekul je zajištěno díky zvýšenému metabolismu a rychlé proliferaci nádorových buněk, přítomnosti specifických povrchových antigenů a zvýšené expresi buněčných receptorů, čímž se odlišují od zdravých buněk²³.

Pro léčbu počátečních stadií karcinomu prostaty bylo testováno několik fotosenzitizerů. Pacienti, u nichž byl použit fotosenzitizer Foscan® (mezo-tetra hydroxyfennyl chlorin, mTHPC), vykazovali po 8 - 10 ošetřeních pokles hodnot PSA o 67 %²⁴. Ve třetí fázi klinického hodnocení je v současnosti fotosenzitizer TOOKAD® Soluble (WST11, Steba Biotech)²⁵. Toto léčivo je ve vodě rozpustný derivát Pd-bakteriofeoforbidu, využívaný pro PDT, zaměřující se na obstrukci cév zásobících nádor krví a živinami (z angl.: „vascular-targeted photodynamic therapy“)^{26, 27}. Ve fotodynamické diagnostice karcinomu prostaty byla testována také kyselina 5-aminolevulová, v praxi se však doposud nepoužívá²⁸.

Závěr

Fotodynamická terapie je jednou z perspektivních metod léčby nádorů. Úspěšnost PDT závisí především na vývoji účinných fotosenzitizerů. Ten „ideální“ by měl splňovat kritéria jako je selektivní cílení a zádrž v nádorové tkáni, rychlé odbourávání ze zdravé tkáně a minimální systémová toxicita. Důležité je také absorpční maximum v dlouhých vlnových délkách, které zaručuje hlubší průnik do tkání, vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku a fotostabilita PS vůči přímé fotodegradaci. Na vývoji PS pro využití ve fotodynamické terapii v současnosti pracuje řada vědeckých skupin. Brzy se tedy snad dočkáme fotosenzitizerů vhodných i pro využití v PDT karcinomu prostaty.

Literatura

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.: *CA Canc. J. Clin.* 59(4), 225 (2009).
2. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al.: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2015-08-09]. Dostupné z <http://www.svod.cz>.
3. <http://www.linkos.cz>, staženo 3. května 2015.
4. Bashir NM: *Asian Pac. J. Canc. Prev.* 16(13), 5137 (2015).
5. Henlein CA, Chang C: *Endocr Rev.* 25(2), 276 (2004).
6. Mangeisdorf DJ, Thummel C, Beati M, et al.: *Cell* 83(6), 835 (1995).
7. Tan MHE, Li J, Xu HE, et al.: *Acta Pharmacol. Sinica* 36, 3 (2015).
8. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ: *J. Nat. Canc. Inst.* 93(22), 1687 (2001).
9. Kolombo I: *Urolog. pro Praxi* 3, 110 (2005).
10. Matoušková M, Hanuš M: *Urolog pro Praxi* 9(1), 24 (2008).
11. Soumarová R, Perková H, Blažek T, et al.: *Urolog pro Praxi* 13(5), 192 (2012).
12. Huang Z: *Technol. Canc. Res. Treat.* 4(3), 283 (2005).
13. <http://www.sukl.cz>, staženo 23. dubna 2015.
14. Triesscheijna M, Baas P, Schellens JHM, et al.: *Oncologist.* 11(9), 1034 (2006).
15. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM: *Chem Listy* 99, 211 (2005).
16. Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, et al.: *Canc. Res.* 64(6), 2120 (2004).
17. DeRosa MC, Crutchley RJ: *Coordin. Chem. Rev.* 233, 351 (2002).
18. Winkelman JW: *Canc. Res.* 22, 589 (1962).
19. Babjuk M, Stepp H, Jirsa M, et al.: *Ces. Urol.* 4, 11 (2000).
20. Lapeš M, Petera J, Jirsa M: *J. Photochem. Photobiol.* 36(2), 205 (1996).
21. Fritsch C, Lang K, Neuse W, et al.: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11, 358 (1998).
22. Josefsen LB, Boyle RW: *Br. J. Pharmacol.* 154(1), 1 (2008).
23. Lamberti MJ, Vittar NBR, Rivalola VA: *World J. Clin. Oncol.* 5(5), 901 (2014).
24. Moore CM, Nathan TR, Lees WR, et al.: *Lasers. Surg. Med.* 38(5), 356 (2006).
25. <https://clinicaltrials.gov>, staženo 12. října 2015.
26. Zheng H, Masoom AH, Susan K et al.: *Lasers. Surg. Med.* 38(7), 672 (2006).
27. Abdel-Rahmene A, Souhil L, Fawzi B, Christian S: *World J. Urol.* 33(7), 937 (2015).
28. Adam C, Salomon G, Walther S, et al.: *Eur. Urol.* 55(6), 1281 (2009).

Souhrn

Pavličková V., Rimpelová S.: Využití fotodynamické terapie v léčbě karcinomu prostaty

Zvyšující se incidence nádorových onemocnění činí velký problém posledních desetiletí. S nárůstem počtu těchto onemocnění je spojen i intenzivní vývoj nových účinnějších metod léčby, mezi které patří i fotodynamická terapie (PDT). PDT je založena na aplikaci fotosenzibilních látek, tzv. fotosenzitizérů (PS), které po aktivaci světlem v přítomnosti molekulárního kyslíku zapříčiňují destrukci nádoru a smrt nádorových buněk. Díky selektivní lokalizaci PS v nádoru je zabráněno poškození okolní zdravé tkáně. PDT je tak vhodnou alternativou ke klasickým metodám léčby karcinomu a díky vývoji nových PS se její využití stále rozšiřuje do rutinní lékařské praxe.

Klíčová slova: karcinom prostaty, fotodynamická terapie, fotosenzitizér

Summary

Pavličková V., Rimpelová S.: Photodynamic therapy in the treatment of prostate cancer

Enhanced incidence of cancer has become a big problem in last decades. An increase in the number of cancer diseases is connected with intensive research of novel more efficient therapeutic methods which comprise also photodynamic therapy (PDT). PDT is based on application of photosensitive compounds, i.e. photosensitizers (PS), which, after light activation and the presence of molecular oxygen, cause tumor eradication and death of cancer cells. Damage of surrounding healthy tissue is prevented by selective localization of PS in the site of tumor. Therefore, PDT is a suitable alternative in addition to standardly used methods for cancer treatment; moreover, owing to unrelenting development of novel PS, their application has expanded into routine clinical praxis.

Keywords: prostate carcinoma, photodynamic therapy, photosensitizer

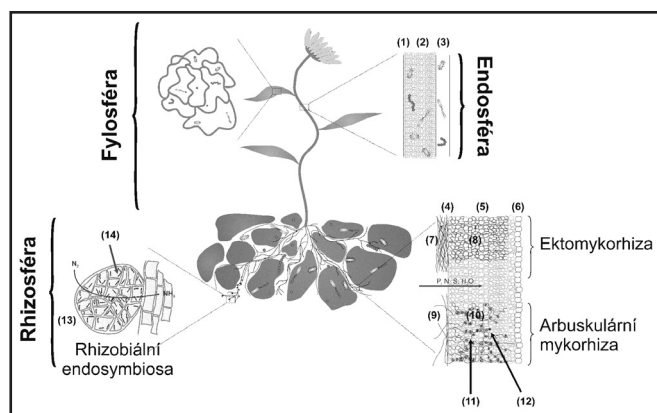
MIKROORGANISMY: ŠKŮDCI, ALE I PŘÁTELÉ ROSTLIN

Markéta Polívková

VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie; polivkom@vscht.cz

Úvod

Mikroorganismy asociované s rostlinami mohou mít značný význam pro stimulaci růstu a vývoje rostlin i v nepříznivých podmínkách. Pro pochopení vlivu mikrobů na rostliny je nezbytné porozumět vztahům a interakcím, ke kterým mezi nimi dochází. Dějištěm těchto interakcí je především rhizosféra (Obr. 1), tedy



Obr. 1: Znázornění modelové rostliny s asociovanými mikroorganismy a interakcí, ke kterým mezi nimi dochází.

(1) epidermis, (2) primární kůra stonku, (3) cévní svazek, (4) rhizodermis, (5) primární kůra kořene, (6) endodermis, (7) hyfový plášť, (8) Hartigova síť, (9) extramatrikální mycelium, (10) intercelulární a intracelulární hyfy, (11) vezikul, (12) arbuskul, (13) kořenový nodul, (14) bakteroid.

úzké pásmo zeminy, které je v přímém kontaktu s rostlinnými kořeny. Ty do svého okolí uvolňují velké množství chemicky rozmanitých exudátů vznikajících při fotosyntéze a dalších procesech probíhajících v rostlinném organismu. Rostlinné exudáty mohou stimulovat mikrobiální aktivitu ve svém nejbližším okolí, z toho důvodu je rhizosféra oblast s bohatým mikrobiálním osídlením i aktivitou. Indukovaná mikrobiální aktivita pak zpětně ovlivňuje vývoj kořenů a růst rostlin¹. Největší podíl mikroorganismů obývajících rhizosféru tvoří houby

a bakterie. Uvádí se, že množství hub a bakterií v rhizosféře je 2 – 20× vyšší než v okolní půdě².

Rhizosferní mikroorganismy mohou pronikat dovnitř rostlinného organismu a kolonizovat jeho vnitřní prostory. Do vnitřku rostlin mohou vstupovat i další mikroorganismy vyskytující se v okolním prostředí. Ty pak, na rozdíl od rhizosferních mikroorganismů, které pro vstup do rostlinných těl využívají kořeny, využívají pro průnik nadzemní části rostlin, jako jsou poraněné stonky, listy a květy. Mikroorganismy, které kolonizují vnitřní prostory rostlin (Obr. 1), se označují jako tzv. endofytní mikroorganismy. Po vstupu do těla hostitele se endofyty usídliují buď pouze v okolí místa penetrace, nebo se rozšíří do celé rostliny, kde mohou kolonizovat cévní svazky, extracelulární nebo intracelulární prostor³. Po kolonizaci vnitřních pletiv rostlin endofyty dochází k vytvoření různých vztahů od symbiotických, mutualistických až po interakce saprofytické povahy⁴. Některé endofytní mikroorganismy jsou existenčně striktně závislé na hostiteli, jedná se o tzv. obligátní endofyty. Druhou skupinu tvoří fakultativní endofyty, které jsou schopny přežívání a růstu i mimo rostlinný organismus⁵.

Rhizosferní a endofytní mikroorganismy se podílejí na celé řadě dějů, jimiž stimulují růst rostlin. Interakce mezi mikroorganismy a rostlinou mají význam především při růstu rostlin v půdách zatížených například nízkými hodnotami pH a vysokými koncentracemi solí. Rostliny vyrůstající v nepříznivých podmínkách mohou být také náchylnější k infekci patogenními mikroorganismy. V následujících kapitolách jsou popsány základní mechanismy, kterými mikroorganismy zvyšují toleranci rostlin k abiotickým a biotickým stresům a stimulují růst rostlin v nepříznivých podmínkách.

Bakterie stimulující růst rostlin

Bakterie stimulující růst rostlin jsou fylogeneticky heterogenní skupinou osídlující rhizosféru, případně povrch kořenů, a endosféru. Mohou napomáhat růstu rostlin různými přímými nebo nepřímými mechanismy.

V posledních desetiletích byl identifikován velký počet bakteriálních rodů, u kterých byl prokázán pozitivní vliv na růst rostlin. Spadají sem například zástupci z rodů *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, či *Arthrobacter* a *Bacillus*^{6, 7}. Přímý mechanismus stimulace růstu rostlin spočívá v poskytování látek syntetizovaných bakteriemi hostitelské rostlině. V případě nepřímé stimulace růstu rostlin bakterie snižují nebo odstraňují škodlivé účinky jednoho nebo více fytopatogenních mikroorganismů nebo chrání rostlinu před toxickými účinky těžkých kovů a organických polutantů.

Přímé mechanismy, kterými rhizosferní, ale i endofytní mikroorganismy ovlivňují růst rostlin, nejsou stále plně pochopeny, ale je známo, že zahrnují (i) schopnost produkovat nebo měnit koncentraci regulátorů růstu rostlin⁶, (ii) (a)symbiotickou fixaci dusíku⁸ a (iii) mobilizaci fosfátů a dalších živin⁹.

(i) Hlavním způsobem, kterým mikroorganismy mohou ovlivňovat růst rostlin, je produkce rostlinných hormonů, jako jsou auxiny, gibereliny, cytokininy a ethylen. Auxiny jsou důležitou skupinou fytohormonů, které podporují prodlužování a růst rostlinných buněk a ve velmi nízkých koncentracích napomáhají zakořeňování. Hlavním auxinem je kyselina indol-3-octová (IAA). Gibereliny a cytokininy stimulují dělení rostlinných buněk a celkově růst internodií a listů. Cytokininy se účastní také klíčení semen a vývoje prýtlů. Při vyšších koncentracích hormony z těchto skupin stimulují senescenci, tedy proces stárnutí rostlin¹⁰.

(ii) V posledních dvaceti letech bylo postupně objeveno stále více bakterií se schopností fixace dusíku (tzv. diazotrofní mikroorganismy). Prakticky všechny tyto bakterie jsou mikroaerofilní a dusík fixují pouze v podmínkách nízkého parciálního tlaku kyslíku. Dříve byl tento jev znám hlavně u hlízkovitých rhizobakterií. Další studie poukázaly také na rhizobakterie volně přítomné v kořenové zóně rostlin disponující touto schopností, např. *Klebsiella oxytoca*¹¹, *Enterobacter cloacae*¹¹ či *Alcaligenes* spp.¹². Endofytní bakterie se schopností fixace dusíku byly nalezeny v travinách, obilovinách, bramborách a manioku⁸.

(iii) Fosfor je esenciální živinou, která je vstřebávána rostlinami pouze ve formě fosfátových iontů HPO_4^{2-} a H_2PO_4^- . Do zemín bývá aplikován ve formě fosfátových hnojiv, nicméně velká část aplikovaného rozpustného fosfátu se rychle imobilizuje a stává se tak nedostupnou pro rostliny. Proto je biologická dostupnost fosforu závislá na složení zeminy a na biologických procesech odehrávajících se v půdě, především v rhizosféře¹³. Schopnost bakterií solubilizovat fosfor je považována za jednu z nejdůležitějších vlastností spojenou s výživou rostlin. Mechanismus solubilizace minerálních forem fosforu bakteriemi je spojován s uvolňováním nízkomolekulárních organických kyselin, které lokálně snižují pH zeminy, a tím zvyšují rozpustnost imobilizovaných forem fosfátu. Některé bakterie mohou navíc produkovat fosfatasy (např. fytasu), které hydrolyzují organické sloučeniny fosforu, např. inositolfosfát, fosfomonoestery nebo fosfodiestery včetně fosfolipidů a nukleových kyselin¹³.

Význam mikroorganismů při růstu rostliny v zatíženém životním prostředí

Zeminy zatížené nízkými hodnotami pH

Častým problémem omezujícím pěstování zemědělských plodin je pH zeminy, které je úměrné aktivitě iontů vodíku v půdním roztoku. Hlavní příčinou okyselování půdy představuje lidská činnost, především pak znečišťování ovzduší oxidy síry a dusíku, které má za následek kyselé deště. Kyselost půdy má vliv na přeměnu organické hmoty v zemině, na půdotvorné procesy, vitalitu rostlin a na diverzitu půdních organismů.

Optimální pH vhodné pro růst většiny zemědělských rostlin se pohybuje v rozmezí 5,5 – 7,0. Téměř 40 % obdělávané půdy po celém světě je však příliš kyselá, což vede k poklesu produkce biomasy pěstovaných zemědělských plodin i navzdory adekvátnímu zásobování minerálními živinami, jako jsou dusík, fosfor a draslík¹⁴. Hlavní příčinou omezení růstu při nižších hodnotách pH je přítomnost rozpuštěných sloučenin hliníku, v půdním roztoku se pak hliník vyskytuje ve formách Al^{3+} , AlOH^{2+} a $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. Sloučeniny hliníku působí toxicky na kořeny rostlin. Oproti tomu sloučeniny manganu mají toxický efekt až po jejich akumulaci v nadzemních částech rostlin¹⁵. Na růst rostlin v extrémním pH má vliv také snížení biologické dostupnosti fosforu, vápníku a hořčíku. Dostupnost fosforu pro rostliny je omezená jak v kyselém, tak v zásaditém extrému pH kvůli tvorbě málo rozpustných sloučenin s hliníkem, železem a vápníkem.

Rostliny si vyvinuly adaptivní mechanismy ke zlepšení jejich schopnosti vyrovnat se s nepříznivými podmínkami v půdě asociací s houbami. Nejběžnější mutualistické soužití mezi houbami a kořeny rostlin se nazývá mykorrhiza (Obr. 1). Při tomto typu soužití mohou houby efektivně přispívat k mobilizaci živin v půdě, zásobení rostliny vodou a produkovat enzymy podílející se na hydrolyze sloučenin fosforu a dusíku z organické hmoty v zemině. Dále mohou tyto houby stimulovat odolnost rostlin vůči abiotickému a biotickému stresu například aktivací rostlinných obranných mechanismů či indukci změny v kořenovém uspořádání. Rostliny naopak poskytují houbám uhlíkaté sloučeniny (hlavně jednoduché sacharidy jako glukosu a fruktosu), čímž podporují jejich růst¹⁶. Skrz houbové mycelium může být „prohledávána“ okolní půda za účelem získání fosforu a dalších živin. Je odhadováno, že rozsah houbového mycelia může být 10 – 100 m na 1 cm kořene nebo na 1 gram půdy chudé na fosfor¹⁷. Růst a kolonizace kořenů mykorrhizními houbami se liší s ohledem na pH optimum těchto hub.

Kromě hub mohou k adaptaci rostliny na extrémní pH půdy přispívat také bakterie, přestože jejich vlastní distribuce je hodnotou pH zeminy silně ovlivněna. Optimum pH většiny půdních prokaryot se pohybuje zpravidla okolo neutrality. Hlavní způsob adaptace mikroorganismů na extrémní pH spočívá především v jejich snaze udržet intracelulární pH okolo fyziologické hodnoty, tj. okolo 7. Některé enzymy nalezené ve vnější cytoplazmatické membráně mají nižší pH optimum, zatímco všechny známé cytoplazmatické enzymy mají pH optimum v rozmezí 5 – 8¹⁸.

Zeminy zatížené vyššími koncentracemi solí

Zasolení zeminy je velmi častý problém, který významně limituje pěstování zemědělsky významných rostlin, především pak sóji (*Glycine max*)¹⁹. Zvýšené zasolení narušuje iontovou rovnováhu uvnitř buněčných orgánů a vytváří vodní deficit vyvolávající zakrnutí rostliny, snížení produkce biomasy a vznik chlorózy (symptom na listech rostlin projevující se především vytvářením znaků a barevných skvrn)²⁰.

Endofytní houba *Penicillium minioluteum* ovlivňuje růst sóji ve stresových podmínkách způsobených vyšší koncentrací solí. Zmírnění stresových symptomů v důsledku inokulace danou houbou bylo objasněno prokázáním snížené koncentrace kyseliny abscisové (inhibiční fytohormon blokující funkci giberelinů) a současného zvýšení akumulace kyseliny salicylové a giberelinů v rostlinách²¹. Kyselina salicylová iniciuje v rostlinách indukovanou systémovou rezistenci (ISR, fyziologický stav vznikající v odpovědi imunitního systému rostliny na specifické vnější stimuly, který se projevuje její zvýšenou obranyschopností²²) vůči patogenům a nepřímo napomáhá rostlině vyrovnávat se s (a)biotickým stresem. Symbióza *P. minioluteum* se sójou také zpětnově navazuje obsah daidzeinu a ganisteinu²¹, sójových izoflavonoidů, které jsou považovány za signální molekuly indukující tvorbu endo- a ektomykorhizy²³.

Některé endofytní bakterie mohou rovněž napomáhat růstu rostlin v zasolených půdách. Například některé pseudomonády pozitivně ovlivňují růst rajčat (*Solanum lycopersicum*) ve stresových podmínkách, a to především díky produkci enzymu ACC-deaminasy, který degraduje prekurzor ethylenu, kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC)²⁴. Bakterie se schopností produkovat enzym ACC-deaminasu mohou ACC degradovat a využívat ji jako zdroj uhlíku. Za přítomnosti těchto bakterií je tedy zabráněno zpětnému vstřebávání ACC kořeny. Důsledkem je nižší tvorba ethylenu, tudíž zmírnění senescence a snížení inhibice růstu kořenů¹⁰.

Zeminy kontaminované

Mikroorganismy mohou také pomoci různými mechanismy napomáhat fytoředičným procesům v zeminách kontaminovaných organickými polutanty a anorganickými toxickými ionty. Fytoředičace je proces, při kterém rostliny vážejí, akumulují nebo rozkládají kontaminanty, a tím je stabilizují nebo přímo odstraňují ze životního prostředí²⁵⁻²⁷. V praxi bývají fytoředičací procesy omezovány různými faktory, jako jsou vlastnosti zeminy, toxicita polutantů, schopnost akumulace polutantů rostlinou nebo nedostatečně rozvinutá kořenová soustava rostliny.

Rhizosféra a endofytní mikroorganismy mohou pozitivně ovlivňovat proces fytoředičace tím, že podporují růst rostliny v kontaminovaném prostředí v důsledku lepšího zásobení živinami, produkce rostlinných hormonů, fixace dusíku a zvyšování odolnosti vůči biotickému a abiotickému stresu²⁸. Dále mohou mikroorganismy napomáhat mobilizaci a akumulaci kovů při fytoextrakcích tím, že mění rozpustnost, dostupnost a transport těžkých kovů a živin produkcí organických kyselin, uvolňováním chelátorů a změnami redoxního potenciálu²⁸.

Významnou roli mají mikroorganismy při degradaci organických polutantů, které bývají zpravidla fytotoxické a nemohou být odstraňovány rostlinami samotnými. Mnohé rhizosféra a endofytní mikroorganismy disponují příslušnými degradačními dráhami a metabolickými aktivitami, které navyšují odbourávání organických polutantů a snižují evapotranspiraci těchto látek do ovzduší²⁹.

Význam mikroorganismů při ochraně rostliny před patogeny

Zemina je rezervoárem pro velké množství potenciálních rostlinných patogenů. Rostliny se sníženou vitalitou, které vyrůstají v nepříznivých podmínkách, mohou být těmito patogeny snadněji infikovány. Hlavními aspekty snižujícími odolnost rostlin v zemědělství proti infekci patogeny jsou nízká kvalita osiva, nevhodný vodní režim a klimatické podmínky³⁰.

Bakterie asociované s rostlinou mohou být úspěšně využívány pro ochranu před patogeny. Jedním z mechanismů, kterým může protektivní efekt probíhat, je produkce inhibičních alelochemikálií, jako jsou siderofory, antibiotika, biocidní těkavé látky a lytické či detoxifikační enzymy³⁰.

Dalším způsobem ochrany rostliny před patogeny je kompetitivní kolonizace kořenů. V okolí kořenů se nacházejí vhodné niky bohaté na různé živiny, které zahrnují obrovskou diverzitu mikroorganismů. Kompetice o živiny a niky je hlavním mechanismem, kterým bakterie chrání hostitelské rostliny před fytopatogenními mikroorganismy³⁰. Rhizosféra bakterie mohou dosahovat povrchu kořenů snadněji díky aktivnímu pohybu pomocí bičíků, přičemž tento pohyb je řízený chemotakticky³¹. Mezi atraktanty nacházející se v kořenových exudátech patří některé organické kyseliny, aminokyseliny a cukry³². V exudátech mohou být ale přítomny i antimikrobiální látky, které mohou favorizovat mikroorganismy opatřené enzymatickými systémy pro jejich detoxifikaci³³.

Mikroorganismy mohou také nepřímo stimulovat růst rostlin v přítomnosti patogenů prostřednictvím indukované systémové rezistence. Díky biotickým změnám, které následují po aktivaci ISR, jsou zesíleny vrozené obranné mechanismy rostliny. Stav zvýšené rezistence je pak účinný proti široké škále patogenů²².

Je známo, že ISR je vyvolávána bakteriální produkcí sideroforů, lipopolysacharidů či přítomností bičíků³⁰. Dále bylo prokázáno, že hlavní roli v procesu spouštění celkové ISR mohou mít těkavé organické sloučeniny. Spuštění ISR bakteriemi způsobí zesílení buněčných stěn rostlinných buněk (například díky akumulaci fenolických látek) a ovlivní fyziologický stav a metabolické odpovědi hostitelské rostliny vedoucí ke zvýšené syntéze obranných látek nutných pro soupeření s patogeny a/nebo abiotickými stresovými faktory³⁴. Tyto fyziologické změny v rostlinách zahrnují indukovanou akumulaci chitinas, některých peroxidas, polyfenoloxidas, fytoalexinů a chalkonsynthasy³⁰.

Závěr

Soužití mezi rostlinami a mikroorganismy bývá zpravidla oboustranně výhodné. Mikroorganismy mohou

svou činností stimulovat růst rostliny a umožňovat její přežití v případě vystavení stresovým faktorům. Sloučeniny produkované hostitelskou rostlinou, které jsou ve formě kořenových exudátů uvolňovány do okolního prostředí, pak mohou sloužit jako zdroj živin pro mikroorganismy přítomné v rhizosféře a stimulovat tak jejich růst a aktivitu. Metabolismus rostlin a asociovaných

mikroorganismů může být navíc díky jejich schopnostem a unikátním enzymovým aparátům využit jako vhodný nástroj pro šetrné dekontaminace životního prostředí.

Poděkování: Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR 13-28283S a MŠMT ČR projektu LH14004.

Literatura:

1. Hryniewicz K, Baum C (2012): The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. In: *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development* (Malik A, Grohmann E, eds.), Springer, Netherlands, 35-64.
2. Morgan JA, Bending GD, White PJ: *J. Exp. Bot.* 56, 1729 (2005).
3. Reinhold-Hurek B, Hurek T: *Trends Microbiol.* 6, 139 (1998).
4. Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al.: *J. Nat. Prod.* 67, 257 (2004).
5. Rajkumar M, Ae N, Freitas H: *Chemosphere* 77, 153 (2009).
6. Glick BR: *Can. J. Microbiol.* 41, 109 (1995).
7. Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM: *Trends Biotechnol.* 7, 39 (1989).
8. Boddey R, Dobereiner J: *Fertilizer research* 42, 241 (1995).
9. de Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ: *Biol. Fert. Soils.* 24, 358 (1997).
10. van Loon LC: *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 243 (2007).
11. Fujii T, et al.: *Plant Soil.* 103, 221 (1987).
12. You C, Zhou F: *Can. J. Microbiol.* 35, 403 (1989).
13. Malboobi M, et al.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1471 (2009).
14. Herrera-Estrella L: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5978 (1999).
15. <http://plantsinaction.science.uq.edu.au/edition1/?q=content/16-5-2-aluminium-and-manganese-toxicities>, staženo 24. června 2015.
16. Kiers ET, et al.: *Science.* 333, 880 (2011).
17. McGonigle TP, Miller MH: *Appl. Soil Ecol.* 12, 41 (1999).
18. Torsvik V, Ovreas L: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240 (2002).
19. Hamayun M, et al.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 7226 (2010).
20. Sharifi M, Ghorbanli M, Ebrahimzadeh H: *J. Plant Physiol.* 164, 1144 (2007).
21. Khan AL, et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 893 (2011).
22. van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM: *Annu Rev Phytopathol* 36, 453 (1998).
23. Volpin H, Phillips DA, Okon Y, et al.: *Plant Physiol.* 108, 1449 (1995).
24. Ali S, Charles TC, Glick BR: *Plant Physiol. Bioch.* 80, 160 (2014).
25. Cunningham SD, Berti WR, Huang JW: *Trends Biotechnol.* 13, 393 (1995).
26. Uhlík O, Musilová L, Strejček M, et al. (2012): Remediation of sites contaminated with persistent organic pollutants: Role of bacteria. In: *Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants* (Anjum NA, Pereira ME, Ahmad I, et al. eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 389-404.
27. Macek T, Uhlík O, Ječná K, et al. (2009): Advances in phytoremediation and rhizoremediation. In: *Advances in Applied Bioremediation* (Singh A, Kuhad RC, Ward OP, eds.), Springer, Berlin, 257-277.
28. Li HY, Wei DQ, Shen M, et al.: *Fungal Divers.* 54, 11 (2012).
29. Afzal M, Khan QM, Sessitsch A: *Chemosphere* 117, 232 (2014).
30. Compant S, Duffy B, Nowak J, et al.: *Appl Environ Microbiol* 71, 4951 (2005).
31. de Weert S, et al.: *Mol. Plant Microbe In.* 15, 1173 (2002).
32. Welbaum GE, Sturz AV, Dong Z, et al.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 175 (2004).
33. Bais HP, Park SW, Weir TL, et al.: *Trends Plant. Sci.* 9, 26 (2004).
34. Nowak J, Shulaev V: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39, 107 (2003).

Souhrn:

Polívková M., Uhlík O.: Mikroorganismy: škůdci, ale i přátelé rostlin

Studium interakcí mezi rostlinami a mikroorganismy je nezbytné pro pochopení mechanismů, kterými mikroorganismy stimulují růst rostlin a napomáhají jejich přežití v nepříznivých podmínkách. Jako výhodné se z tohoto hlediska jeví především symbiotické soužití rostlin s rhizosférymi a endofytními mikroorganismy. V tomto článku jsou popsány základní mechanismy, kterými tyto mikroorganismy stimulují růst rostlin v nepříznivých podmínkách způsobenými okyselováním, zasolením a kontaminací půdy a přítomností patogenů rostlin.

Klíčová slova: endofytní mikroorganismy, rhizosféryni mikroorganismy, bakterie stimulující růst rostlin

Summary:

Polívková M., Uhlík O.: Microorganisms: pests but also the friends of plants

Studying interactions between plants and microorganisms is essential for understanding mechanisms through which microorganisms stimulate the growth of plants and through which they help plants to survive unfavorable conditions. Especially, symbiotic coexistence of plants with rhizospheric and endophytic microorganisms is of highest research interest. This article describes basic mechanisms through which rhizospheric and endophytic microorganisms stimulate plant growth in soils with lower pH, higher salt concentrations, and the presence of pathogens or contaminants.

Keywords: endophytes, rhizospheric microorganisms, plant growth promoting bacteria

OBSAH

Úvodem	69
Pozvánka na konferenci	70
Krátké zprávy	71
Dobrovolná M.: Transplantace krvetvorných kmenových buněk – buněčná terapie v hematologické praxi	73
Kolek J.: Biosyntéza přírodních polyketidových látek	76
Kvasničková E.: Vláknitá houba <i>Aspergillus fumigatus</i> – infekce spojené s tvorbou biofilmu	81
Paldrychová M.: Stilbeny – fytoalexiny se širokým potenciálem	85
Pavlíčková V., Rimpelová S.: Využití fotodynamické terapie v léčbě karcinomu prostaty	89
Polívková M., Uhlík O.: Mikroorganismy: škůdci, ale i přátelé rostlin	92

CONTENTS

Editorial	69
Invitation on conference	70
Short news	71
Dobrovolná M.: Haematopoietic Stem Cell Transplantation – cellular therapy in haematological practice	73
Kolek J.: Biosynthesis of natural polyketide compounds	76
Kvasničková E.: Filamentous fungi <i>Aspergillus fumigatus</i> – biofilm-associated infections	81
Paldrychová M.: Stilbenes – phytoalexins with wide potential	85
Pavlíčková V., Rimpelová S.: Photodynamic therapy in the treatment of prostate cancer	89
Polívková M., Uhlík O.: Microorganisms: pests but also the friends of plants	92

REDAKČNÍ RADA

Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
Doc. RNDr. Marek Petřivalský, PhD., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

Novák Z.: Disertační práce. VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládějte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

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

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

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

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

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

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