

# B I P R O S P E C T

Devatenáctý ročník  
Číslo 3-4/2009

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

## BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu  
vědeckotechnických společností  
(ČSVTS)

a  
člena „European Federation  
of Biotechnology“ (EFB)

### Redakční rada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

# B I P R O S P E C T

19<sup>th</sup> Volume  
No. 3-4/2009

---

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

---

## **BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY**

member of European Federation  
of Biotechnology

### **SUMMARY**

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

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

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

For more information contact the editorial board or directly:

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

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

v nedávné době proběhly dvě významné události. Začátkem července (4. – 9. 7. 2009) se v kongresovém centru v Praze uskutečnil 34. FEBS kongres organizovaný Českou společností pro biochemii a molekulární biologii ve spolupráci s Evropskou federací pro biochemii a molekulární biologii a agenturou Czech-in. Více jak 2000 účastníků z Evropy i dalších zemí si mohlo vyslechnout 7 plenárních přednášek na nejaktuálnější témata biochemického a molekulárně biologického výzkumu a účastnit se jednání více jak 50 symposií a dalších doprovodných akcí, včetně velmi rozsáhlého souboru posterových prezentací. Součástí tohoto významného fóra biochemiků a molekulárních biologů bylo „Young Scientist Forum“ a studentská konference pro středoškolské studenty. Obě tyto akce předcházely zahájení vlastního kongresu. Během kongresu vyšla 2 čísla kongresových novin, která zachytily významné kongresové události, přiblížila zahraničním účastníkům Českou společnost pro biochemii a molekulární biologii a její aktivity a informovala je o kulturních událostech v Praze. Velice zdařilým byl i sociální doprovodný program kongresu. Bližší informace naleznou zájemci v kongresových materiálech, zejména v souborech abstrakt (abstrakta dodané v termínu a abstrakta dodaná později).

Druhou významnou událostí byl 14th European Congress on Biotechnology, který se konal ve španělské Barceloně od 13. do 16. 9. 2009 pod heslem „Symbiosis“ of Science, Industry and Society. Byl pořádán EFB (Evropskou biotechnologickou federací) a o jeho průběhu Vás informujeme ve zvláštní zprávě publikované v tomto čísle.

V příštím roce si Vás dovoluujeme pozvat zejména na 14th International Biotechnology Symposium pořádané v italském Rimini 14 – 19. 9. 2010 pod heslem „Biotechnology for the Sustainability of Human Society“ (<http://www.ibs2010.org>).

Možná Vás též zaujme 35.FEBS kongres, který se koná ve švédském Gotenburgu ([www.febs2010.org](http://www.febs2010.org)). Rádi bychom Vás též znovu upozornili na oslavy 20.výročí založení naší střešní organizace ČSVTS, které se připomenou dvoudenní konferencí ve dnech 17. a 18. března 2010 na Novotného lávce v Praze.

Zároveň Vás prosíme, abyste si do svých diářů zaznamenali termín 15. – 17. června 2011, na který připravujeme již 5. česko-švýcarské biotechnologické symposium, které se uskuteční v Praze. V návaznosti na toto symposium připravují naši olomoučtí kolegové „Symposium on Plant Biotechnology“.

O dalších akcích Vás průběžně informujeme v našem e-mailovém servisu. Pokud tento servis dosud nevyužíváte a máte o něj zájem, požádejte nás o zařazení.

Jistě jste slyšeli o narůstajících politických tlacích na zákaz genetických modifikací hospodářských plodin

v některých evropských zemích a snaze prosadit, aby o povolení se nejednalo v rámci Evropské unie, ale aby pravomoc povolení produkce i dovozu byla výhradně v rukou jednotlivých států. Tento scestný návrh podaný Rakušany je bohužel podporován i jinými (14) státy Unie (viz *European Biotechnology New* 8 (č. 7 – 8) 5 (2009)). Při propojení výroby a distribuce v zemích Unie je tento návrh prakticky nerealizovatelný a navíc neřeší zásadní problém. Pokud je něco škodlivé, pak je to škodlivé ve všech zemích a pokud to škodlivé není, není důvod to zakazovat nikde. Snad má EU dost síly odpovědně posoudit zdravotní a environmentální bezpečnost příslušné geneticky modifikované plodiny. Jde o to nahradit politické preference seriózním vědeckým posouzením. O to se snaží i „bílá kniha geneticky modifikovaných plodin“ (*White book – genetically modified crops*) vydaná v anglickém jazyce českými vědci pod redakcí Prof. Sehnala a Prof. Drobníka. O publikaci informuje i časopis *European Biotechnology News* (8, 26, 2009) a stanovisko autorů je zde sumarizováno do šesti bodů:

1. Přijatá rozhodnutí by neměla být v rozporu s vědeckými důkazy
2. Kultivační technologie, včetně genetických modifikací, by měly být posuzovány podle dosaženého výsledku spíše než podle typu procesu.
3. Princip předběžné opatrnosti by měl být nahrazen porovnáním rizika a výhod u všech inovací v zemědělství
4. Stanovení rizika by mělo vždy zahrnovat výhody a srovnání s paralelně realizovanými technologiemi ve všech ohledech
5. Ekonomické hodnocení by mělo být prováděno ve srovnání s paralelními technologiemi
6. Pokud by jednotlivé státy měly právo zakázat technologie dovolené v EU měly by mít také možnost používat technologie, které dosud nebyly v EU schválené.

S plným zněním anglické verze se můžete seznámit na internetové adrese [www.bc.cas.cz/en/MOBITAG.html](http://www.bc.cas.cz/en/MOBITAG.html), se zkrácenou verzí v českém jazyce na [www.biotrin.cz](http://www.biotrin.cz).

Je na Vás, abyste si o této problematice udělali vlastní názor. Bohužel, bude jistě trvat ještě dlouho, než se velmi rozdílné pohledy na tuto problematiku vytříbí.

Jako obvykle Vám přinášíme řadu přehledných článků a doufáme, že se Vám budou líbit. Tentokrát se budou týkat lipidomiky, tkáňového inženýrství, možností regulace senescence u rostlin, geneticky modifikovaných brambor, nanočástic v nanomedicině i využití biomasy v energetice.

Váš  
Jan Káš

# THE 14th EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY

Hlavním tématem 14. evropského biotechnologického kongresu, který se letos konal ve španělské Barceloně, byla Symbióza, která symbolizuje spojení mezi vědou, průmyslem a společností. Oficiální zahájení proběhlo v neděli 13. září 2009, po něm následovala úvodní plenární přednáška Dr. Craiga Ventera, prezidenta JCVI, nazvaná "From reading to writing the genetic code", ve které Dr. Venter představil výsledky výzkumu zaměřeného na kompletní popsání lidského genomu a poté i svůj poslední projekt, jehož cílem je zmapování genetické diversity mořských společenství. Konference poté probíhala v dalších třech dnech ve čtyřech paralelních sekcích zaměřených na: 1. zdraví a medicínu, 2. průmyslovou biotechnologii, 3. biotechnologii rostlin a životního prostředí a 4. systematickou biologii a technologii. Součástí kongresu byla i rozsáhlá posterová sekce a výstava produktů zaměřených na biotechnologie. Kromě toho každý den probíhala krátká prezentace firem specializujících se na klíčové inovace nebo vývoj nových produktů a inovativních řešení ve farmaceutické a biotechnologické oblasti. Kongresu se zúčastnilo více než 1000 vědců, mladých výzkumníků a představitelů biotechnologických firem z celého světa.

**Leona Paulová**

*Ústav kvasné chemie a biochemie  
VŠCHT v Praze*

## 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition

### IBS 2010



Biotechnology for the  
Sustainability of Human Society

15-19 September 2010  
Palacongressi, Rimini – Italy

**Brokerage Events and Stakeholders'  
Meetings for European Framework  
Programs and International Projects  
will be hosted.**

**Particular emphasis will be given to the  
presentation of results of European FP7  
and international projects within each  
session. Rooms for project/FP7 consortia  
meetings will be offered (free of charge),  
see the website [www.ibs2010.org](http://www.ibs2010.org)**

#### KEY DATES AND DEADLINES

Requests for meeting projects: 30 September 2009  
Second circular and call for papers: 30 September 2009  
Oral and poster abstract deadline: 1 March 2010  
Notification of acceptance: 12 April 2010  
Early registration deadline: 31 May 2010

## FIRST CIRCULAR

[www.ibs2010.org](http://www.ibs2010.org)

CONVENOR



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

ORGANISERS



CO-ORGANISERS



# TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Jana Havlíková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

## Úvod

Tkáňové inženýrství je nově vznikající biotechnologickou disciplínou na pomezí medicíny, buněčné i molekulární biologie, nauky o materiálech a inženýrství. Jeho cílem je obnovit nebo nahradit tkáň a orgány poškozené onemocněním, zraněním nebo vrozenou anomálií.

Hnacím motorem pro rozvoj tkáňového inženýrství je nedostatek orgánů potřebných pro transplantace. V roce 2000 čekalo v USA na transplantaci orgánu 72 000 lidí a bylo uskutečněno pouze 23 000 transplantací.<sup>1</sup> Transplantace s sebou nesou také další rizika spojená s odmítnutím (rejekcí) transplantovaného orgánu nebo možností nákazy imunosuprimovaného pacienta třeba i banální infekcí, která může mít mnohdy závažné důsledky.

Již nyní jsou k dispozici umělé náhrady některých tkání a orgánů, jejich životnost je ovšem omezená a často se též vyskytují problémy s potlačením negativní odezvy imunitního systému.

Základní myšlenkou tkáňového inženýrství je kultivace buněk za podmínek, které povedou k tvorbě tkání. Nalezení ideálních podmínek pro kultivaci jednotlivých tkání však není snadné. Pozornost se soustřeďuje zejména na výběr buněk a polymerních nosičů.

## Buňky používané v tkáňovém inženýrství

### *Autologní buňky*

Použití autologních buněk odstraňuje problém s imunitní odezvou organismu. Jedná se o odběr vlastních orgánově specifických buněk pacienta biopsií. Jejich *in vitro* kultivaci následovanou osazením polymerní matrice stimulující další růst a tvorbu vlastní struktury tkáně a konečně zpětnou implantaci do pacientova organismu. Tato technika se uplatňuje v tkáňovém inženýrství kůže, cév, kostí, chrupavky a dalších tkání.<sup>2</sup> Chrupavka byla jednou z prvních tkání, které byla věnována velká pozornost a u které zaznamenalo tkáňové inženýrství úspěchy.

Autologní buňky nevyvolávají imunitní odpověď organismu, ale otázkou je vždy jejich životaschopnost. Buňky nemusí být dostupné, životaschopné nebo schopné proliferace.

### *Alogenní a xenogenní buňky*

Alogenní (dárce je jedinec téhož druhu) a xenogenní (dárce je zvíře) tkáň mají tu výhodu, že nevyžadují invazivní zásah do těla pacienta a umožňují získat podstatně větší množství buněk. Nevýhodou je riziko přenosu infekce a nutnost použití imunosupresiv.

Mnoho úsilí se vynakládá na vyvinutí metod používajících neautologní tkáň. Tyto metody se soustřeďují na odstranění nebo destrukci imunogenních buněk a zachování komponent extracelulární matrix, které jsou v podstatě mezi druhy konzervativní. Nejběžněji používanou metodou je termální odstranění buněk opakovaným zmrazováním a rozmrazováním.<sup>3</sup> I když je možné takto získat víceméně neimunogenní tkáň, problémy způsobují buněčné zbytky, které nejsou zcela odstraněny a mohou po implantaci vyvolávat záněty. Efektivní jsou i metody využívající k odstranění buněčných zbytků směsi detergentů.<sup>4</sup>

### *Kmenové buňky*

Přesto existuje mnoho typů tkání, které není možné získat biopsií, nebo nejsou dostupné v dostatečném množství, aby je bylo možné využít v tkáňovém inženýrství. Velmi slibné v tomto ohledu se zdají být kmenové buňky. Mají jedinečnou schopnost se za specifických podmínek diferencovat na množství různých buněčných typů. Mohou být získány buď z fetální, nebo dospělé tkáně. S ohledem na etické problémy s odběrem embryonálních kmenových buněk se pozornost současných studií soustředila na kmenové buňky dospělých jedinců.<sup>5</sup>

Kmenové buňky jednoho typu lze procesem transdiferenciace převést na typ jiný. Bylo objeveno, že lze indukovat přeměnu např. kmenových buněk kostní dřene na nervové kmenové buňky<sup>6</sup> nebo nervových kmenových buněk na hematopoetické.<sup>7</sup> Touto cestou lze získat i takový typ kmenových buněk, které organismus, např. vlivem nemoci, netvoří. Nejnovější výzkumy se ovšem spíše přiklání k možnosti, že nedochází ani tak k transdiferenciaci jako k fúzi buněk<sup>8</sup>.

## Polymerní nosiče

Růst buněk je ovlivněn řadou faktorů. Role polymerní matrice (dvoj- nebo trojrozměrné) není jen v tom, že poskytuje prostor a výživu pro růst buněk, ale podmiňuje také jejich prostorové uspořádání a stimuluje mezibuněčné interakce v mikro- a nanoměřítku.

Bylo vyzkoušeno mnoho různých materiálů. V ortopedii se osvědčily keramické a kovové materiály, včetně hydroxyapatitu a bioskla. Ve většině biologických tkání však našly lepší použití polymerní materiály, ať už se jedná o materiály přírodní nebo syntetické.

### *Přírodní polymerní nosiče*

Kolagen byl úspěšně použit nejen jako nosič pro kožní transplantace<sup>9</sup>, ale momentálně se vyskytuje mnoho nosičů na bázi kolagenu, které jsou k dispozici

pro klinické použití.<sup>10</sup> Kolagen se také používá při opravách nervů a močového měchýře. Matrigel, gel složený z membránových proteinů, se používá ke kultivaci širokého spektra buněk jako např. buněk míchy a cév.<sup>11</sup> Je rovněž komerčně dostupný. Algináty se používají v řadě studií týkajících se tkáňového inženýrství, včetně chrupavek a srdeční tkáně.<sup>12</sup>

Přestože použití přírodních polymerů v tkáňovém inženýrství vypadá slibně, existují také určitá omezení:

1. Nejde přesně kontrolovat jejich mechanické vlastnosti a degradační rychlost.
2. Přírodní materiály mohou také v určitých případech vyvolat imunitní odpověď organismu nebo mohou být živnou půdou pro mikroby a viry.

#### *Syntetické polymerní nosiče*

U syntetických polymerů existuje daleko větší škála mechanických a chemických vlastností. Jsou navrhovány tak, aby nevyvolávaly imunitní odpověď organismu, ovšem často se u nich objevují problémy s biokompatibilitou.

Nedegradabilní polymery, jako např. polytetrafluorethylen (Teflon), se používají při cévních transplantacích.<sup>13</sup> Teflon je příkladem biokompatibilního polymeru, který však v organismu často vyvolává kvůli dlouhodobému působení zánětlivou odpověď.

Mezi degradabilní polymerní nosiče patří polylaktáty (PLA), polyglykoláty (PGA) a jejich kopolymery (PLGA).<sup>1</sup> V organismu se degradují kyselou hydrolýzou na laktáty a glykoláty, které jsou vylučovány. Jejich degradační rychlost lze kontrolovat molekulovou hmotností polymeru a poměrem laktátových a glykolátových podjednotek. Laktáty jsou díky methylovým skupinám více hydrofobní, jejich hydrolýza je proto pomalejší. Polymerní nosič se tak může rozpadnout po několika týdnech nebo až po několika letech. K širokému uplatnění PLA a zvláště PLGA přispívá také jejich snadná zpracovatelnost. Jsou též studovány kvůli transportu léčiv.

Poly-4-hydroxybutyrát (P4HB) a polyhydroxyalkanoát (PHA) mají výborné elastické vlastnosti a mají mnohé použití v tkáňovém inženýrství, používají se např. pro výrobu srdečních cév. Jejich nevýhodou je, že oproti dříve zmíněným polyesterům mají málo variabilní poločas rozpadu.<sup>14</sup>

Hydrogely jsou další třídou biomateriálů, které je věnována velká pozornost a to kvůli jejich vysoké biokompatibilitě a dobrým mechanickým vlastnostem

podobným měkkým tkáním.<sup>15</sup> Mohou nebo nemusí být degradovatelné v závislosti na jejich chemickém složení. Chemicky spojené hydrogely mohou polymerizovat *in situ* pomocí chemického iniciátoru nebo fotoiniciátoru. Výhodou fotoiniciovaných gelů je snadná kontrola polymerace. Příkladem může být postup, kdy je roztok monomeru a růstového faktoru vstříknut do poškozené tkáně. Fotoiniciací vznikne polymerní matrice obsahující růstový faktor, který podpoří rychlé prorůstání buněk vedoucí k regeneraci tkáně.

Hned v začátcích tkáňového inženýrství bylo stanoveno, že jednou ze základních vlastností nosičů musí být vysoká porosita, která je nezbytná pro přívod živin a odvod odpadních látek – pro podporu růstu větších tkání.<sup>16</sup> Pro tvorbu porézních nosičů s vysoce kontrolovanou porositou a velikostí pórů bylo vytvořeno nebo adaptováno mnoho technik.

Vlastnosti jednotlivých materiálů používaných v tkáňovém inženýrství můžeme rozdělit do dvou základních skupin: velikostní vlastnosti (mechanické vlastnosti, způsob degradace) a povrchové vlastnosti. V minulých letech byla velká část výzkumu zaměřena na povrchové vlastnosti těchto materiálů – kontrolu interakcí mezi materiály a buňkami. K degradabilním esterům a některým hydrogelům byly přes různé funkční skupiny navázány peptidy. Jedním z nejvíce studovaných peptidů je RGD peptid – peptid, který umožňuje adhezi buněk, nalezený u fibronectinu a lamininu.<sup>17</sup> Navázáním tohoto peptidu na hydrogel na bázi polymethylmetakrylátu byla zlepšena proliferace a integrace osteoblastů.<sup>18</sup> V centru zájmu je také vývoj povrchových modifikací, které by umožnily připojení jen určitých specifických buněk.

#### **Závěr**

Tkáňové inženýrství představuje intenzivně se rozvíjející oblast aplikovaného výzkumu, jehož výsledky se běžně uplatňují v klinické praxi již dnes a jehož cíle by měly pomoci vyřešit řadu současných problémů humánní medicíny. Intenzivní výzkum v této oblasti je směřován především k samostatnému růstu tkání, což je důležitý krok směrem ke kompletním a tolik potřebným orgánům jakými jsou třeba játra, srdce nebo ledviny. Vedle genové terapie tak tkáňové inženýrství představuje druhý mocný nástroj medicíny budoucnosti.

#### **Literatura:**

1. Lavik E, Langer R: Appl Microbiol Biotechnol 65, 1 (2004)
2. Stock UA, Vacanti JP: Annu Rev Med 52, 443 (2001).
3. Ide C, Tohyama K, Tajima K, et al.: J. Reconstr Microsurg 18, 295 (2002).
4. Sondell M, Lundborg G, Kanje M: Brain Res 795, 44 (1998).
5. Schmidt CE, Leach JB: Annu Rev Biomed Eng 5, 293 (2003).
6. Mezy E, Chandross K, Harta G, et al.: Science 290, 1779 (2000).
7. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, et al.: Science 283, 534 (1999).
8. Ying QL, Nichols J, Evans E et al.: Nature 416, 545 (2002).
9. Pomahac B, Svensjo T, Yao F, et al.: Crit Rev Oral Biol Med 9, 333 (1998)

## Literatura (pokračování):

10. Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, et al.: *Biomaterials* 22, 2883 (2001)
11. Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *Exp Neurol* 148, 502 (1997)
12. Marijnissen W, Osch G van, Aigner J, et al.: *Biomaterials* 23, 1511 (2002)
13. Sayers RD, Raptis S, Berce M, et al.: *Br J Surg* 85, 934 (1998)
14. Martin DP, Williams SF: *Biochem Eng J* 16, 97 (2003)
15. Liu VA, Bhatia SN: *Biomed microdevices* 4, 257 (2002)
16. Langer R, Vacanti JP: *Science* 260, 920 (1993)
17. Hynes RO: *Cell* 48, 549 (1987)
18. Burdick JA, Anseth KS: *Biomaterials* 23, 4315 (2002)

## Souhrn

### Havlíková J.: Tkáňové inženýrství

Cílem tkáňového inženýrství je obnovit nebo nahradit tkáň a orgány poškozené onemocněním, zraněním nebo vrozenou anomálií. Prezentovaný přehled se zabývá buňkami a nosiči, který by napomohly tomuto cíli.

**Klíčová slova:** tkáňové inženýrství, kultivace buněk, přírodní polymery, syntetické polymery

## Summary

### Havlíková J.: Tissue engineering

The goal of tissue engineering is to regenerate or replace tissues or organs damaged by illnesses, injuries or inherited disorders. The presented review shows the suitable cells and polymeric carriers serving for this purpose.

**Key words:** tissue engineering, cell cultivation, natural polymers, synthetic polymers

# SENESCENCE A MOŽNOSTI JEJÍ REGULACE U ROSTLIN

## Andrea Volejníková

*Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze*

## Úvod

Senescence je přirozenou součástí vývoje organismu a také jeho závěrečným stádiem ústícím k rozpadu buněk, tkáňe či celého těla.<sup>1</sup> Můžeme ji nalézt jak u rostlin tak u živočichů i dalších eukaryot. Rozdíly v projevech senescence se odvíjejí od odlišné stavby a funkce buněk.

Nejnámějším projevem senescence rostlin je žloutnutí listů na podzim. V principu jde o recyklaci složek listu. Nutričně významné látky – stavební, zásobní i funkční jsou degradovány a převedeny na transportovatelnou formu či energii. Následně jsou dopraveny do jiného orgánu a opět využity. Dochází tak k rozvoji privilegované tkáňe, zatímco původní je nakonec eliminována. Proto může být senescence v některých případech považována za evoluční výhodu umožňující rostlině lépe hospodařit s dostupnými zdroji.

Na vznik a průběh tohoto procesu má vliv řada vnitřních a vnějších faktorů. Sledováním jejich působení, případně zásahem do metabolických a regulačních drah buněk jsou hledány faktory důležité pro iniciaci a propagaci celého procesu. Jedná se však o velice komplexní proces a řada jeho kroků stále ještě není objasněna.

Senescence je vysoce organizovaný a aktivní proces, který úzce souvisí s jevem zvaným programovaná buněčná smrt (PCD, programmed cell death) případně apoptosa. Tento děj je bývá popisován jako charakteristický pro mnohobuněčné organismy. Dobře je prozkoumaný zejména na savčím modelu, kde je nezbytný při ontogenezi, regeneraci orgánů a funkci imunitního systému. U rostlin se s programovanou buněčnou smrtí můžeme setkat při vývoji vodivého pletiva, aerenchymu nebo při některých napadeních patogeny.<sup>2</sup> Nejnápadnější je u již zmíněného opadu listů.

Senescenci a některé charakteristiky programované buněčné smrti můžeme nalézt i u jednodušších organismů, jako jsou kvasinky. Patří mezi jednobuněčná eukaryota. U *Saccharomyces cerevisiae* lze pozorovat senescenci a některé apoptotické znaky u mateřské buňky po proběhnutí mnoha buněčných cyklů. Dochází ke změně jejího tvaru a objemu a především zhoršené reprodukční schopnosti.<sup>3</sup> Takovouto senescenci zvanou mitotická (replikativní) můžeme nalézt i u rostlin při zastavení buněčného dělení u apikálního meristému. Post-mitotickou (somatickou) senescenci můžeme pozorovat u buněk, které již nepodléhají buněčnému dělení. Příkladem může být senescenci listů.<sup>2</sup>

## Různé podoby a příčiny senescence u rostlin

Konkrétní podoba senescence se může lišit podle výběru rostlinného druhu a jeho vývojového stadia. Můžeme se s ní setkat u rostlin s různými životními strategiemi a je způsobena odlišnými příčinami.

K velice četnému typu senescence dochází při kompetici listů o světlo. Spodní a starší listy bývají nahrazeny novějšími, lépe osluněnými.

Další známý příklad může být podzimní senescence. Můžeme jí pozorovat například u listnatých stromů mírného pásma, pro které se stává udržování listů přes zimu nevýhodné a potřebují je odstranit. Tento proces ale není zcela ztrátový, jak to na první pohled vypadá. Rostliny totiž mohou přesunout z listů mnoho využitelných látek do částí těla, které přežívají zimu.<sup>1, 4</sup>

Senescenci způsobují také vnější stresové podmínky (nedostatek živin...) působící na rostlinu. K jejímu rozvoji dochází také při mechanickém oddělení částí rostliny. To má pro nás i hospodářský význam, neboť způsobuje posklizňové ztráty zeleniny. Můžeme se s ní setkat například u salátu nebo brokolice.<sup>5</sup>

Další a zcela extrémní případ senescence můžeme nalézt u monokarpních rostlin, jejichž prioritou je jednou za život se rozmnožit semeny, zatímco zbytek rostliny přestává být v tomto okamžiku užitečný a hyne. Zde je senescence spojena s reprodukčním vývojem.<sup>1, 4</sup> Stejný proces ale v menším rozsahu můžeme nalézt i u polykarpních rostlin, zde však nehynou celá rostlina, ale jen její části, které nenesou zásoby.

Důraz je kladen především na studium senescence zemědělských plodin. Mnoho užitkových rostlin patří právě mezi monokarpní rostliny. Velice častými objekty výzkumu jsou kukuřice (*Zea mays*)<sup>6</sup> a rýže (*Oryza sativa*)<sup>7</sup>, protože jakákoliv drobná změna během dozrávání může mít dalekosáhlé následky a velký hospodářský význam. Krom hospodářských plodin bývá častým objektem *Arabidopsis thaliana*. Tato volba je výhodná nejen proto, že je její genom dobře prostudován a byla na ní provedena řada genetických prací, které pak usnadňují následující pokusy, ale také proto, že nám může velice dobře ilustrovat případ monokarpních rostlin. Má krátký životní cyklus 8 – 10 týdnů, který je velice vhodný pro studium naší problematiky. Cílem jejího života je produkce velkého množství potomků za velmi krátkou dobu. Během tohoto energeticky náročného procesu podléhá zbytek rostliny senescenci, která vyústí ve smrt rostliny.<sup>1</sup> Takto rychlý průběh má ale i své nevýhody, poskytuje tak menší prostor pro lidské zásahy a možné ovlivňování. Krom toho také všechny rostlinné druhy nereagují na stejné zásahy podobně. Například senescence listů a vývoj květů a plodů bývají souběžné procesy, ale nemusí být vždy pevně spjaté. Při použití sterilních mutantů *A. thaliana* nebyl pozorován rozdíl v rozvoji senescence oproti divokému kmenu. Pravděpodobně má u ní stárnutí a stres mnohem větší vliv než u většiny ostatních druhů.<sup>1, 8</sup>

## Buněčné změny v průběhu senescence

Jedním z hlavních rysů senescence je intenzivní katabolismus. Cílem je mobilizovat co nejvíce živin a minerálních látek. Rostliny při svém vývoji musí nakládat hospodárně s dusíkem a fosforem. Bohatým zdrojem jsou proteiny a ve fotosyntetizující tkáni především chlorofyl. V chloroplastech může být obsaženo přes 50% proteinů a 70% lipidů celé buňky. Při jeho degradaci dochází k makroskopicky pozorovatelným barevným změnám. Dochází též k dezintegraci vnitřní struktury chloroplastů, k redukci jejich počtu i obsahu.<sup>1</sup>

Kromě proteinů jsou odbourávány i nukleové kyseliny.<sup>4</sup> Dochází k rychlému poklesu totální mRNA. Avšak jaderná DNA zůstává zachována až do pozdního stadia senescence, neboť je využívána k produkci řady enzymů.<sup>8</sup>

V tkáni podléhající senescenci je možné různými způsoby sledovat pokles aktivity fotosyntetického aparátu. Můžeme měřit pokles hladiny celkových proteinů, obsahu chlorofylu, fixace CO<sub>2</sub> či přímo pokles aktivity enzymu Rubisco. Bylo pozorováno, že jeho pokles předchází prudkému poklesu obsahu chlorofylu u *Arabidopsis thaliana*.<sup>1, 9</sup> Dále je možné sledovat barevné změny, případně rozdíly v expresi fotosyntetických genů.<sup>10</sup>

Zásobní sacharidy jsou degradovány pomocí amylas. Dochází také ke zrychlenému metabolismu lipidů, jež má za následek pokles strukturální a funkční integrity membrán. Získaný acetylCoA může být použit pro respiraci a pokrytí energetické spotřeby ostatních procesů nebo pro glukoneogenezi a vzniklé sacharidy jsou transportovány pryč.<sup>8, 10</sup>

## Reverzibilita změn

Během senescence dochází v strukturách uvnitř listu k řadě rozsáhlých změn, které se zdají být nevratné. Příkladem velmi zásadních změn je degradace plastidů – amyloplastů i chloroplastů včetně chlorofylu.

Některé části tohoto procesu se podařilo vrátit zpět. Bylo tomu u stresem vyvolané senescence v odříznutém listu *Nicotiana rustica*. K regeneraci bylo použito osvětlení a cytokininy. Po ošetření získala senescentní žlutá tkáň znovu zelenou barvu. Celá tato změna byla důkladně prozkoumána. Během senescence došlo k redukci počtu chloroplastů a odbourávání chlorofylu. Při regeneraci byl syntetizován nový až na původní hodnotu. Počet plastidů však zůstal redukován a nebylo pozorováno žádné dělení ani jejich nový vznik. Tento proces se odrazil i na tloušťce listu. Při senescenci došlo k jejímu malému nárůstu (15 %) a při „regeneraci“ k dalšímu významnému zvětšení (48 %) nikoliv však k návratu do původního stavu.<sup>11</sup>

## Změny genové exprese

Z globálního pohledu na buňku se v průběhu senescence nejedná o pouhé zvýšení dosavadního katabolismu. Nejprve dochází k syntéze řady enzymů, které mají mobilizovat dostupné živiny případně regulovat nebo jinak zasahovat do celého procesu.



Při senescenci je exprimována jiná skupina genů, než za normálních podmínek. Bývají označovány SAGs (senescence associated gens). Jsou syntetizovány proteasy, nukleasy, lipasy, transportní molekuly, různé transkripční a translační faktory.<sup>1, 7, 10</sup>

K sledování úrovně exprese mnoha genů se využívají různé hybridizační techniky. Použití mikročipů znamenalo veliký pokrok v možnosti komplexního srovnávání genové exprese vzorků různého původu. A velice výhodné jsou metody využívající subtrakční hybridizace. Lze tak hledat spojitost mezi senescencí a expresí řady genů. Můžeme zde nalézt několik skupin proteinů různých funkcí – regulace a signalizace (transkripční faktory, kinasy), degradace makromolekul (aspartátové a cysteinové proteasy, proteiny spojené s funkcí ubiquitinu a proteasomu), transportní proteiny (transportéry sacharidů, permeasy aminokyselin), proteiny spojené s obranou proti stresu a patogenům (katalasa, superoxididmutasa, glutathion-S-transferasa), proteiny hormonálních drah (transkripční faktory, signální molekuly) atp. Ovšem pak zde ještě existuje významná část genů, jejichž role zatím není objasněna.<sup>10, 12</sup>

Na druhou stranu existuje skupina genů, jejichž exprese je během senescence utlumena. Někdy bývají označovány jako SDGęs (senescence downregulated genes). Jedná se hlavně o geny spojené s fotosyntézou a pochopitelně i syntéza již zmíněného cytokininu a dalších regulačních faktorů.

### Hierarchie procesu

Senescenci může podléhat celý organismus nebo individuálně jen jeho jednotlivé části. Existuje předem daná hierarchie ve stárnutí rostliny. Například u *Nicotiana tabacum*, pokud nepůsobí žádné další vlivy, postupuje senescence od spodních listů směrem nahoru.<sup>13</sup> Vysvětlení je v tom, že dole jsou nejstarší listy a nejméně osluněné listy. Působení stresu nebo reprodukčního vývoje přispívá k rozvoji senescence starých nebo už nepotřebných částí rostliny. Na druhou stranu privilegovanou částí rostliny bývají mladé listy, květy, semena nebo zásobní orgány.<sup>10</sup> Důležitou roli zde hraje hormonální regulace rostliny.

Stejně tak na úrovni listu můžeme pozorovat při rozvoji senescence určitou hierarchii. Vzhledem k tomu, že jsou cévní svazky využívány k transportu živin do ostatních částí rostliny, jsou degradovány až na posledním místě.<sup>14</sup> Obdobně zůstává stonk k transportu živin.

U jednotlivých orgánů, jako jsou listy, dochází k senescenci individuálně, nezávisle na stáří celého organismu. Bylo zjištěno, že ve vývoji listu existuje jeden zlomový bod. Tím je dosažení maximální plochy. Od tohoto okamžiku nabývají na významu faktory podporující senescenci.<sup>1</sup>

### Vnější a vnitřní faktory ovlivňující senescenci

Na iniciaci a propagaci senescence má kromě stáří vliv řada vnějších i vnitřních faktorů. Z vnějších vlivů, které

působí jako stresové podmínky, jsou významné především doba a intenzita osvětlení, přísun vody a živin z půdy, teplota<sup>1, 6</sup>, UV záření, poranění a infekce patogeny.<sup>10</sup>

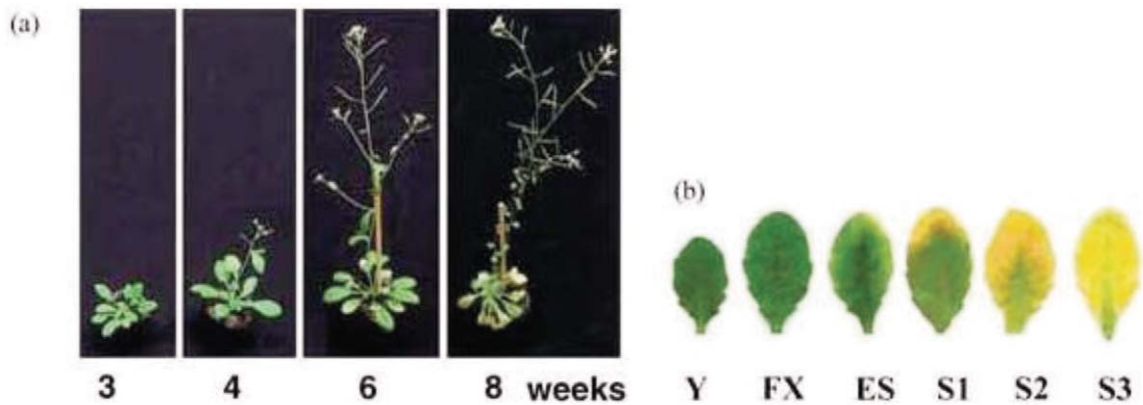
Z vnitřních vlivů je rozhodující působení rostlinných hormonů a produktů buněčného metabolismu. Hormonální produkce v rostlině často souvisí s vývojem generativních orgánů – v některých případech byla objevena spojitost se senescencí, ale jindy nejsou tyto děje pevně spjaty.<sup>1</sup> Hormony zasahují do procesu senescence listu oběma směry. Cytokininy inhibují tento proces<sup>13</sup>, zatímco ethylen<sup>9, 15</sup> kyselina abcisová a methyljasmonáty<sup>16</sup> k němu přispívají. Role auxinů v tomto procesu není jednoznačná. Velmi záleží na poměru koncentrací fytohormonů v buňce resp. plektivu, který určí směr dalšího vývoje.

Tyto faktory mají zásadní ale nikoliv však jedinečný vliv, záleží také na době a místě působení a jejich koncentraci. Příkladem může být působení ethylenu. Podporuje senescenci, nezbytné je však dosažení určitého stáří. Na mladé listy proto nemá účinek.<sup>15</sup>

Stimulační účinek mají také volné radikály kyslíku a dusíku. Četnost jejich výskytu s věkem narůstá. Vznikají jako produkty buněčného metabolismu, ale mohou pocházet též z exhalací v ovzduší.<sup>17</sup> Proti nim však působí řada systémů aktivní obrany. Takto jsou produkovány enzymy jako superoxididmutasa, askorbátreduktasa či katalasa.<sup>18</sup>

### Vnější vlivy – infekce patogeny

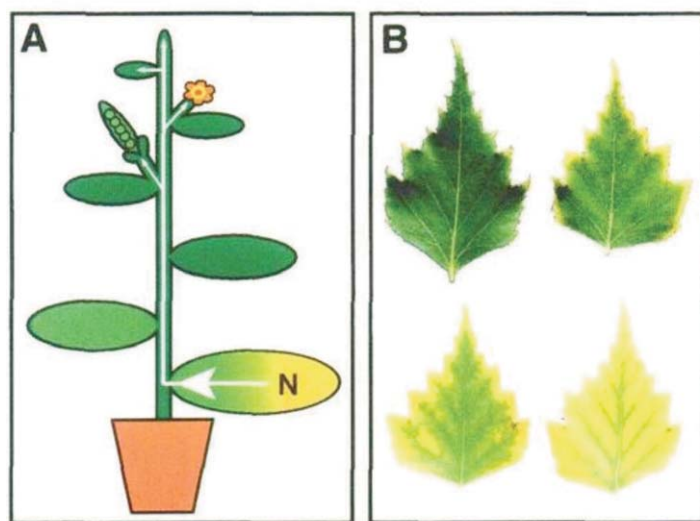
Pochody v tkáni odehrávající se při virální infekci a senescencí mají řadu společných faktorů, protože v obou případech dochází k poškození tkáně. Významnou roli v tom hrají reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species). Pokud nejsou rychle odstraněny, způsobují vážné poškození buňky.<sup>10</sup> Tyto radikály mohou poškodit celé spektrum buněčných komponent. Při modifikaci proteinů se zhorší nebo zablokuje jejich funkce. Iniciují hydroxylovou peroxidaci lipidů, které jsou obsaženy především ve všech membránových útvarech a jejich správné složení je nezbytné po správnou funkci chloroplastů a mitochondrií. A v neposlední řadě mohou způsobit mutace DNA a to samozřejmě jak chromosomové tak v mitochondriích či chloroplastech. V senescentní rostlinné tkáni tak dochází k řadě RNA i DNA modifikací.<sup>19</sup> Na základě těchto poznatků byly navrženy různé radikálové a mitochondriální teorie stárnutí. I když konečným vyvrcholením senescence má být smrt buněk celé tkáně a ROS tento proces významně urychlují, je možné najít vysvětlení proč právě v senescenci aktivovat enzymy na jejich detoxikaci. Protože jde o řízený proces, je vhodné zajistit, aby byla zpomalena buněčná smrt, než je proces dokončen a živiny z tkáně mobilizovány a odtransportovány. Podobně tomu může být i při virové infekci, na kterou se rostlinný organismus snaží adaptovat tím, že recykluje živiny z napadených listů a odstraní je dřív než se patogen rozšíří.<sup>10</sup>



**Obr. 1:** Stárnutí a senescence u *Arabidopsis thaliana*

A. vývoj a stárnutí celé rostliny, B. individuální vývoj listu: Y mladý list, FX dosažení maximální velikosti, ES první známky senescence, S1, S2, S3 rozvoj senescence

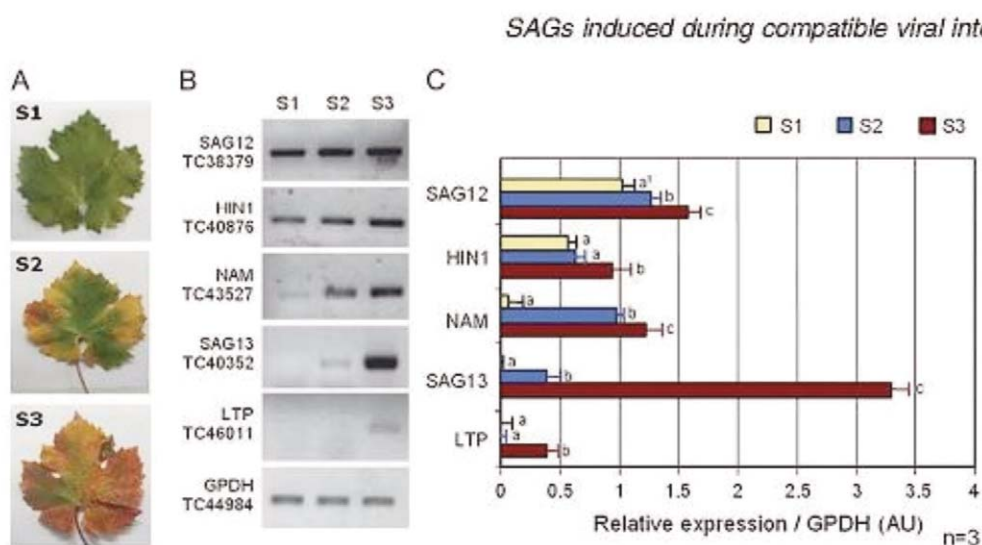
(upraveno z Hensel et al., 1993)



**Obr. 2:** Hierarchie procesu senescence

A. Přesun živin do privilegované tkáně, B. Postupná degradace listu. Poslední funkční částí jsou cévní svazky využívané k transportu živin získaných odbouráním komponent listu.

(Gan et al., 1997)



**Obr. 3:** Expresí genů spojených s virovým napadením v průběhu senescence

A. Rozvoj senescence způsobené patogeny u *Vitis vinifera*, S1 dosažení plné velikosti, S2 počátek senescence, S3 plně rozvinutá senescence, B. Expresí indukovaných genů u listů S1, S2, S3, C. Relativní expresí genů vztahovaná na expresí konstitutivně exprimovaného genu

(upraveno z Espinoza et al., 2007)

## Vnější vlivy působící při skladování zelených částí rostlin

Senescence se projevuje nejen u živé rostoucí rostliny, ale i v případě, když je list nebo jiná část rostliny oddělen a skladován. Příkladem může být skladování zeleniny a senescence způsobuje její posklizňové ztráty. U řady plodin zelené barvy jako je brokolice nebo salát, je právě jejich barva hlavním ukazatelem kvality a jakosti. Brokolice (patřící k druhu *Brassica oleracea*) je považována za bohatý zdroj vitamínů, karotenů, vlákniny a glukosinolatů, ale na druhou stranu má velice krátkou skladovatelnost. Během několika dnů po sklizení se objeví příznaky senescence a buněčné smrti a začne žloutnout. Tím se otevírá cesta pro rychlý mikrobiální rozklad. Proto byly prováděny pokusy k určení nejlepších skladovacích podmínek. V jednom případě byla měřena výměna plynů (pomocí plynové chromatografie – O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) a změny barev (pomocí analýzy obrazu) za různých podmínek – teplota a koncentrace O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> v ochranné atmosféře.

Ukázalo se, že tyto vnější faktory na skladovatelnost vliv mají. Složení atmosféry se projevilo barevnými změnami výrazněji za vyšší teploty. Snížením poměru koncentrací O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> vydržela brokolice déle zelená, naopak při vysoké koncentraci O<sub>2</sub> a nulové CO<sub>2</sub> došlo k rychlým změnám a plísňovému rozkladu. Analýza plynů ukázala, že při poklesu koncentrace kyslíku v atmosféře došlo snížení spotřeby O<sub>2</sub> a produkce CO<sub>2</sub>. Přítomnost ethylenu v atmosféře urychlovala senescenci.<sup>5</sup>

### Regulace senescence

V následující kapitole jsou uvedeny možnosti zásahu do procesu senescence. První a provedením nejjednodušší pokusy byly prováděny změnou vnějšího prostředí (viz Vnější a vnitřní faktory). Podle potřeby jsou využívány dodnes. Tak se sledovala například tmou indukovaná senescence.<sup>7</sup> Dále je možné zasáhnout do vnitřního prostředí rostliny a jejích regulačních procesů. V poslední době se provádí mnoho genetických manipulací zaměřených na geny, u kterých se předpokládá souvislost se senescencí. Může se například změnit produkce hormonu nebo ovlivnit jeho regulační dráhy.<sup>9, 13</sup>

V některých případech bývá sledována senescence u rostlin z volné přírody nebo na poli.<sup>6, 17</sup> Zde je nutné věnovat pozornost správnému výběru vzorků a důkladně sledovat vlivy počasí. Jakékoliv výkyvy mohou zasáhnout do pokusu a ztěžují srovnávání dat z různých oblastí nebo let. V laboratoři je samozřejmě nutné zachovat vnější vlivy konstantní.<sup>1</sup>

### Regulace pomocí rostlinných hormonů

Příkladem nám může být ethylen. Jedná se o jeden z hormonů, který podporuje senescenci. Je tvořen zralými plody a signalizuje, že je možno ukončit vegetaci. K lepšímu poznání procesu v rostlině můžeme buď podat hormon nebo použít mutantní rostlinu a sledovat její vývoj. Existuje řada mutant se sníženou produkcí, citlivostí nebo naopak nadprodukcí hormonu.

V jedné studii byla použita externí aplikace ethylenu ve formě plynu obklopujícího rostlinu. Jako projev senescence byla monitorována exprese cysteinových proteas SAG2 a SAG12 a změny barvy. Sledoval se vliv na listy 5,6 dvou různých stáří – v okamžiku dosažení maximální plochy listu a o tři dny starší. Na mladší listy neměl ethylen působící 18 hodin pozorovatelný vliv, po 36 hodinách začaly listy žloutnout. Starší listy začaly žloutnout a pak byly kompletně žluté. Jako negativní kontrola byl použit mutant *A. thaliana* etr1-1 nesenzitivní k ethylenu. U něj nebyly pozorovány žádné změny. Při srovnání s divokým kmenem byla zjištěna prodloužená životnost listů rozety o 30%.<sup>15</sup>

Endogenní produkce cytokininů má také významný vliv na senescenci. V senescentních listech je snížena hladina cytokininů a naopak po aplikaci cytokininů dochází k utlumení senescence. Problém je, že nelze jednoduše nadprodukcí hormonů zablockovat senescenci bez nežádoucích vedlejších účinků. Zásah do hormonální rovnováhy organismu s sebou přináší řadu dalších změn, kvůli kterým lze vliv na senescenci velice obtížně interpretovat. Podařilo se však vytvořit transgenní rostlinu, u které se takovému vedlejšímu projevu nevyskytly. Principem bylo vytvoření autoregulačního systému inhibujícího senescenci.<sup>13</sup>

Bylo využito poznatku, že transgenní rostliny s overexpresí IPT (isopentenyl transferasy), klíčového enzymu biosyntetické dráhy cytokininů, mají opožděnou senescenci. Autoregulační systém byl vytvořen takto: byl vybrán gen SAG12, jehož zvýšená exprese je vysoce specifická pro období senescence. Jeho promotor byl fúzován s IPT genem. Při nástupu senescence je gen ve zvýšené míře exprimován, dochází tak k její inhibici. Tím že se inhibuje senescence dochází k poklesu exprese genu a tím opět k snížení produkce cytokininů. Celý systém se tak drží poblíž rovnováhy, kdy je syntetizováno menší množství cytokininů které brání senescenci. Tím se předešlo vedlejším účinkům způsobeným velkými dávkami hormonu.

Tímto genem byla transformována *Nicotiana tabacum*, u níž pak došlo opravdu k zbrzdění senescence. Rostliny byly srovnávány s divokým kmenem a nebyl mezi nimi pozorován žádný zásadní rozdíl – stejná výška, počet úponů, kořenů, listů, první květy ve stejném stáří atp. V období do nástupu senescence měl divoký kmen úroveň fotosyntézy stejnou, pak se však začala snižovat (měřeno jako spotřeba CO<sub>2</sub> u stejného listu). V době, kdy podlehl senescenci a přestal kvést, byl mutant stále ještě zelený. U mutantní rostliny se prodloužila fotosyntetická fáze a dosáhlo se tak až 50% nárůstu sušiny biomasy a výtěžnosti semen.<sup>13</sup>

### Možné aplikace výzkumu

Ačkoliv se senescence vyvinula pravděpodobně jako adaptace rostlin umožňující opětovné využití živin z nepotřebných orgánů, může mít někdy negativní roli na výtěžnost hospodářských plodin. Velmi láka-

vým cílem je vytvoření geneticky modifikované rostliny – pravděpodobně kukuřice, sóji, cukrové třtiny nebo rýže, která oddálením senescence listů prodlouží období dozrávání. Zvýšila by se tak její výtěžnost. Zdá se, že existuje mnoho různých cest, jak by se toho mohlo dosáhnout. Záleží však na tom, jak velké pozitivní a negativní účinky by tento zásah do rostliny vyvolal.

#### Literatura:

1. Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, et al.: *Plant Cell* 5, 553 (1993).
2. Gan S: *Science of Aging Knowledge Environment*, 24, RE7 (2003).
3. Laun P, Pichova A, Madeo F, et al.: *Mol Microbiol* 39, 1166 (2001).
4. Smart CM: *New Phytol* 126, 419 (1994).
5. Schouten RE, Zhang X, Verschoor JA, et al.: *Postharvest Biol Technol* 51, 27 (2009).
6. Valentinuz OR, Tollenaar M: *Crop Sc* 44, 827 (2004).
7. Lee R, Wang C, Huang L, Chen SG: *J Exp Bot* 52, 1117 (2001).
8. Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, et al.: *Plant Biotechnol J* 1, 3 (2003).
9. John I, Drake R, Farrell A, et al.: *Plant J* 7, 483 (1995).
10. Espinoza C, Medina C, Somerville S, et al.: *J Exp Bot* 58, 3197 (2007).
11. Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, et al.: *J Exp Bot* 50, 1683 (1999).
12. Gepstein S, Sabehi G, Carp M, et al.: *Plant J* 36, 629 (2003).
13. Gan S, Amasino RM: *Science* 270, 1986 (1995).
14. Gan S, Amasino RM: *Plant Physiol* 113, 313 (1997).
15. Grbic V, Bleecker AB: *Plant J* 8, 595 (1995).
16. Woo HR, Chung KM, Park J, et al.: *Plant Cell* 13, 1779 (2001).
17. Nebel B, Matile P: *Trees* 6, 156 (1992).
18. Chang CJ, Kao CH: *Plant Growth Reg* 25, 11 (1998).
19. Pla M, Jofré A, Martell M, et al.: *FEBS Lett* 472, 14 (2000).

#### Souhrn

##### Volejníková A.: Senescence a možnosti její regulace u rostlin

Senescence u rostlin má svůj charakteristický průběh a projev. Nejvýraznější jsou barevné změny listů nebo jiných částí rostliny, které předchází jeho úplnému odumření. Dochází k změnám na úrovni genové exprese, které můžeme sledovat pomocí DNA mikročipů. Mezi hlavní trendy patří utlumení fotosyntézy a zvýšení katabolismu (produkce proteas, amylas...). Zásobní i funkční složky buněk jsou degradovány a převedeny na transportovatelnou formu a přesunuty jinam. Tím rostlina šetří se svými omezenými zdroji živin. Barevné projevy jsou způsobeny především odbouráváním chlorofylu.

Pro vznik senescence hrají důležitou úlohu vnější vlivy – sezónní změny, mechanické poškození, infekce patogeny atd. Jindy bývá spojena s přirozeným vývojem jedince – s kompeticí jeho částí o světlo (degradace neefektivně využívaných částí) či s jeho generativním vývojem (dozrávání plodů a semen na úkor zbytku rostliny). Tyto pochody jsou řízeny fytohormony a zásahem do jejich rovnováhy můžeme ovlivnit senescenci. Její rozvoj urychluje ethylen a naopak cytokininy ji inhibují. Je možné přidávání hormonů nebo zásah do genomu. Důmyslný systém byl vytvořen při inhibici senescence pomocí autoregulační produkce cytokininů u  $P_{SAG12}$ -IPT mutantu tabáku.

Tyto poznatky mají kromě poznávání přirozeného procesu i velký potenciální hospodářský význam. Nástup senescence limituje dobu dozrávání plodin (rýže, kukuřice) a také omezuje skladovatelnost zeleniny (brokolice).

**Klíčová slova:** senescence u rostlin, fytohormony, ethylen, cytokininy

#### Summary

##### Volejníková A.: Senescence and means of its regulation in plants

Plant senescence has its own characteristic development and manifestation. The most marked are the colour changes in leaves or other parts of the plant, preceding their decay. There are changes on the level of gene expression that can be observed by DNA-microarray. Among the main trends the attenuation of photosynthesis and increase in catabolism (protease, amylase production ...) can be seen. The storage and functional components of cells are downgraded and transformed into a transportable form and moved to another place. This is the way how the plants spare their limited sources of nutrients. The colour changes are caused mainly by the degradation of chlorophyll.

External factors play an important role in the development of senescence – season changes, mechanical injury, pathogen infection etc. In the other cases it is connected with the ontogenesis of a plant – competition for light of its parts (degradation of inefficiently used parts) or generative development (crop and seed maturing to the detriment of the rest of the plant). This process is regulated by the phytohormones. The senescence can be influenced by interference with their balance. A sophisticated system was created in the inhibition of senescence by means of autoregulated production of cytokinins in tobacco  $P_{SAG12}$ -IPT mutant.

These findings, besides bringing knowledge to the natural processes, are also of a great potential economic importance. The coming senescence limits the time of crop ripening (rise, corn) and vegetable storage stability (broccoli).

**Key words:** plant senescence, phytohormones, ethylene, cytokinines

# LIPIDOMIKA

Petra Junková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

## Úvod

Lipidomika je nový a v současné době rychle se rozvíjející vědní obor. Předmětem studia je v tomto případě buněčný lipidom, tedy soubor lipidů vytvářených buňkou. Vlastním úkolem lipidomiky je identifikovat, popřípadě kvantifikovat, lipidy v daném prostoru či čase, určit jejich funkci, funkční či strukturní vztahy s jinými lipidy a proteiny, ale také studovat enzymy účastnící se metabolických drah lipidů nebo lipidové transportéry. Lipidomika nachází svůj význam především v medicíně, protože mnoho rozšířených nemocí sužujících člověka je způsobeno lipidy. Mezi tyto choroby patří například kardiovaskulární poruchy, cukrovka typu 2, jež souvisí s obezitou, nebo infarkt. Mimo tyto poruchy, dosahující v dnešní společnosti epidemických rozměrů, se vyskytují také nemoci způsobené poruchami enzymů v metabolismu lipidů a poruchami funkce lipidových transportérů, jako například poruchy v syntéze cholesterolu či porucha ukládání lipidů. Lipidy ale také hrají významnou roli ve vzniku autoimunitních onemocnění a vystupují jako receptory pro bakterie, viry nebo toxiny. Získání nových informací o změnách v zastoupení lipidů spojených se zdravotními komplikacemi a jejich sjednocení s proteomickými a genomickými daty může být správná cesta k objasnění podstaty daného onemocnění a směřování nového terapeutického přístupu<sup>1,2</sup>.

## Buněčné lipidy a jejich organizace

Lipidy tvoří pestrou skupinu látek hrajících zásadní roli ve skladování energie, tvorbě buněčných struktur a účastnících se mnoha signálních drah jako první či druzí poslové. Obecně bývají lipidy definovány jako hydrofobní nebo amfifilní malé molekuly, strukturně však mohou být velmi různorodé. Jejich zastoupení v biologických systémech je vysoké, představují zhruba 50% hmoty biologických membrán většiny eukaryotních buněk. Biologické membrány jsou pomocí hydrofobních interakcí organizovány do dvouvrstev a skládají se převážně z lipidů majících amfifilní charakter, který vychází z přítomnosti polární hlavičky a současně z přítomnosti nepolární oblasti v molekule.

Buněčné lipidy nejsou homogenně rozděleny v každé buněčné membráně. Nejen, že se každá membrána skládá ze specificky vytvořených mikrodomén, ale také se liší složení obou vrstev membrány. Fosfatidylcholin, sfingomyelin a cholesterol se především vyskytují ve vnější vrstvě plasmatické membrány, zatímco fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylserin můžeme najít ve vnitřní cytosolické vrstvě membrány.

Buněčné lipidy mohou být rozděleny podle relativní polaritativní skupin, které obsahují, na nepolární lipidy, polární lipidy a jejich metabolity<sup>3,4,5</sup>.

## Nepolární lipidy

Nejvýznamějšími zástupci skupiny nepolárních lipidů je cholesterol, estery cholesterolu a triacylglyceroly, které se liší podle typu buňky, ve které se vyskytují, ale také podle subcelulární oblasti. Všechny tyto lipidy se skládají z malé a slabě polární části a dominantní hydrofobní oblasti. Vzhledem k tomu, že cholesterol má velký vliv na fyzikální vlastnosti membrány, procento jeho zastoupení v membráně se může v závislosti na typu buňky velmi lišit. Může se pohybovat mezi hodnotou blížící se k nule až 40 mol%. Estery cholesterolu a triacylglyceroly se nejčastěji vyskytují v lipoproteinech a buněčných tukových kapénkách, zatímco neesterifikovaný cholesterol najdeme téměř výhradně v plasmatické membráně.

## Polární lipidy

Hlavní představitelé této skupiny jsou fosfolipidy, sfingolipidy a glykolipidy.

## Fosfolipidy

Fosfolipidy obsahující glycerol se převážně vyskytují v eukaryotních buňkách a jejich výskyt dosahuje až 60 mol% všech lipidů. Fosfolipidy jsou sloučeniny obsahující alespoň jednu fosfátovou skupinu navázanou na *sn-3* pozici glycerolu. Na fosfoskupinu mohou být navázány různé molekuly, čímž dochází ke zvyšování diverzity lipidů. Takto může vznikat například fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylglycerol, fosfatidylserin nebo difosfatidylglycerol, nazývaný též kardiolipin. Ve většině eukaryotních membrán jsou dominantními fosfolipidy fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin. Dohromady představují tyto dva lipidy 75 mol% veškerých fosfolipidů v membránách. Zastoupení ostatních fosfolipidů může být vlivem typu buňky nebo subcelulárního membránového kompartmentu velmi odlišné. Na rozdíl od eukaryotních buněk není fosfatidylcholin v prokaryotních obvykle vůbec zastoupen, zatímco fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol a kardiolipin jsou majoritně zastoupené fosfolipidy. Fosfolipidy bývají v membráně distribuované asymetricky. Fosfatidylcholin je dominantní fosfolipid vnější vrstvy a fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin se vyskytují výhradně ve vnitřní vrstvě plasmatické membrány.

Fosfolipidy se však mohou také dělit podle způsobu vazby amfifilního řetězce na *sn-1* pozici glycerolu. Kromě fosfatidátů, které na této pozici váží alifatický řetězec estrovou vazbou, existují též plasmalogeny vážící nenasycený řetězec vazbou etherovou. Tyto alternativní sloučeniny se však vyskytují pouze v ethanolaminových nebo cholinových formách a ve větším množství jsou přítomné pouze v elektroaktivních membránách, jako je sarkolema

nebo membrána nervových buněk. Dále můžeme fosfolipidy také dělit podle délky amfifilních řetězců a zastoupení dvojných vazeb v nich.

### Sfingolipidy

Druhou skupinou polárních lipidů jsou sfingolipidy. Sfingolipidy obsahují jako alkoholovou složku místo glycerolu sfingosin (*trans*-4-sfingenin) nebo jeho analogy a reprezentují průměrně 5-10 mol% všech lipidů ve většině mozkových buněk. V bílé hmotě mozku u člověka však jejich množství přesahuje 30 mol%. Sfingolipidy mohou být dále rozděleny na sfingomyeliny, cerebrosidy, glukosylceramidy, lactosylceramidy, sulfatidy a další glykosfingolipidy, jež obsahují různé cukerné zbytky. Toto rozdělení vzniklo v závislosti na druhu kovalentní vazby polárních částí k ceramidu (N-acylsfingosin).

### Glykolipidy

Třetí skupinu polárních lipidů představují glykolipidy, jež zahrnují glyceroglykolipidy a sfingoglykolipidy. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami glykolipidů tkví v jejich hydrofobním jádru. Sfingoglykolipidy obsahují ceramidovou kostru, zatímco glyceroglykolipidy diacylglycerolovou kostru. Glykolipidy mohou v některých buňkách zastupovat až 10 mol% ze všech lipidů.

### Lipidové Metabolity

Poslední skupinou lipidů jsou lipidové metabolity, které vznikají enzymovou transformací mateřských lipidů nebo jejich prekurzorů. Tyto metabolity mohou být anabolické či katabolické. Přestože tato skupina zastupuje při normálních fyziologických podmínkách jen velmi malé množství z celkové hmoty lipidů, je velmi zásadní počet jednotlivých druhů molekul. Běžné lipidové metabolity zahrnují acylCoA s dlouhým řetězcem, acylkarnitiny s dlouhým řetězcem, neesterifikované mastné kyseliny, estery mastných kyselin, ceramidy, lysolipidy, eikanoidy, diacylglyceroly, sfingosin-3-fosfáty a další, přičemž mnoho z těchto metabolitů zastává funkci tzv. druhého posla. V některých případech však mohou tyto metabolity tvořit velký podíl z celkových lipidů v určitých subcelulárních strukturách. K tomuto jevu dochází při různých onemocněních, například u srdeční ischemie, a právě pomocí stanové množství určitých lipidových metabolitů můžeme identifikovat stadium nemoci.

### Lipidomika

V současné době se rozvíjející vědní obor lipidomika má za úkol definovat zásadní roli lipidů v buňce. Výzkum se především zabývá mapováním populace lipidů v biologických systémech, popisem jejich složení a biologické funkce. Úkolem lipidomiky je poskytnout molekulární „otisk prstu“ daných metabolických drah při fyziologických i nefyziologických podmínkách. Lipidy začaly být intenzivně studovány již v 60. letech 20. století, avšak díky velmi dynamickému vývoji molekulární biologie, genomiky a proteomiky byl výzkum lipidů v dalších letech zastíněn. Navíc studium lipidů nebylo

vzhledem k jejich diverzitě snadnou záležitostí. Velmi významným pokrokem v analýze lipidů byl vývoj nových technik hmotnostní spektrometrie, konkrétně technika měkké ionizace u ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) a ionizace pomocí MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). Do té doby byla pro konvenční hmotnostní analýzy využívána ionizace dopadem elektronu (electron impact ionization), tedy metoda vhodná pro malé, téžavé molekuly, avšak nevhodná pro komplexní biologické molekuly. Jiné metody ionizace, jako např. desorpce polem nebo chemická ionizace byly popsány před více než třiceti lety, ale měly různé experimentální limity nevhodné pro studium lipidů, zahrnující potřebu derivatizace, špatnou opakovatelnost, vysoký signál pozadí nebo nízkou citlivost. Při analýzách těmito technikami také docházelo ke zvýšené fragmentaci, takže nemuselo být možné detegovat molekulární ion analytu. Jak ionizace elektrosprejem, tak MALDI jsou techniky umožňující analýzu vysokomolekulárních látek bez zásadní degradace analytu a proto mají vysokou pravděpodobnost detekce molekulárního iontu. Tyto metody také doprovází vysoká citlivost a analýzy lipidů mohou být prováděny již ze submikrogramového množství vzorku. Pro lepší rozdělení lipidů ve vzorku může být také využíváno spojení kapalínové nebo plynové chromatografie a na ní navazující hmotnostní spektrometr (LC-MS, GC-MS). Toto spojení umožňuje provést analýzu lipidů o vysoké kvalitě. MALDI bývá tradičně nejčastěji spojována s TOF (time-of-flight) detektorem, založeným na charakterizaci ionizovaného analytu podle času průletu evakuovanou trubicí. S velkou úspěšností bývá pro analýzu lipidů také využíváno uspořádání MALDI-TOF/TOF. Při analýze lipidů elektrosprejovou ionizací bývá využíváno jednoduché uspořádání ESI-MS i tandemové ESI-MS/MS<sup>6,7</sup>.

Analytické strategie studie lipidomu mohou být rozděleny do dvou překrývajících se kategorií: globální a cílená lipidomika. Hlavním cílem globální lipidomiky je identifikace a relativní kvantifikace velkého množství druhů lipidů napříč různými strukturními skupinami, získaných extrakcí totálních lipidů ze vzorku. Globální lipidomika také zahrnuje „shotgun lipidomiku“, která využívá přímého nástřiku extraktu lipidů do hmotnostního spektrometru s využitím již zmíněného LC-MS. Cílená lipidomika spočívá v kvantitativní analýze jednoho nebo několika málo vybraných lipidů v rámci specifické strukturní skupiny či třídy<sup>8</sup>.

Vybrané internetové stránky zabývající se lipidomikou jsou:

[www.lipidomics.net](http://www.lipidomics.net), [www.lipidomics-expertise.de](http://www.lipidomics-expertise.de),  
[www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org), [www.k-state.edu/lipid/lipidomics](http://www.k-state.edu/lipid/lipidomics),  
[www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk).

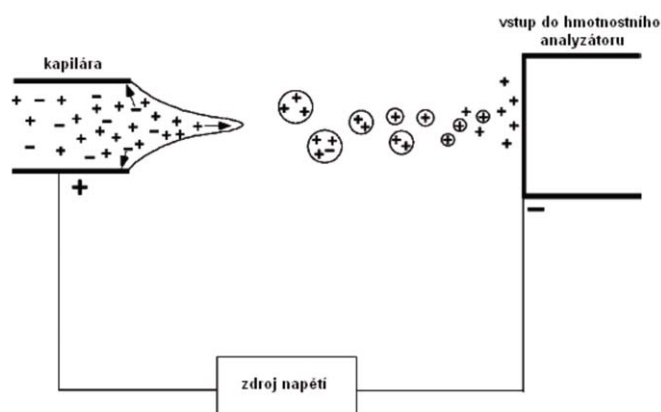
### Ionizace elektrosprejem

ESI-MS je metoda značně využívaná v mnoha aplikacích pro analýzu velkého množství různých sloučenin. Princip elektrosprejové ionizace je schematicky znázorněn na obrázku 1. Nejdříve je roztok obsahující zkouma-

ný analyt kapilárou vstříknut do ESI iontového zdroje. Zúžený hrot na konci kapiláry spolu s mechanickými silami způsobí, že roztok procházející kapilárou tvoří v iontové komoře malé kapénky. Vložením elektrického potenciálu mezi konec kapiláry a vstup do hmotnostního analyzátoru dochází k oxidačním a redukčním procesům, které umožní kapénkám nést náboj a být tak směřovány do hmotnostního analyzátoru pomocí aplikovaného elektrického pole. Vložením kladného elektrického potenciálu na konec kapiláry a přítomností záporného elektrického potenciálu u vstupu do hmotnostního analyzátoru v pozitivním režimu nesou kapénky náboj kladný. V průběhu letu jsou kapénky desolvatovány proudem horkého inertního plynu, a tato desolvatace způsobí dramatický vzrůst coulombických sil mezi ionty. Když tyto síly přesáhnou povrchové pnutí rozpouštědla, kapénky se rozpadnou a dochází ke vzniku ještě menších kapének. Tento cyklus se opakuje, dokud nejsou před vstupem do hmotnostního analyzátoru generovány molekulární ionty<sup>9,10</sup>.

Úspěšnost ionizace analytu záleží zásadním způsobem na sklonu individuálního analytu v jeho prostředí ztratit či získat náboj v elektrickém poli. Jestliže zkoumaná sloučenina obsahuje anionickou nebo kationickou oblast se snadno separovatelnými náboji, dochází k její snadnější ionizaci jak v pozitivním, tak v negativním režimu. Přestože v některých sloučeninách chybí vnitřní ionizovatelná skupina, mohou být ESI-MS také analyzovány, a to ve formě iontových aduktů. Jestliže je v takovéto sloučenině přítomný dostatečný potenciální dipól, může být indukována interakce analytu s malým aniontem či kationtem a dochází k umožnění ionizace takovéto sloučeniny a její následné analýzy na ESI-MS. Příkladem sloučeniny neschopné nést náboj, ale mající velký dipól v polární hlavici je fosfatidylcholin a sloučeniny jemu podobné, proto se provádějí analýzy těchto látek s adukty protonů ( $[M+H]^+$ ), lithia ( $[M+Li]^+$ ) nebo sodíku ( $[M+Na]^+$ ) v pozitivním režimu<sup>5</sup>.

Buněčné lipidy mohou být rozděleny podle mnoha kritérií, jak je ukázáno výše, ale mohou být také rozděleny do čtyř základních kategorií podle svého chování v elektrickém poli. První kategorii buněčných lipidů představují anionické lipidy, které nesou jeden nebo více záporných nábojů při fyziologickém pH. Do této katego-



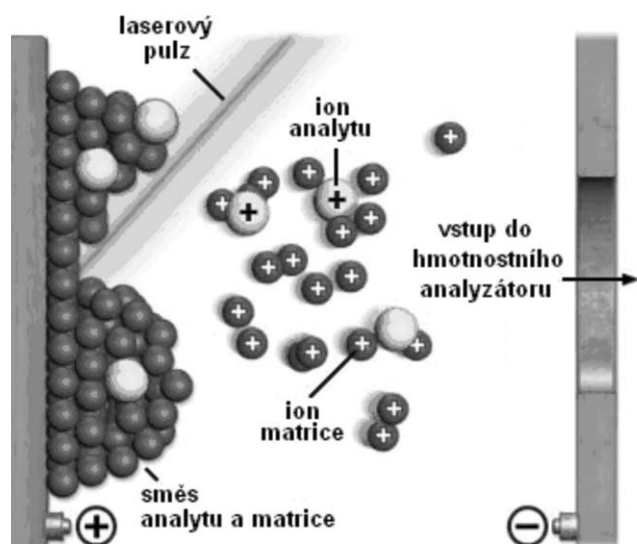
**Obř. 1:** Princip ionizace elektrosprejem.

rie náleží kardiolipin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, acylCoA, cholesterol sulfát a další. Do druhé kategorie náleží slabé anionické lipidy, které nesou negativní náboj pouze ve formě konjugované base v alkalickém pH. Přesto jsou tyto lipidy schopné získat záporný náboj v negativním režimu, avšak efektivnost jejich ionizace je podstatně nižší ve srovnání s lipidy první kategorie. Lipidy druhé kategorie mají většinou oblast obsahující ethanolaminovou skupinu (fosfatidylethanolamin, lysofosfatidylethanolamin) a jejich deriváty jako například eikosanoidy a žlučové kyseliny. Lipidy třetí kategorie jsou lipidy polární, ale elektricky neutrální jak ve fyziologickém, tak v alkalickém pH. Tyto vlastnosti mají například cholin obsahující lipidy jako fosfatidylcholin, lysofosfatidylcholin a sfingomyelin, nebo triacylglyceroly a diacylglyceroly. Do čtvrté kategorie spadají některé speciální lipidy jako acylkarnitin s dlouhým řetězcem, cholesterol, jeho deriváty a steroly<sup>5,9,10</sup>.

### Ionizační technika MALDI

Při analýze pomocí hmotnostního spektrometru využívajícího ionizační techniku MALDI je vzorek připraven smícháním studované látky s matricí, což je obvykle slabá nízkomolekulární organická kyselina, a malý objem této směsi je nanesen na terčik kovové desky. Po krystalizaci takto připraveného vzorku je kovová deska zasunuta do vysoce vakuovaného hmotnostního spektrometru. Aby mohlo dojít k desorpci a ionizaci vzorku je potřeba dodat energii. Zdrojem této energie je laserový puls směřovaný na krystaly vzorku. Úloha matrice spočívá v silné absorpci laserového záření, díky němuž dochází k vypařování matrice a současně také k přechodu molekul studované látky do plynné fáze. Matrice slouží také jako ionizační činidlo, protože je schopna protonizovat nebo deprotonizovat molekuly analytu. Jak už bylo zmíněno výše, bývá MALDI tradičně nejčastěji spojována s TOF (time-of-flight) detektorem. Princip ionizace je znázorněn na obrázku 2. Ionty analytu jsou nejdříve urychleny v elektrickém poli, čímž je jim dodána definovaná kinetická energie a detektor umístěný na konci separátoru měří čas průletu molekul v prostoru bez napětí. Jelikož je částicím se stejným nábojem dodána stejná kinetická energie, mají lehčí ionty větší rychlost než těžší a na detektor doletí dříve. Měřenou veličinou zde však není čas, ale poměr hmotnost/náboj pro každý iont.

Zásadním úkolem při analýzách lipidů na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF je výběr správné matrice. Posuzovací hlediska o správnosti použité matrice jsou její absorpční vlastnosti při vlnové délce laseru (nejčastěji 337 nm) a dobrá mísitelnost s analytem zajišťující homogenní kokrystalizaci. Přestože existuje mnoho sloučenin navržených na MALDI matrice, analýza lipidů vyžaduje především kvůli jejich nižším hmotnostem matrice se speciálními vlastnostmi. Jedna z nejdůležitějších podmínek použití matrice je tvorba co nejvyššího množství iontů z matrice při zásahu laserem. Z toho důvodu jsou pro analýzy lipidů nevhodné matrice podléhající fotoreakci jako například matrice odvozené



Obr. 2: Princip ionizace pomocí MALDI ionizátoru <sup>13</sup>.

od kyseliny skořicové. Nejpoužívanější matricí je 2,5-dihydrobenzoová kyselina (DHB) a pouze na minimální množství analyz bývá využívána matrice jiná <sup>11,12</sup>.

MALDI-TOF hmotnostní spektrometr poskytuje při analýzách lipidů dobrou reprodukovatelnost, jež je zajištěna díky kokrytalizaci analytu s matricí. Jak lipidy, tak matrice jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a proto není pro přípravu vzorků nutné používat směsi rozpouštědel (například směs acetonitrilu s vodou používané při analýzách proteinů). Další významné plus při analýze lipidů je nízká rozpustnost solí v organických rozpouštědlech, a proto není u většiny aplikací potřeba odsolovat lipidové extrakty před samotnou analýzou pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, i přestože byly použity vysoce koncentrované pufrы. Ve srovnání s hmotnostní spektrometrií využívající elektrosprej je

## Literatura

- Han X.: *Front Biosci* 12, 2601 (2007).
- Han X.: *J Neurochem* 103, 171 (2007).
- van Meer G: *EMBO J* 24, 3159 (2005).
- Vodrážka Z: *Biochemie*. AV ČR Praha, 2002. ISBN 80-200-0438-6.
- Han X, Cross RW: *Mass Spectrom Rev* 24, 367 (2005).
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ: *AAPS J* 8, E314 (2006).
- Bauer R, Imhof A: *Genom Biol* 7, 330 (2006).
- Makarow M, Hojgaard L: *Science policy briefing* (2008).
- Han X, Cross RW: *J Lipid Res* 44, 1071 (2003).
- Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P: *Anal Chem* 63, 1989 (1991).
- Hillenkamp F, Katalinic JP: *MALDI MS*. WILEY-VCH Wienheim, 2007. ISBN 978-3-527-31440-9.
- Zehethofer N, Pinto DM: *Anal Chim Acta* 627, 62 (2008).
- [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html), staženo 11.12.2008

## Souhrn

### Junková P.: Lipidomika

Lipidomika, zabývající se studiem buněčného lipidomu, je vedle genomiky a proteomiky dalším, v dnešní době rychle se rozvíjejícím vědním oborem. Lipidy tvoří rozličnou skupinu látek, které plní mnoho zásadních funkcí organismu, například slouží jako zásobárna energie, účastní se kompartmentace buněk či signálních drah. Vzestup lipidomiky je spojen primárně s pokroky na poli hmotnostní spektrometrie, především s objevy nových ionizačních metod

**Klíčová slova:** lipidomika, lipidy, hmotnostní spektrometrie

## Summary

### Junková P.: Lipidomics

Lipidomics, interested in cellular lipidome research, is nowadays together with genomics and proteomics rapidly expanding research field. Lipids present a highly diverse class of molecules, that have many crucial roles in organism, e.g. serve as energy deposit, take part in cellular compartmentation or signaling. Current rise of lipidomics is above all connected with advances in mass spectrometry, mainly with discovery of new methods of ionization.

**Key words:** lipidomics, lipids, mass spectrometry

analýza pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru rychlá, poměrně jednoduchá a jak už bylo řečeno více tolerantní k solím a jiným nečistotám ve vzorku. Velkou nevýhodou je však nesnadné spojení s kapalinovým chromatogramem. Přestože pro LC-MALDI-TOF existuje instrumentace, není toto využití rutinní jako u LC-ESI-MS <sup>11,12</sup>.

## Závěr

Lipidomika je rychle se rozvíjející pole výzkumu, které navazuje na obrovský pokrok genetiky a proteomiky, tedy oborů náležících do rodiny systémové biologie. Příčinou rozvoje lipidomiky je samozřejmě také zdokonalení analytických metod využitelných pro analýzu lipidů. I za tímto pokrokem, stejně jak je tomu u většiny biochemických pokroků, stojí medicína. Objasnění metabolických drah a veškerého dění v buňce zdravého člověka i člověka nemocného nám může pomoci nalézt nové a účinnější terapeutické přístupy. Vedle obezity, kardiovaskulárních a mnoha dědičně podmíněných poruch jsou se změnami metabolismu či homeostázy lipidů spjata také velmi těžká onemocnění jako rakovina či Alzheimerova choroba. Po mnoho let postrádal výzkum zaměřený na lipidy metody s vysokou citlivostí vhodné pro správnou identifikaci a kvantifikaci lipidů a jejich významu při zdravotních poruchách. Právě pokrok v této oblasti spolu s novými bioinformatickými výpočetními nástroji využitelnými k modelování metabolických drah zdravého či nemocí zatíženého organismu nabízí možnost posunout lipidomický výzkum na vyšší úroveň. Kromě medicíny se lipidomika uplatňuje i v jiných oborech, například v potravinářství a při studiu problematiky výživy lidí i hospodářských zvířat.



# VYUŽITÍ BIOMASY V ENERGETICE

Vojtěch Jurga

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze

## Úvod

Pojem biomasa ve svém nejširším smyslu zahrnuje hmotu všech organismů na Zemi, a to jak jejich tělesné schránky, tak i živé či neživé produkty jejich činnosti (exkrementy, semena, dřevo, obaly). V dnešní době však tento výraz reprezentuje především biologický materiál, který lze použít jako palivo či materiál pro průmyslovou produkci, zejména se jedná o rostlinnou hmotu pěstovanou za účelem produkce energie či biopaliva. Mezi biomasu dále řadíme rostlinnou či živočišnou hmotu používanou pro výrobu tkanin a chemikálií či biodegradovatelné odpady, nikoli však organický materiál transformovaný geologickými procesy na látky jako uhlí nebo ropa. Ačkoliv tato fosilní paliva z biomasy pocházejí, dle obecně přijímaných definic je pod tento pojem neřadíme, neboť obsahují uhlík, který je mimo uhlíkový cyklus již velmi dlouhou dobu a jejich spalování tedy nepatříčně navyšuje obsah oxidu uhličitého v atmosféře.

Je potřeba také uvést, že rozličné formy biomasy se stávají žádanou surovinou pro průmysl, například pro výrobu bioplastů nebo stavebních prvků. Výzkum se v současnosti zaměřuje také na využití biomasy jako zdroje vodíku do palivových článků.

Existuje řada termínů pro různé formy biomasy podle původu či způsobu vzniku, jako nejdůležitější uvedme např. fytoomasu – biomasu rostlin či dendromasu – biomasu dřevin. Je patrné, že producentem biomasy jsou především rostliny, schopné díky procesu fotosyntézy konzervovat světelnou energii, absorbovanou chlorofylem, v chemických vazbách za tvorby sacharidů, zachycujíc při tom atmosferický oxid uhličitý. Kyslík, umožňující v neposlední řadě existenci lidské civilizace, je pak paradoxně pouze jakýmsi odpadním produktem celé fotosyntetické reakce<sup>1,2</sup>.

## Biomasa jako zdroj energie

Nejvyšší podíl biomasy byl pro produkci energie využíván v dobách překvapivě dávných, a to před nástupem spalovacích motorů a strojní mechanizace do zemědělství. Odhady naznačují, že až třetina tehdejší produkce obilovin (zejména ovesa) byla použita jako krmivo pro hospodářská zvířata, která jej biologicky transformovala na kinetickou energii. Stojí za zmínku, že obdobný podíl rozlohy zemědělské půdy je v současnosti považován za půdy s nižším energetickým potenciálem a na jeho obhospodařování jsou vynakládány značné finanční prostředky formou dotací. V českých zemích sloužila biomasa ještě v první polovině minulého století k výrobě značného množství biopaliv (líh, dřevěné uhlí, dřevoplyn) nebo přímo k získávání energie. Pravděpodobně nejznámějším domácím příkladem jsou dřevoplynové agregáty využí-

vané pro pohon automobilů za druhé světové války a těsně po ní, kdy byl jejich rychlý a ekonomicky rentabilní rozvoj zapříčiněn nedostatkem kapalných fosilních paliv.

Biomasu vhodnou pro produkci energie lze dělit dle způsobu jejího vzniku na tři kategorie:

1. Reziduální biomasa při výrobních procesech
  - sklizňové zbytky zemědělské prvovýroby (zejména sláma obilná a řepková)
  - těžební odpad z lesního hospodaření, například z prořezávek, probírek a nehroubí (větve a kmeny stromků do průměru 7 cm) z mýtní těžby
  - biomasa z údržby břehových porostů, městské a krajinné zeleně (parky, stromořadí)
  - spalitelný odpad z pilařské výroby, dřevozpracujícího a papírenského průmyslu
  - organické zbytky zemědělské výroby, zejména chlévská mrva a čistírenské kaly
  - organické nebo rostlinné zbytky ze zpracovatelského průmyslu, zejména mlékárenského a potravinářského (např. rostlinné obaly olejnatých semen – slunečnice)
2. Recyklovaná biomasa z výrobků po ukončení jejich životnosti
  - odpadní dřevo stavebního průmyslu
  - vyřazené palety
  - dřevěné výrobky
3. Záměrně pěstovaná biomasa pro energetické využití, zejména z porostů speciálních plodin
  - dřeviny (tzv. rychle rostoucí): výmladkové plantáže topolů a vrb na zemědělské půdě
  - nedřevnaté rostliny: ozdobnice (*Miscanthus*), energetické obilí a mnoho dalších (u nás kukuřice, šťovík krmný)
  - palivové dříví (v některých případech)<sup>3</sup>

Všechny formy surové biomasy je před použitím vhodné upravit na fytopalivo s určitými standardními vlastnostmi tak, aby ji bylo možno efektivně spalovat nebo využít jako průmyslovou surovinu. Úpravu obvykle zahajuje tzv. štěpkování, jehož produktem je štěpka – značně nehomogenní směs odřezků a úlomků biomasy o rozměrech mezi 2 – 10 cm v závislosti na použitém štěpkovacím stroji. Je možné ji spalovat, častěji je však polotovarem k výrobě ušlechtlejších biopaliv, především tzv. briket a pelet. Výhodou této úpravy je zmenšení objemu, zlepšení transportovatelnosti a standardizace paliva (možnost vývozu do zemí EU). Velmi perspektivní jsou především tzv. dřevní pelety, vyráběné v průměrech 6 – 20 mm, délkou nepřekračující 40 mm. Jedná se o vysoce komprimované sypané (do 1,4 kg/dm<sup>3</sup>) fytopalivo o vysoké výhřevnosti (do 18 MJ/kg), nízkém obsahu popelovin (0,5 %)

a malém obsahu vody (do 10 %). Jejich využití umožňuje automatizaci spalovacích procesů i v menších topných zařízeních rodinných domků. Vyrábějí se z čisté dřevní hmoty na protlačovacích matricových lisech, někdy za přídavku organických pojiv, a splňují nejvyšší požadavky na kulturu a pohodlí vytápěných objektů při nákladech srovnatelných s fosilními palivy a s vysokým ekologickým efektem.

Důležitým aspektem využití biomasy je způsob její konverze na energii. Je-li technologie konverze předem dána, je do vysoké míry determinující pro dodávanou formu biomasy (štěpka, pelety, dřevitá nebo bylinná biomasa).

Při termochemickém zpracování, tzv. suchých procesech, lze využít buď přímého spalování, kdy za teplot nad 660 °C dochází k rozkladu organického materiálu především na hořlavé plyny, jejichž následnou oxidací se uvolňuje energie, oxid uhličitý a voda, nebo tzv. zplyňování, kdy je rostlinná biomasa konvertována (teplem, vzduchem, kyslíkem nebo vodní parou) na plyn, jenž je použit např. ve spalovacích motorech či k výrobě jiného nosiče energie (methanol chemickou syntézou). Zplyňování je rychlý proces, který na rozdíl od níže uvedených biochemických reakcí může probíhat i v malých nenákladných zařízeních. Vedlejší a často nežádaným produktem zplyňování je tvorba dehtových látek, které je nutno z plynu odstraňovat, nicméně v posledních letech se na tyto látky (bio-liquids) začíná pohlížet jako na cenné chemické sloučeniny využitelné k výrobě dalších produktů (kapalných paliv, bioplastů).

Biochemické (mokrý) procesy reprezentují především methanové kvašení a kvašení alkoholové. V procesu methanového kvašení je z biomasy prostřednictvím anaerobního kvašení v reaktoru tvořen bioplyn obsahující hlavně methan (50 – 80 %) a oxid uhličitý (20 – 45 %). Další příměsí tvoří sulfan, voda, dusík aj. Vedlejší produkt – fermentovaný materiál – může sloužit jako organické hnojivo na polích. Alkoholovým kvašením cukrů je vyráběn ethanol vhodný pro spalovací motory. Vhodnou výchozí surovinou je cukrová řepa a cukrová třtina, ale také brambory či kukuřice. Výroba ethanolu z celulosy je zatím ve stadiu výzkumu (rozklad celulosy pomocí *Trichoderma viridaeae*, produkce ethanolu při 65 °C pomocí rodu *Clostridium*).

Esterifikací řepkového oleje vzniká tzv. bionafta. Methylestery mastných kyselin mají jiné složení než konvenční nafta, mají však obdobnou viskozitu, výhřevnost i průběh spalování. Problémem je teplota tuhnutí (komplikace při startování motoru při teplotách pod 5 °C), výhodou jsou nižší emise plynů a mísitelnost bionafty s normální naftou<sup>1,4,5,6</sup>.

### Spalitelná biomasa a pevná biopaliva

Ke spalování je vhodná především rostlinná biomasa z různých druhů dřevin nebo dřevnatějších a slamnatých plodin, která má v suchém stavu velmi podobné chemické složení. Z přibližně 44 – 48 % je tvořena uhlíkem, ze 44 % kyslíkem a z 5,5 – 6,5 % vodíkem.

Z uvedeného také vyplývá skutečnost, že výhřevnost zcela suché fytomasy různých plodin je téměř shodná – obvykle se pohybuje okolo 17,5 – 19,5 MJ/kg. Rozdíly ve výhřevnosti jsou dány zejména poměrem ligninu (25,5 MJ/kg) a celulosy (18,8 MJ/kg). Mírně vyšší výhřevnost kůry, větví a jehličí je dána vyšším obsahem pryskyřic, které mají asi dvojnásobnou výhřevnost oproti samotnému dřevu.

Významnou výhodou biopaliv je tzv. neutrální produkce oxidu uhličitého, neboť jeho množství uvolněné spalováním je přibližně ve stejném rozsahu vázáno zpět do nově dorůstajících rostlin na energetických plantážích a v zemědělských porostech. Další výhodou je, že ve valné většině neobsahují významné množství síry a jejich spalování tedy není zdrojem oxidu siřičitého. Obsah popela je v biomase velmi nízký, v případě dřeva průměrně okolo 1 %, často i nižší. Vyšší obsah popela v kůře stromu je zřejmě dán jejím větším znečištěním blátem a zeminou během růstu stromu a při kácení a soustřeďování dříví. I tak odpadá například potřeba kontinuálního odvodu tuhých zbytků po spalování, což vede k finančním úsporám. Popel navíc obsahuje množství stopových prvků, které z něj činí velmi vhodnou příměs hnojiv.

Bezprostřední vliv na výhřevnost dřeva má jeho vlhkost, která může u čerstvě pokácených stromů přesahovat 60 %. Při takovémto obsahu vody již výhřevnost nepostačuje ani k udržení spalovacího procesu, pokud dřevo přece jen hoří, jedná se o velmi nerovnoměrný proces, který je technicky obtížné regulovat a účinnost takového procesu je kriticky snížena. Ani spalování naprosto suchého dřeva není paradoxně optimální z hlediska průběhu procesu hoření. Příliš suchá hmota hoří explozivně a v kouřových plynech uniká významný podíl energie. Dřevo s vysokým obsahem vody se uskladní tak, aby se nedotýkalo půdy a bylo umožněno proudění vzduchu, takto může za ideálních podmínek klesnout vlhkost ke 20 %, která je již pro spalování vhodná.

V poslední době významně narůstá využití průmyslové reziduální dřevní biomasy (u nás se vyskytuje v mnoha formách a velkém množství, neboť patříme mezi nadprůměrně lesnaté země), která se zejména pro dřevozpracující podniky stává z problematického odpadu ceněnou surovinou (např. pro výrobu dřevěných pelet a briket) nebo přímo palivem. Dalším zdrojem výhodným pro budoucí použití jsou tzv. lesní těžební zbytky (nehroubí po mýtní těžbě, dřevní hmota po tzv. výchovných zásazích – probírkách a prořezávkách), které se v současné době buď nechávají v porostu zetlít nebo se spalují na pasekách. Podíl těchto zbytků je sice důležitý pro zachování rovnováhy koloběhu prvků v lesním ekosystému, nicméně největší část tohoto koloběhu tvoří každoroční opad listů, jehlic a drobných větviček, proto se bezpečně množství biomasy, které lze odebrat bez poškození ekosystému, odhaduje na 0,2 t/ha/rok. Hlavním technologickým problémem zůstává ekonomické vyklizení nehroubí a zbytků z lesa.

**Tabulka 1:** Spalné teplo různých plodin a paliv<sup>8</sup>.

Plodina (100 % sušina)	MJ/kg
Amaranthus	16,16
Konopí seté	18,06
Koriandr (celá rostlina)	18,88
Křídlatka	19,44
Len (sláma)	18,58
Lnička	18,84
Růže (Rosa sp. R-03)	16,24
Řepka ozimá	17,48
Súdánská tráva – Hyso	18,06
Topol štěpka	18,7 – 19,2
Vrba štěpka	18,2 – 19,0
<b>Dřevní štěpka dle vlhkosti</b>	
Lesní štěpka o vlhkosti 60 %	9,20
Lesní štěpka o vlhkosti 40 %	10,10
Lesní štěpka o vlhkosti 30 %	12,20
Lesní štěpka o vlhkosti 20 %	14,30
<b>Fosilní paliva</b>	
Uhlí hnědé	14,50 – 16,50
Brikety	22,00
Uhlí černé	28,00
Koks	26,00
Zemní plyn	33,50

Vedle výše popsaných dřevních pelet, které tvoří nejperspektivnější formu spalitelné biomasy, je technologicky nejdostupnějším zdrojem biomasy sláma ze sklizňových zbytků, zejména obilnin a řepky. Nejsnadněji manipulovatelná forma slámy, řezanka, má objemovou hmotnost je 40 – 50 kg/m<sup>3</sup>, tedy 20x méně než u uhlí, což se projevuje v náročnosti na skladovací prostor, na druhou stranu slaměné brikety nebo pelety mají nejméně dvojnásobnou sypanou hmotnost oproti dřevní štěpce a samotná briketa se vyrovná briketě hnědouhelné. Výhodou je také rychlé dosychání i po dešti během 2 – 3 dnů slunečného počasí a možnost sklizeně v suchém stavu z řádků běžnou mechanizací. Zmoknutí slámy před sklizní se paradoxně považuje za přednost, neboť tak ztratí některé minerální látky (chlor, síra) a tak roste zastoupení uhlíku a vodíku. Majoritní formou sklizené slámy zůstanou na delší dobu obří balíky, které vedle přímého spalování ve velkých výtopenách umožňují po rozebrání i využití v menších výtopenách nebo ve výrobnách briket a pelet. Technologie lisování přináší včetně dopravy z pole náklady kolem 550,- Kč/t, v případě válcových balíků je asi o 100 Kč/t levnější než u balíků kvádrových. Po započtení ceny samotné slámy (daná hnojivovým obsahem, cca 200 Kč/t) a dopravy na kratší vzdálenost se cena energetické slámy v nedávné době pohybova-

la v rozmezí 700 – 1200 Kč/t a ekonomické výnosové limity tudíž vyžadují dosažení produkce vyšší než 12 tun sušiny na jeden hektar. Zařízení pro spalování slámy musí zohlednit především velký podíl zplyňujících, těkavých látek ve slámě a nutnost uplatnění oddělených prostor pro zplyňování, zpopelnění paliva a prohoření velkého množství spalných plynů s přidavkem teplého sekundárního vzduchu. Nevýhodou je sklon popele k lepení a spékání za vysokých teplot a z toho plynoucí nutnost oddělení místa odplyňování a prohoření spalných plynů, případně uplatnění zařízení pro drcení škváry<sup>5,6,7</sup>.

### Bioplyn

Bioplyn vzniká při anaerobním rozkladu organických látek (hnůj, zelené rostliny, kal z čistíren odpadních vod). Produkce se při 14 – 53 denní anaerobní fermentaci travních senáží ve vsádkových biofermentorech pohybuje v rozmezí 204 – 410 dm<sup>3</sup>/kg sušiny. Bioplyn není přesně definovaným plynem; jeho složení závisí především na složení vstupních surovin, méně pak na teplotě fermentace. Složení bioplynu ovlivňuje jeho energetickou kvalitu, výhřevnost roste zejména s obsahem metanu. Zbytky fermentačního procesu jsou velmi hodnotným hnojivem nebo kompostem.

Ze zemědělských odpadů se nejvíce využívá kejda (tekuté a pevné výkaly hospodářských zvířat promísené s vodou), popřípadě slamnatý hnůj, zbytky travin, stonky kukuřice, bramborová nať apod. Slámu, piliny a jiný odpad lze tímto způsobem také zpracovávat, avšak proces trvá déle. Nejvyužívanější technologie jsou kontinuální systém pro zpracování kejdy a zásobníkový systém pro zpracování slamnatého hnoje.

V bioplynovém fermentoru se biomasa zahřívá v plynotěsném reaktoru na provozní teplotu, která ovlivňuje množení mikroorganismů a úroveň látkové přeměny. Obvyklá teplota pro mezofilní bakterie činí 30 – 40 °C, pro termofilní 50 – 60 °C. Bioplynový potenciál hnoje je závislý na obsahu sušiny a na složení a stupni strávení potravy.

**Tabulka 2:** Vlastnosti bioplynu

Veličina	Bioplyn (60% CH <sub>4</sub> a 40% CO <sub>2</sub> )
Výhřevná hodnota [MJ/m <sup>3</sup> ]	21,5
Hranice zápalnosti [obj. %]	6 – 12
Zápalná teplota [°C]	650 – 750
Měrná hmotnost [kg/ m <sup>3</sup> ]	1,2

Současný největší problém bioplynových stanic představují pachové emise. Vedle majoritních plynů vznikají se během fermentace objevují také plynné produkty dalších biochemických procesů vytvářející pachovou stopu bioplynu. Jedná se především o sulfan (H<sub>2</sub>S) a amoniak (NH<sub>3</sub>). Rozhodující pro jejich vznik je chemické složení materiálu na vstupu do fermentoru,

provozní parametry fermentoru, způsob skladování a zpracování a další manipulace s digestátem.

Oproti spalitelné biomase je využití bioplynu obtížnější, což je způsobeno zejména značnými investičními náklady. Odměnou za vynaloženou snahu je však zisk tzv. čisté energie připravené k okamžitému využití. Ekonomicky rentabilnější jsou větší bioplynové stanice, stále však zůstává problém levného využití velkého množství odpadního tepla (zejména v létě)<sup>9,10</sup>.

Obzvláště přínosné může být spojení této technologie se zemědělstvím, kde vzniká velké množství vedlejší produkce biologického původu a zároveň poskytuje možnosti využití stabilizovaného substrátu jako organického hnojiva. V současné době je na území ČR v provozu 113 zemědělských bioplynových stanic o souhrnném výkonu 50,32 MW<sup>11,12</sup>.

### Kapalná biopaliva

Jedním z nejzajímavějších kapalných biopaliv je za studena lisovaný řepkový olej. Způsob výroby je levný a velmi jednoduchý, může být prováděn i jednotlivými zemědělci. Produkt se blíží potravinářskému řepkovému oleji a lze jej využít jako palivo do diesellových motorů nebo kotlů na LTO, motory je však nutné mírně upravit (filtr, zimní předehřívání), do kotle doplnit hořák se speciálním katalyzátorem. Řepkový olej je totiž v surové formě v podstatě nehořlavý, což na druhou stranu velmi usnadňuje jeho uskladnění. Další výhodou je, že na rozdíl od methylesteru řepkového oleje, který je součástí bionafty, je za studena lisovaný řepkový olej velmi stabilní a nepodléhá fyzikálním a chemickým změnám ani při skladování v otevřených nádržích<sup>3,13</sup>.

### Závěr

Zásobování energií se stává strategickým problémem trvale udržitelného života, zejména v souvislosti s nezbytností redukce skleníkových plynů. Významný nárůst skleníkových plynů zřetelně vyplývá ze zvyšující se spotřeby fosilních paliv, která se ve světovém měřítku od r. 1970 do r. 1998 téměř zdvojnásobila. Řešení situace je nutné hledat v obnovitelných zdrojích energie, z nichž nejvýznamnější je biomasa. Její význam spočívá nejen v největším podílu ze všech obnovitelných energií a v možnosti jejího skladování, ale také právě ve zlepšení bilance nebezpečných emisí CO<sub>2</sub>.

V úvahách o využívání biomasy je bezpodmínečně nutné vždy dodržet podmínku efektivity a promyšlenosti realizovaných projektů. Nerespektování této zásady vytváří falešný dojem, že využívání biomasy je

už z podstaty neúměrně drahé, což ve svém důsledku technologie založené na biomase v očích veřejnosti značně diskredituje.

Jednou z častých námitek je údajná energetická náročnost nakládání s biomasou a jejího transportu, která posouvá celkovou energetickou bilanci do negativních hodnot. Jednoduchým protiargumentem může mimo jiné být, že komerční společnost produkující dřevěné pelety v Kanadě si může dovolit tyto pelety se ziskem exportovat do Švédska. Přibližně 2 – 10 % energie většiny paliv (uhlí, biomasa, zemní plyn...) je spotřebováno pro jejich transport. Za předpokladu investice 5 % vlastní energie do transportu připadá na transport 1 kg motorové nafty přibližně 0,6 kWh, zatímco na 1 kg dřevních pelet pouze 0,25 kWh a mohou být tedy se ziskem transportovány na kratší vzdálenost. Biopaliva jsou proto oproti palivům fosilním převážně lokálním zdrojem energie, což na druhou stranu výhodně podporuje oblastní udržitelnou ekonomiku jednotlivých regionů a zaměstnanost a snižuje závislost na ekonomických gigantech distribuujících koncentrovanou energii<sup>14</sup>.

Při využívání biomasy platí, že největšího přínosu lze dosáhnout komplexním řešením. Účelná je například kombinace provozu bioplynové stanice s peletárnou. Odpadní teplo z kogenerační výroby elektřiny z vyprodukovaného bioplynu bude využito pro sušení dřevní hmoty před peletováním, což značně zlevní výrobu pelet. Zároveň odpad z bioplynové stanice představuje hnojivo pro produkci biomasy jak pro bioplynovou stanici, tak také pro peletárnu. Zejména komplexně pojaté projekty mohou být v budoucnu na trhu konkurenceschopné.

Neopomenutelná je také možnost využití rostlin pěstovaných pro potřeby cílené produkce energeticky využitelné biomasy ke zlepšení fungování krajiny, např. problémových lokalit na okraji obcí, ale i v navazující volné krajině.

Fytoenergetika se bezpochyby stane součástí energetické a zemědělské politiky většiny zemí a bude podporována v rámci podpory všech obnovitelných energií. V odborných kruzích i v praxi byl již získán dostatek vědomostí, umožňujících rozvinout fytoenergetiku v širším měřítku na podnikatelských základech stejně jako komplexní využití vlhčí fytomasy prostřednictvím bioplynových stanic. Z průběžného hodnocení situace, jak ji sleduje např. Evropské sdružení pro biomasu – AEBIOM – vyplývá, že biomasa se může podílet cca ze 75% na celkových zdrojích obnovitelné energie (jako je sluneční, větrná a vodní energie).

### Literatura:

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biomass>, 16. 11. 2008.
2. Bjorn Zethraeus, Bioenergy Technology Department in Växjö University, Sweden, [http://www.vxu.se/td/english/bioenergy/blog/what\\_is\\_biomass](http://www.vxu.se/td/english/bioenergy/blog/what_is_biomass), 16. 11. 2008.
3. Weger J, Jiránek J: Specifikace stávajícího potenciálu biomasy k energetickému využití v ČR, Biomasa, vydal Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích, 2003.
4. Weger J, et al.: Produkce a využití biomasy jako obnovitelného zdroje v krajině, závěrečná zpráva projektu, VÚKOZ, Průhonice, 1996.

## Literatura (pokračování):

5. Cheremisinoff NP: Wood for Energy Production, Ann Arbor Science, Michigan, str. 31-91, 1980.
6. Petříková V: Energie z fytomasy u nás a v zahraničí, sborník příspěvků konference, České Budějovice, 1995.
7. Šimanov V: Energetické využívání dříví, Terrapolis, Olomouc, 1995.
8. Koutský M, et al.: Studium hmotnostních, energetických a kontaminačních toků při spalování biomasy, Zpr. projektu VaV320/3/99, VÚKOZ, Průhonice, 2001.
9. Pastorek Z: Bioplyn v zemědělství, Efektivní využití obnovitelných a druhotných zdrojů energie, vyd. České Budějovice, 1995.
10. Pastorek Z: Bioplyn – užitečný zdroj energie nebo riskantní způsob podnikání. Biom.cz [online]. 2008-07-14 [cit. 2009-03-24]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz-bioplyn/odborne-clanky/bioplyn-uzitecny-zdroj-energie-nebo-riskantni-zpusob-podnikani>>. ISSN: 1801-2655.
11. Mužík O, Kára J: Možnosti výroby a využití bioplynu v ČR. Biom.cz [online]. 2009-03-04 [cit. 2009-03-24]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz-bioplyn/odborne-clanky/moznost-vyroby-a-vyuziti-bioplynu-v-cr>>. ISSN: 1801-2655.
12. Česká informační agentura: Měsíční přehled – Obnovitelné zdroje energie, str. 4, prosinec 2008.
13. Scholes H, et al: Czech Republic Renewable Energy Study – Resource Assesment Report, CSMa Ltd., Pernyn, MoEnvir, Prague, 1997.
14. Biomass as an energy source (biomass energy), [http://www.vxu.se/td/english/bioenergy/blog/biomass\\_as\\_an\\_energy\\_sour/index.xml](http://www.vxu.se/td/english/bioenergy/blog/biomass_as_an_energy_sour/index.xml), 17. 11. 2008.

## Souhrn

### Jurga V.: Využití biomasy v energetice

Teprve relativně krátkou dobu si lidstvo připouští odpovědnost za stav svého životního prostředí. Naše energeticky náročná společnost začíná pochybovat o ospravedlnitelnosti využití fosilních paliv, jaderná energie je však neprávem demonizována a vývin ekonomicky rentabilních fotovoltaických článků stále není u konce. Dokud věda nenabídne dostatečně ekologicky čistý a ekonomicky výhodný zdroj energie a nezajistí její trvalý přísun, je nezbytné, aby společnost nepohlížela na energetické využití biomasy jen jako na rozsáhlou devastaci přírody. Tento článek má za cíl stručně nastínit možnosti biomasy jako podpůrného energetického zdroje.

**Klíčová slova:** biomasa, bioplyn, biopaliva, zdroje energie

## Summary

### Jurga V.: Exploitation of biomass in the energetics

It has been relatively short time since mankind conceded responsibility for its living environment. Our energy-intensive society begins to question the justifiability of the fossil fuels utilization, however, the nuclear energy is being unjustly demonized and development of economically profitable fotovoltaic cells has not yet reached its goals. Unless science offers sufficiently ecologically friendly and economically advantageous energy source which would ensure energy pipe-line, it is necessary for human society to cease thinking of biomass energy usage as of extensive nature devastation. This article aims to briefly outline the potential of biomass in the role of subsidiary energy source.

**Key words:** biomass, biogas, biofuels, energy sources

# NANOČÁSTICE V NANOMEDICÍNĚ A JEJICH POTENCIÁLNÍ TOXICITA

Silvie Rimpelová

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze

## Úvod

Nanotechnologie (NT) je v současné době rapidně expandujícím oborem<sup>1,2</sup>. Financování NT v USA narostlo od roku 1997 do roku 2003 ze 116 milionů \$ na 3 miliardy \$. Aplikace nanotechnologií (NT) v medicíně je spojením dvou rozsáhlých inter-disciplinárních oborů a nebývalého sociálního a ekonomického potenciálu<sup>4</sup>. Nanočástice (NP-„nanoparticles“) jsou definovány jako drobné materiály o velikosti v rozsahu 1 – 1 000 nm, které mají specifické fyzikálně-chemické charakteristiky a takové nové funkční vlastnosti, které je významně odlišují od materiálů stejného složení viditelných v běžném velikostním

rozmezí<sup>5</sup>. Malá velikost, upravený povrch, zlepšená rozpustnost a multifunkcionalita nanočástic otvírá mnoho nových výzkumných přístupů pro biology<sup>6</sup>. Nové vlastnosti nanobiomateriálů nabízejí možnost interakce s biologickými komplexy novými způsoby<sup>7</sup>. Schopnost manipulace s fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi těchto částic poskytuje vědcům možnost racionálního designu a použití NP také pro zobrazování kontrastních činidel<sup>8,9</sup>, při hledání nových biomarkerů, v molekulární diagnostice, při vývoji nových léků a také např. při hledání biomateriálů s neobvyklými vlastnostmi a zvýšenou biokompatibilitou<sup>8</sup>. Richard Feynman, laureát Nobelovy ceny, předpověděl vznik

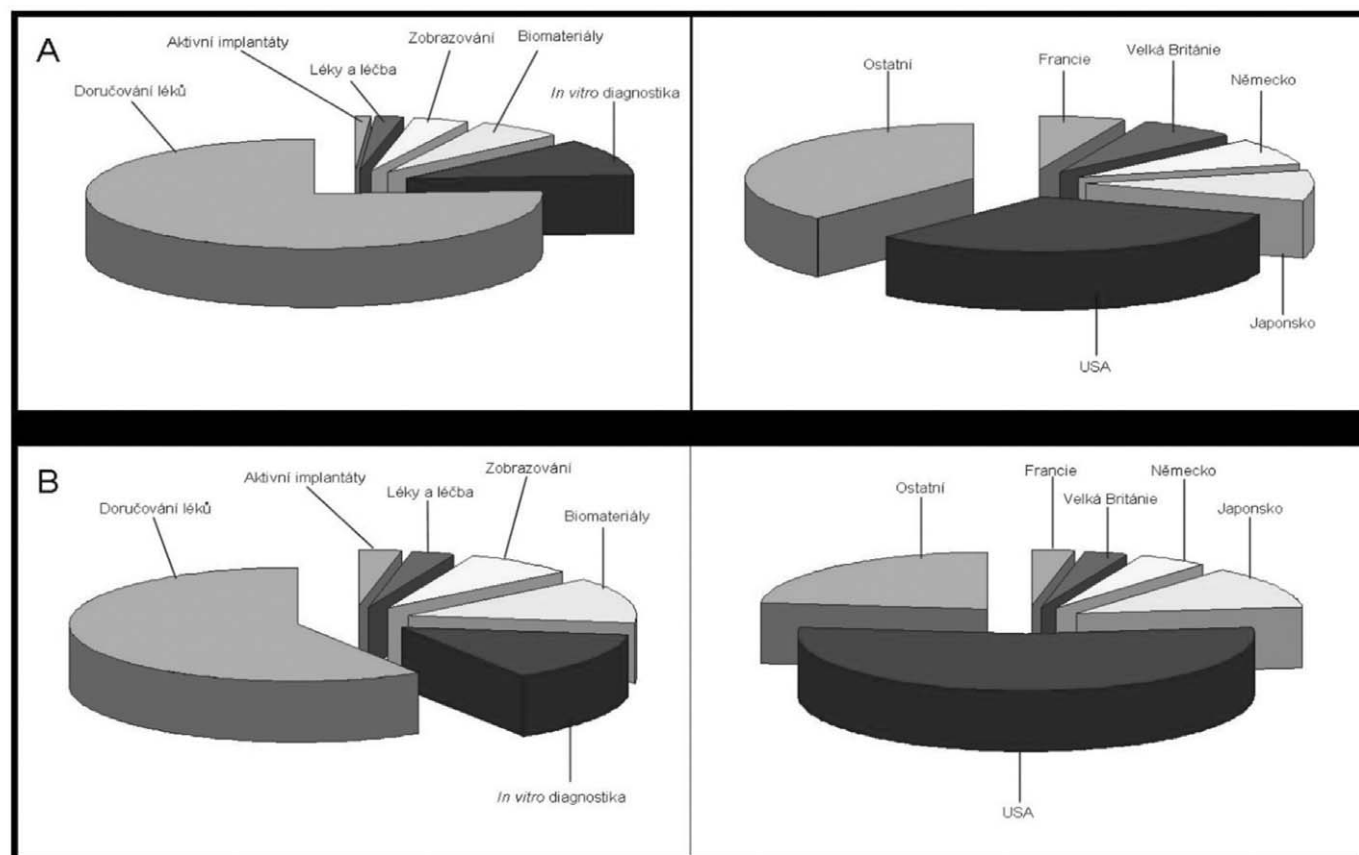
nové vědy (NT) pojednávající o těchto strukturách již v roce 1959<sup>10</sup>. Díky odlišným vlastnostem se NP staly atraktivními pro komerční a lékařské účely (zejména v onkologii a při léčbě kardiovaskulárních chorob)<sup>11</sup>. Největším potenciálem nanomedicíny (NM) je možnost vývoje personalizované medicíny – léčba „šitá“ na míru pro dané onemocnění a daného pacienta<sup>4, 12</sup>. Kromě jmenovaných výhod použití NT v medicíně je také nutné stanovit rizika s tím spojená – dodnes není plně známa potenciální toxicita nanočástic pro zdravé buňky a jejich možný nepříznivý vliv na životní prostředí<sup>4</sup>.

### Definice a charakteristika NP

Termín nanotechnologie (z Latiny *nanus*, Řečtiny *nanos*) je v literatuře definován jako řada způsobů, ze kterých mají všechny své výhody a limity<sup>12</sup>. Obecně je pojem nanotechnologie spojován s rozměry 0,1 – 100 nm<sup>4</sup>, popř. 1 – 100 nm<sup>2, 13, 14</sup> či 1 – 1000 nm<sup>5</sup>. Přesnější definice byla ustavena v roce 2000: „Nanotechnologie pojednává o materiálech a systémech, jejichž struktury a složky vykazují nové a významně zdokonalené fyzikální, chemické a biologické vlastnosti zapříčiněné jejich nanorozměry.“ Další možnou definicí NT, která byla navržena vědci Bawa a kol. je: „Design, charakterizace, produkce a aplikace struktur, zařízení a systémů kontrolovaným řízením velikosti a tvaru jsoucích v řádech nanometrů (na atomární, molekulární a makromolekulární úrovni), které produkují struktury, zařízení a systémy s nejméně jednou novou anebo lepší charakteristickou vlastností.“<sup>4</sup>

Nanomedicína je definována jako aplikace technologií odehrávajících se v rozměrech nanometrů do praktické medicíny<sup>7</sup>. NM je používána pro diagnostiku, prevenci a léčbu nemocí a pro lepší pochopení základních mechanismů nemocí<sup>11</sup>. Např. proti konvenčním terapiím rakoviny – operace, ozařování, chemoterapie – ve kterých je základním přístupem a cílem odstranit nemocné buňky rychleji než zdravé<sup>4, 13</sup>, se nanomedicína snaží používat sofistikované přístupy se snahou zničit pouze specifické buňky anebo je za použití detekce pomocí biosenzoru opravit<sup>2, 4, 13</sup>. Vedoucí oblastí v počtu patentů a publikací v NM je cílené doručování léčiv (viz Obr. 1)<sup>15</sup>.

Využití farmakologických činidel vyvinutých za použití klasických strategií farmakologického vývoje má často limitované farmako-dynamické a farmako-kinetické vlastnosti, jako je např. malý účinek léků anebo ztráta selektivity. A co víc, často se setkáváme s lékovou resistencí, která patří k fyziologickým bariérám buněčného mechanismu<sup>16</sup>. Dalším problémem u řady léků je malá rozpustnost, nízká biologická dostupnost a rychlé odstraňování z těla retikuloendoteliálním systémem<sup>13</sup>. Navíc je účinek chemoterapeutik často limitován vedlejšími účinky a to v závislosti na dávce. Ve skutečnosti, protinádorové léky, které mají obvykle velkou objemovou distribuci, jsou toxické jak pro rakovinné buňky, tak pro buňky zdravé. Aby docházelo k uvolňování do vysoce specifických cílů, je nutno miniaturizovat dopravní systém tak, aby se stal menší než jejich cíl<sup>17</sup>. Proto se díky použití NM stávají nové



**Obr. 1:** A. Publikace v jednotlivých odvětvích nanomedicíny v letech 1984 – 2004 a zastoupení jednotlivých zemí. B. Patenty v jednotlivých odvětvích nanomedicíny v letech 1993 – 2003 a zastoupení jednotlivých zemí. Převzato z publikace: Wagner V., Dullaart A., Bock A. K., Zweck A. 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotech.* 24(10):1211-1217

lékové formy personalizovanou medicínou, což zvyšuje účinek léků a snižuje jejich nespecifitu<sup>12</sup>.

## Design a tvorba NP

NT poskytují možnost produkovat povrchy, struktury a materiály s nanorozměry a specifickými znaky, které mohou napodobovat přirozené prostředí buněk, tak aby poskytly běžné funkce jako je např. buněčná adheze, mobilita a diferenciace<sup>1</sup>. NP tvořené rozličnými materiály mohou nabývat různých tvarů a velikostí, což ovlivňuje jejich výsledné vlastnosti a funkce<sup>7</sup>. Díky vysoce přizpůsobeným povrchům NP, je poměrně jednoduché upravit jejich povrch řadou činidel, což je velice výhodné, neboť nanočástice tak mají schopnost nést různá terapeutická činidla jako např. DNA, proteiny, peptidy a nízkomolekulární sloučeniny. Nejkritičtější při návrhu NP je však jejich velikost. Nanočástice menší než 20 nm procházejí skrz stěny krevních cév, vhodná velikost NP nabízí možnost penetrovat mozkovou-krevní bariérou nebo žaludeční epitel – bariéry, které ztěžují dopravu běžných terapeutik anebo zobrazovacích činidel<sup>16</sup>. Podle velikosti mohou být NP endocytovány a použity pro intracelulární zobrazování.<sup>7</sup> Používaná velikost částice je poměrně variabilní (20 – 250 nm), nicméně musí být dostatečně malá (< 250 nm), aby NP unikly zachycení retikuloendoteliálním a fagocytárním systémem. Důležitý je také náboj částic, který může ovlivnit jejich biokompatibilitu a schopnost prostoupit biologické bariéry<sup>2</sup>.

Existuje řada nových technik pro tvorbu kovových NP, které zahrnují jejich tvorbu zchlazením z horkého plynu anebo plasmou; reakci plynné směsi s horkým povrchem; návrh precizního systému krystalizace – NP s definovanými vlastnostmi anebo tvorba NP pomocí samo-skladby<sup>1, 18</sup>.

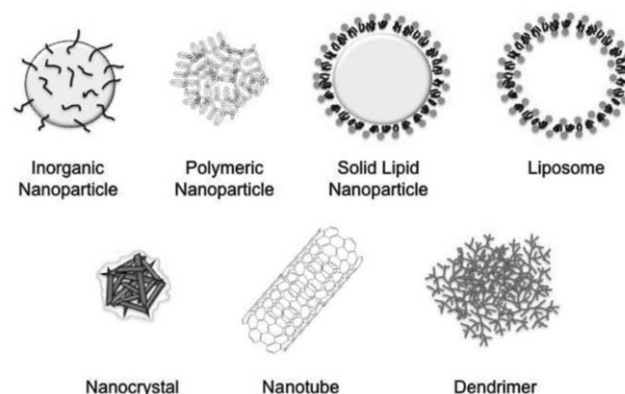
## PŘEHLED JEDNOTLIVÝCH TŘÍD NANOČÁSTIC VYUŽITELNÝCH V NANOMEDICÍNĚ:

### Polymerní nanokapsule

V nedávné době začaly být používány ve vodě rozpustné konjugáty polymerů s proteiny anebo konjugáty polymerů s nízkomolekulárními léčivy. Konjugace proteinu s polymerem redukuje jeho potenciální imunogenicitu, prodlužuje poločas rozpadu v cytoplasmě buněk a zvyšuje stabilitu proteinu<sup>19</sup>. Konjugace polymeru s lékem poskytuje efektivní nástroj pro cílení účinné látky přímo do místa působení, v případě nádorů je využíváno pasivního cílení – zvýšená permeabilita neovaskulárního systému v nádorech<sup>2, 20, 21</sup> anebo infikovaných tkání umožňuje vstup částic větších rozměrů<sup>2, 20</sup> (používaný průměr NP 130 – 300 nm), než je tomu u zdravých tkání<sup>7</sup>.

Polymerní NP (viz Obr. 2) využívané jako systém pro dopravu léčiv, bývají sférického tvaru a tvořeny z přírodních a tudíž rychle a dobře biodegradovatelných polymerů umožňujících enkapsulaci léčiva nebo genu a jeho následné snadné uvolnění<sup>7, 13</sup>. Touto strategií je docíleno ochrany proti chemické a enzymatické

degradaci, snížení imunogenicity a fagocytosy<sup>1</sup>. Nejčastěji používaná je biologicky inertní látka polyethylenglykol (PEG), pomocí kterého jsou např. PEGylovány enzymy<sup>1, 4</sup> (např. L-asparaginasa) anebo cytokiny (interferon- $\alpha$ )<sup>4</sup>. Mezi nejběžnější polymerní NP používané k biofunkcionalizaci, patří také: chitosany, polylaktát (PLA), polyglykolát, kopolymery polylaktátu a polyglykolátu (PLGA), poly(methyl-methakrylát)<sup>1, 2, 4, 22, 23</sup>. PLA a PLGA jsou již dokonce povoleny v klinické praxi pro enkapsulaci řady tříd terapeutických činidel, např. byli polymerní NP použity v genových terapiích rakoviny prsu<sup>1, 2</sup>.



**Obr. 2:** Různé typy nanočástic používané v oblasti nanobiomedicíny. Převzato z publikace: Faraji A. H., Wipf P. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 17:2950:2962

### Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové NP (viz Obr. 2) jsou submikronové kolooidní nosiče na bázi lipidů. Původně byly v roce 1990 navrženy jako farmaceutická alternativa liposomů a emulzí. Obecně jsou tyto NP v biologických systémech stabilnější než liposomy a to především díky svým relativně rigidním jádrům sestávajících se z hydrofobních lipidů, které jsou při teplotě lidského těla v pevné fázi, a které jsou obklopené monovrstvou fosfolipidů. Tyto agregáty jsou dále stabilizovány včleněním velkého množství detergentů. Tyto NP jsou výhodné díky své snadné biodegradabilitě, poněvadž jsou méně toxické než polymerní anebo keramické NP. Lipidové nanočástice mohou nabývat tří podob: s homogenním matrixem jádra, se schránkou anebo jádrem obohaceným o terapeutické činidlo. Způsob jejich podání může být orálně anebo inhalačně<sup>1</sup>.

### Nanoliposomy

Nanoliposomy (viz Obr. 2), původně připravené pro kosmetické účely v roce 1986 v laboratoři Christiana Dora ve spolupráci s Pasteurovým institutem<sup>1</sup>, jsou NP skládající se z lipidové dvojvrstvy obklopené vodným prostředím. Amfifilní molekuly použité pro přípravu těchto sloučenin jsou podobné biologickým membránám a bývají používány pro zvýšení účinnosti a zlepšení stability různých léků v živých organismech<sup>1, 19</sup>. Liposomy, klinicky nejpoužívanější NP, bývají obvykle klasifikovány do 4 kategorií a to podle své velikosti a lamelarity (počet dvojvrstev). Druhy nanoliposomů

jsou následující: malé jednodamelární váčky, oligolamelární váčky a velké jednodamelární a multilamelární váčky. Aktivní sloučeniny mohou být podle své rozpustnosti situovány buď ve vodném prostředí, anebo pokud jsou rozpustné v tucích, jsou zakotveny v lipidové membráně<sup>19</sup>. Výhodou při použití liposomů je jejich vysoká biokompatibilita, snadná biodegradabilita, flexibilita jejich velikosti a povrchových modifikací, lepší rozpustnost přepravovaných léků a také snížení systémové toxicity dopravovaných léčiv<sup>24</sup>. V současné době byla objevena nová generace liposomů, nazývaná „tajné liposomy“, které mají schopnost unikat imunitnímu systému, tudíž mají v živých organismech delší poločas rozpadu<sup>25</sup>. Příklady léčiv používaných pro dopravu liposomy jsou např. doxorubicin<sup>4, 16, 19</sup>, daunorubicin<sup>16</sup> anebo amfotericin B<sup>4, 16</sup>.

### Emulze

V této třídě NP jsou zahrnuty oleje ve vodných směsích, které jsou stabilizovány pomocí detergentů tak, aby si zachovaly svůj tvar a velikost. Lipofilní materiál může být rozpuštěn ve vodných organických rozpouštědlech tak, že je emulgován ve vodné fázi. Stejně jako liposomy jsou emulze využívány pro vyšší účinnost a ochranu řady sloučenin<sup>19</sup>.

### Uhlíkaté nanomateriály

Třída nanomateriálů sestávajících se z uhlíku, která zahrnuje fulereny a nanotyče, vyniká především díky excelentní chemické a tepelné stabilitě<sup>26</sup>. Uhlíkaté nanotyče (viz Obr. 2) byly objeveny v roce 1991 na katodě při vypařování grafitu. Fulerenové NP jsou nové uhlíkaté částice mnoha tvarů s polygonální strukturou tvořenou výlučně 60 atomy uhlíku<sup>1, 15</sup>. Povrch těchto NP může být navíc díky četným spojům a velkému povrchu rozličně funkcionalizován pro lepší vazbu na cílové tkáně<sup>19</sup>. Nanotyče jsou jedny z nejvyužívanějších typů NP a to nejen kvůli jejich velké elektrické vodivosti, ale také díky jejich excelentní pevnosti<sup>25</sup>. Rozlišují se 2 třídy uhlíkatých nanotyčí: jednostěnné s průměrem 2 – 3 nm (single-walled carbon nanotubes, SWCNT)<sup>15, 19</sup> a mnohostěnné (multi-walled carbon nanotubes, MWCNT). MWCNT jsou větší než SWCNT a jsou složeny z mnoha jednostěnných nanotyčí vsazených jedna do druhé<sup>1, 19</sup>. Velký povrch uhlíkatých nanotyčí umožňuje jejich snadnou funkcionalizaci, která může být též vhodná pro dopravu terapeutických molekul<sup>2, 26</sup>. Tyto NP by mohly být potenciální léky budoucnosti pro léčbu neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova choroba anebo roztroušená skleróza<sup>27</sup>. Nepříznivý je však fakt, že u myši byly zjištěny neobvyklé zánětlivé odpovědi na SWCNT podávané v inhalované formě<sup>1, 26, 28, 29</sup>.

### Dendrimery

Hlavní třídou chemických polymerů jsou dendrimery (neboli „umělé proteiny“) tvořené z monomerních či oligomerních jednotek, které mohou být konjugovány s různými biofunkčními zbytky. Funkcionalizace může být provedena např. folátem za použití cDNA oligonuk-

leotidů k produkci shluku molekul cílených do nádorových buněk, které se vyznačují zvýšenou expresí vysokofinitního folátového receptoru. Další cílové molekuly, které byly v konjugaci s dendrimery s úspěchem použity, zahrnují např. hormon uvolňující lutropin (lutenizační hormon), thiamin, atd. Pokud jsou dendrimery (viz Obr. 2) funkcionalizovány činidly, která mají koncové skupiny hydrofilní (např. -COOH), je výsledný konjugát dobře rozpustný. Jedním z neznámějších víceúčelových dendrimerních prototypů je polyamidoamin používaný pro cílení, diagnostiku a řízené doručování protinádorových léků. Co se týká cytotoxicity, biokompatibility a biodistribuce dendrimerů, je nutný ještě rozsáhlý výzkum<sup>1</sup>. Kationické dendrimery působí s větší cytotoxicitou než anionické<sup>16</sup>.

### Quantum dots

Kvantové tečky (QD) jsou luminiscenční NP tvořené z polovodičových nanokrystalů<sup>19</sup> (viz Obr. 2) typicky používaných pro zobrazování v biologických systémech<sup>1, 13</sup>. Velikost a primární složení jádra a obalové schránky QD modifikuje jejich fotochemické vlastnosti<sup>19</sup>. Díky preciznímu designu lze připravit takové částice, které emitují fluorescenční záření v požadovaných oblastech světla<sup>1, 4, 13</sup>: oblast ultrafialového, přes oblast viditelného až po infračerveného světla (vlnové délky 400 – 4000 nm)<sup>4, 13</sup>. QD jsou složeny z anorganického jednoprvkového jádra<sup>13, 30</sup> – nejčastěji kadmia, selenu, telurů nebo rtuť<sup>13</sup>. Pro biologické aplikace je klíčové, aby jádra QD byla potažena dalšími materiály umožňujícími disperzi a zabraňujícími uvolňování těžkých kovů, které jsou toxické pro živé organismy<sup>31</sup>. Časté je také opatření QD vrchním pláštěm sulfidu zinečnatého, čímž je zvýšena jejich stabilita a také optické vlastnosti<sup>13</sup>. QD v konjugaci s různými peptidy jsou nejčastěji využívány pro *in vitro* a poměrně neinvazivní *in vivo* diagnostiku vaskulatury zdravých tkání anebo rakovinných buněk<sup>14</sup>. Do budoucna by také mohly být kvantové tečky použity pro *in vivo* vyhledávání metastatických rakovinných buněk<sup>13</sup>.

### Keramické nanočástice

Keramické NP jsou anorganické systémy (viz Obr. 2) s porézními rýsy<sup>1, 19</sup>, které se v současné době jeví jako velice vhodný dopravní prostředek pro doručování léčiv<sup>19</sup>. Tyto „nosiče“ jsou vysoce biokompatibilní a nejčastěji se tyto keramické NP skládají např. z oxidu křemičitého (SiO<sub>2</sub>)<sup>19, 26</sup>, oxidu titaničitého (TiO<sub>2</sub>) anebo oxidu hlinitého (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>1</sup>. Jádra keramických částic však nejsou limitována pouze na tyto materiály, mohou být konstruována také z kovů, oxidů kovů anebo sulfidů kovů. Tyto NP jsou relativně stabilní přes široký rozsah hodnot pH a teplot a v současné době jsou testována pro léčbu rakoviny<sup>1</sup>. Nicméně velice znepokojující je fakt, že tyto částice nejsou biodegradabilní, a tak mohou v těle díky své akumulaci způsobit nežádoucí účinky<sup>26</sup>.

### Kovové nanočástice

NP obsahující železo, popř. oxid železitý (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), mají obrovský potenciál pro biomedicínské aplikace,



včetně zobrazování nádorů a dopravy léků na místo účinku<sup>13, 22</sup>. Do této třídy kromě  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP patří také částice z  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ni}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{CuO}$ <sup>31</sup>, běžně o velikosti 15 – 60 nm<sup>19</sup>, 50 – 100 nm<sup>2</sup>, je zpravidla zahrnována celá řada superparamagnetických činidel, která bývají často potažena dextranem, fosfolipidy, PEG či jinými sloučeninami, kvůli zabránění agregace NP, potlačení jejich odstraňování buňkami a zvýšení jejich stability v organismu<sup>2, 19</sup>. Pomocí NP z  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  je možné např. ultrasensitivně detekovat PSA (prostatický specifický antigen) anebo pozměněné  $\beta$ -amyloidní peptidy, které jsou potenciálním markerem Alzheimerovy choroby<sup>32</sup>. Kovové NP jsou dále využívány pro pasivní anebo aktivní cílení léčiv do místa účinku<sup>22</sup>.

### Zlaté a stříbrné sférické nanočástice

Další kategorií tvoří lehce připravitelné sférické NP (10 – 300 nm) skládající se z dielektrického jádra (nejčastěji z oxidu křemičitého,  $\text{SiO}_2$ ) pokrytého tenkou vrstvou zlata<sup>14, 19, 31</sup>. Příprava zlatých NP (AuNP) je možná řadou způsobů: chemická redukce solí zlata ve vodném, organickém anebo jiném prostředí; popř. samoagregace. Nejvyužívanější je ale Faradayova metoda redukce chloridu zlata s citrátem sodným ve vodném prostředí v přítomnosti sulfidu uhličitého z roku 1857<sup>1</sup>. AuNP jsou jednou z nejslibnějších technologií pro léčbu a *in vitro* i *in vivo* diagnostiku rakoviny<sup>1, 25</sup>. Tyto částice mají velkou stabilitu, nízkou buněčnou toxicitu a velmi výhodné optické a chemické vlastnosti pro medicínské zobrazování a terapeutické aplikace<sup>2, 15, 19, 25</sup>. Absorpce zlatých NP o velikosti cca 110 nm v oblasti blízké infračervenému záření (NIR) je využíváno zejména při hypertermální terapii – po akumulaci NP v místě nádoru je pomocí zdroje (infračervená lampa, ultrazvuk, laser) lokálně zvýšena teplota nad 40 °C, což je výrazně méně tolerováno nádorovými buňkami než buňkami zdravými<sup>2, 4, 7, 14, 25, 31, 36</sup>. Stříbrné NP mají vyšší frekvenci plasmonové resonance než AuNP, ale princip působení je u obou stejný<sup>36, 37</sup>. Výhodou této metody je minimální invazivnost a dobrá přístupnost i k hluboko uloženým nádorům<sup>31, 38</sup>. Stříbrné NP ve formě dusičných solí jsou studovány jako antimikrobiální činidlo a jako sloučenina pro léčbu ran<sup>2, 39</sup>. Další možné použití AuNP (s názvem Auranofin) je při léčbě revmatoidní artritidy<sup>2, 38</sup>.

### Nanoprotilátky

Velice sofistikovaným přístupem je modifikace povrchu NP<sup>8</sup> (nejčastěji z Au, Ag, Ni, Pd, Pt)<sup>33</sup> monoklonální protilátkou s afinitou pro požadovaný cíl, nicméně tento přístup je limitován možnou nespecifickou vazbou protilátky a potenciální imunitní odpovědí hostitelské buňky. Pravděpodobnost interakce mezi NP a imunitním systémem (IS) může být částečně redukována použitím tzv. tajných technologií – pokrytí NP vrstvou thiolovaného polyethylenglykolu, což poskytuje NP požadovanou inertnost vůči IS. Nevýhodou této modifikace je ale snížení schopnosti specificky se vázat

na daný cíl. S úspěchem byla použita velká řada NP-protilátek směřovaných proti buněčně povrchových markerům, jakými jsou např. integriny<sup>20, 34</sup>.

### Toxicita nanočástic

Malá velikost, která činí NP tak atraktivní, může být důvodem jejich cytotoxicity. Jejich velký povrch způsobuje, že jsou tyto částice biologicky aktivnější, takže mohou zapříčinit zánět a stresové reakce<sup>4</sup>. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic – jako jejich velikost, povrchový náboj a hydrofilita, hrají roli v osudu částic *in vivo*. Stále je studována zbytková cytotoxicita, degradace a metabolismus některých NP (zejména QD) v těle a dosud je známo, že může docházet k akumulaci jejich nanokrystalů v ledvinách, játrech a slezině<sup>19</sup>. Zdali mohou či nemohou být tyto NP vyloučeny z těla, nebylo zatím prokázáno. Toxicita NP je velmi variabilní<sup>35</sup>. Při použití NP jako suspenze v kultivačním médiu byla prokázána jejich cytotoxicita ve všech provedených experimentech *in vitro*. Oproti tomu NP imobilizované ve vrstvě na kultivační misce nevykazovaly nanocytotoxicitu žádnou<sup>2</sup>.

Nejpřístupnějšími orgány pro NP v prostředí jimi znečištěném jsou plicе, kůže a krevní buňky. Pravděpodobný mechanismus, kterým NP působí cytotoxicky, je dán porušením intracelulárních metabolických drah, vznikem oxidačního stresu a fyzickým zničením buněčné membrány. Zajímavé je, že se NP mohou vyhnout běžné fagocytární obraně v respiračním systému a získat tak přístup do systematické cirkulace anebo dokonce do centrálního nervového systému (CNS). Jednou inhalované a usazené NP, mohou být přemístěny do mimoplicních prostor a zasáhnout tak pomocí různých mechanismů další cílové orgány<sup>2, 19</sup>. Bylo prokázáno, že ukládání NP v plicích se zvyšuje se snižující se velikostí částic a cytotoxicita inhalovaných nerozpustných nanomateriálů roste se zmenšující se velikostí a zvětšujícím se povrchem částic<sup>19, 29, 35</sup>. Řada NP může být zodpovědná za destruktivní zánětlivé procesy v plicích. Mechanismus působení NP zahrnuje jejich prostup přes epiteliální buňky respiračního traktu do mezibuněčného prostoru pomocí transcytózy a přímý vstup do krevního řečiště anebo lymfatickými cestami, obojí má za následek systematickou distribuci NP<sup>4</sup>. V nedávné době byla prokázána vysoká toxicita uhlíkatých NP, které způsobují v mozkových buňkách indukci lipidové peroxidace.

Než budou moci být NP rutinně používány jako próby pro diagnostické aplikace, je nutné dokončit výzkum v oblasti jejich potenciální cytotoxicity<sup>13</sup>. Nicméně pokroky v povrchovém inženýrství a konjugaci zajisté napomohou ve vývoji NP jako klinických činidel.

### Závěr

Začlenění NT, zejména nanomedicíny, do diagnostiky řady onemocnění a jejich léčby, rakoviny nevyjímaje<sup>7, 13</sup>, se stává rapidně se rozvíjejícím oborem, proto je nutné mu dobře porozumět. Vývoj nové nanorozměrové platformy v blízké době nabídne obrovský potenciál pro účinnější léčbu pacientů s rakovinou. Přestože vypadá,

že by *in vitro* nanodiagnostika mohla přinést mnoho úspěchů, čeká nás kvůli systémové cytotoxicitě NP ještě velmi dlouhá cesta k *in vivo* diagnostice. V současné době probíhají rozsáhlé výzkumné aktivity týkající se precizního, cíleného transportu látek na specifické místo účinku, což by mohlo mít ohromný klinický dopad na léčbu řady onemocnění. Budoucí výzkum v nanotechnologiích by mohl být spojen s dalším vývojem nových, vysoce účinných přístupů pro diagnostiku a léčbu rakoviny, protože manipulaci povrchové chemie NP lze nyní spojit zobrazování, cílení a terapeutické složky do jedné a té samé částice. Cílem je syntéza léků konjugovaných s dopravními prostředky šitými na míru pro dané onemocnění a daného pacienta, které by měly vysoký

účinek, ale minimální systémovou toxicitu<sup>12</sup>. Dále bude možno za pomoci nanostrukturních implantátů provádět jednodušeji kritické orgánové transplantace s nižším rizikem nekompatibility a následné rejekce štěpu<sup>39</sup>. Nanomedicínu činí přitažlivou především možnost mnoha aplikací, ne nadarmo je NM v současné době jednou z nejdiskutovanějších oblastí. Aplikace související s nanomedicínou jsou v současné době sice ve stadiu mohutně expandujícího vývoje, avšak bude ještě dlouhá a náročná cesta, než se NM stane životaschopným komerčním produktem. Už nyní je ale zřejmé, že léčba např. rakoviny bude pomocí nástrojů NM mnohem jednodušší a bezbolestná, což bude samo o sobě spásou pro miliony pacientů trpících touto obávanou chorobou.

## Literatura

1. Faraji AH, Wipf P: *Bioorg Med Chem* 17, 2950 (2009)
2. Murakami T, Tsuchida K: *Mini Rev Med Chem* 8, 175 (2008)
3. Paull R, Wolfe J, Hubert P, Sinkula M: *Nature Biotech* 21, 1144 (2003)
4. Riehemann K, Schneider SW, Luger AT, et al.: *Angew Chem Int Ed* 48, 872 (2009)
5. Whitesides G.: *Nature Biotech* 21, 1161 (2003)
6. Sarikaya M, Tamerler C, Jen AKY, et al.: *Nature Mat* 2, 577 (2003)
7. Gil PR, Parak JW: *ACS Nano* 2, 2200 (2008)
8. Qian X, Peng HX, Ansari DO, Goen et al.: *Nature Biotech* 26, 83 (2008)
9. Jun Y, Huh MY, Choi J, Lee et al.: *J Am Chem Soc* 127, 5732 (2005)
10. Merkle CR: *Nanotech.* 17:271-274 (1999)
11. Goya FG, Grazú MR, et al.: *Curr Nanosec* 4, 1 (2008)
12. Jain KK: *TREND Biotech* 24, 143 (2006)
13. Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M: *Int J Cancer* 120, 2527 (2007)
14. Fortina P, Kricka JL, Graves DJ, et al.: *TREND Biotech* 25, 145 (2007)
15. Wagner V, Dullaart A, Bock AK, et al.: *Nature Biotech* 24, 1211 (2006)
16. McNeil ES: *J Leuk Biol* 78, 585 (2005)
17. Hilger I, Hergt R, Kaiser AW: *IEE Proc Nanobiotechnol* 152, 33 (2005)
18. Neouze AM, Schubert U: *Monatsh Chem* 139, 183 (2008)
19. Medina C, Santos-Martinez JM, Corrigan IO, et al.: *Br J Pharm* 150, 552 (2007)
20. Fuchs H, Bachran C: *Curr Drug Target* 10, 1 (2009)
21. Jain KR, Booth FM: *J Clin Invest* 112, 1134 (2003)
22. Polyak B, Friedman G: *Expert Opin Drug Deliv* 6, 53 (2009)
23. Ye Z, Mahato IR: *Nanomedicine* 3, 5 (2008)
24. Gulloti E, Yeo Y: *Mol Pharm* accepted 2009
25. Pissuwan D, Valenzuela MS, Cortie BM: *TREND Biotech* 24, 62 (2006)
26. Son JS, Bai X, Lee BS: *Drug Disc* 12, 650 (2007)
27. Pearce EM, Melanko BJ, Salem AK: *Pharm Res* 24, 2335 (2007)
28. Kostarelos K: *Nature Biotech* 26, 774 (2008)
29. Hussain AM, Kabir AM, Sood AK: *Curr Sci* 96, 664 (2009).
30. Fortina P, Kricka JL, Surrey S, et al.: *TREND Biotech* 23, 168 (2005)
31. Son JS, Bai X, Lee BS: *Drug Disc* 12, 657 (2007)
32. Scarberry EK, Dickerson BE, McDonald FJ, et al.: *J Am Chem Soc* accepted (2009)
33. Liao H, Hafner JH: *Chem Mater* 17, 4636 (2005)
34. Das M, Mohanty C, Sahoo KS: *Expert Opin Drug Deliv* 6, 285 (2009)
35. Sung CJ, Pulliam BL, Edwards AD: *TREND Biotech* 25, 563 (2007)
36. Huang X, Jain KP, El-Sayed IH, et al.: *Lasers Med Sci* 23, 217 (2008)
37. Taton AT: *TREND Biotech* 20, 277 (2002)
38. Frank CS: *Chem Rev* 99, 2589 (1999)
39. Engel E, Michiardi A, Navarro M, et al.: *TREND Biotech* 26, 39 (2007)

Poděkování podpoře vnitřních grantů VŠCHT 126 08 9005 a 320 08 9033.

## Souhrn

### Rimpelová S.: Nanočástice v nanomedicině a jejich potencionální toxicita

Nanomedicina je definována jako aplikace technologií odehrávajících se v rozměrech nanometrů do praktické medicíny. Je používána pro diagnostiku, prevenci a léčbu nemocí a pro objasnění průběhu různých onemocnění. V praxi se používají různé typy nanočástic. Pro širší aplikaci nanočástic *in vivo* však zbývá vyřešit ještě řadu problémů.

**Klíčová slova:** nanočástice, nanotechnologie, toxicita

## Summary

### Rimpelová S.: Nanoparticles in nanomedicine and their potential toxicity

Nanomedicine is defined as application of technologies using particles of nanometre size in practical medicine. It is used for diagnosis, prevention and treatment of illnesses and elucidation of their course and origine. Many different types of nanoparticles are applied in practice. Wider application on nanoparticles *in vivo* will depend on successful solution of several problems.

**Key words:** nanoparticle, nanotechnology, toxicity

## O B S A H

Káš J.: <b>Úvodem</b>	53
Paulová L.: <b>14. Evropský biotechnologický kongres</b>	54
Havlíková J.: <b>Tkáňové inženýrství</b>	55
Volejníková A.: <b>Senescence a možnosti její regulace u rostlin</b>	57
Junková V.: <b>Lipidomika</b>	63
Jurga V.: <b>Využití biomasy v energetice</b>	67
Rimpelová S.: <b>Nanočástice v medicíně a jejich potencionální toxicita</b>	71

## C O N T E N T S

Káš J.: <b>Editorial</b>	53
Paulová L.: <b>The 14th European Congress on Biotechnology</b>	54
Havlíková J.: <b>Tissue engineering</b>	55
Volejníková A.: <b>Senescence and means of its regulation in plants</b>	57
Junková V.: <b>Lipidomics</b>	63
Jurga V.: <b>Exploitation of biomass in the energetics</b>	67
Rimpelová S.: <b>Nanoparticles in nanomedicine and their potential toxicity</b>	71

## POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,

aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem. Na konci článku uveďte **krátký souhrn** a klíčová slova. A to česky a **anglicky**.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ**, nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. **Nepoužívejte** automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. **CITACE** v textu uvádějte pouze číselným odkazem. Rozsah seznamu literatury nesmí být disproportní k rozsahu článku. Citace ve zkrácené formě **bez názvu práce**, pouze první 3 autory + et al., časopis oficiální zkratkou a Volume, 1. strana (Rok).  
Např. Heath WR, Galli C, Smith JS, et al.: Appl Environ Microbiol 71, 182 (2005).
5. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
6. Připojte vždy svůj e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji

P. Lipovová

**BIOTECHNOLOGICKÁ  
SPOLEČNOST**  
166 28 Praha 6, Technická 3

**ISSN 1210-1737**

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994