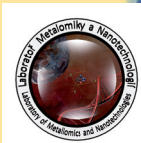
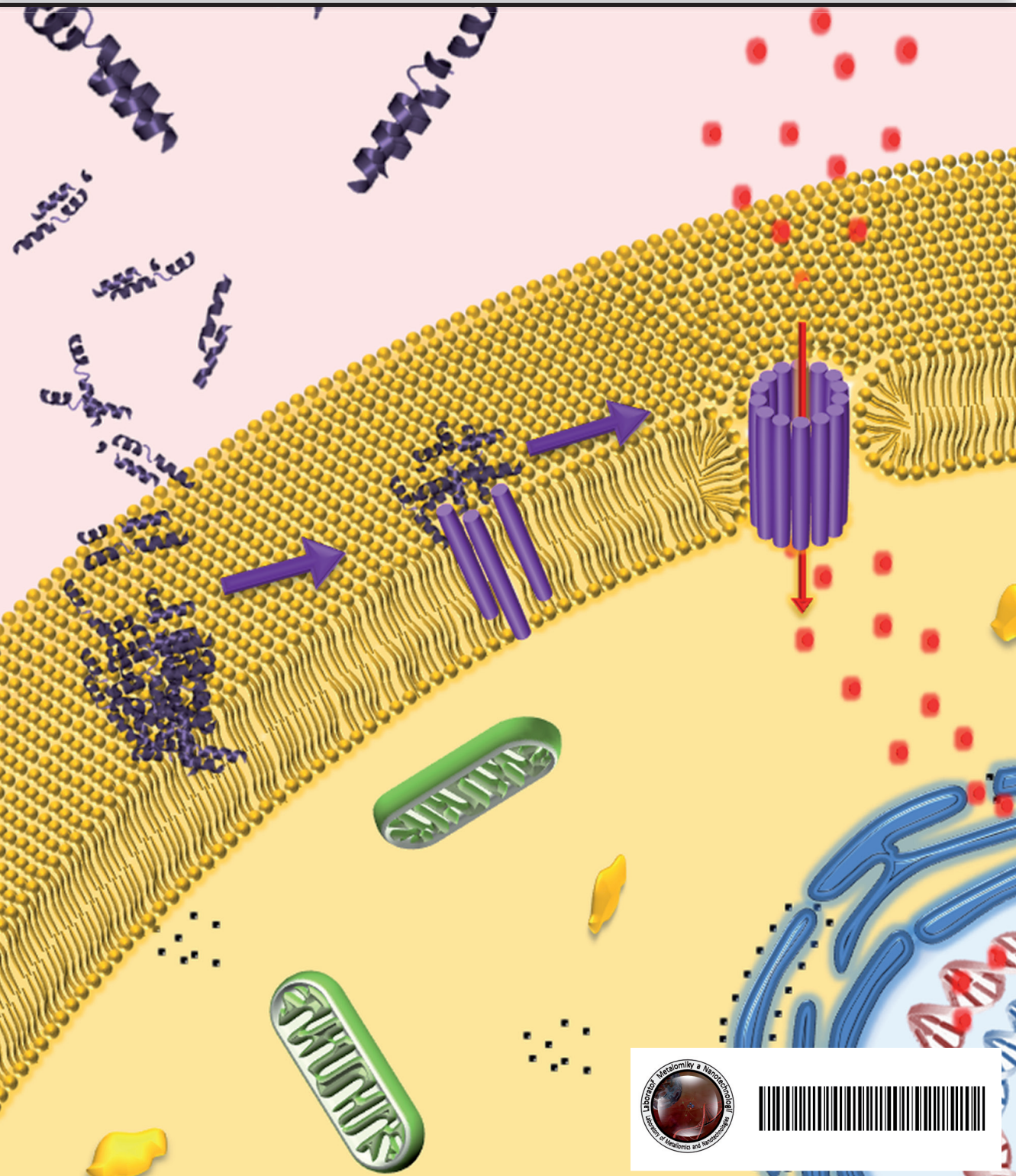


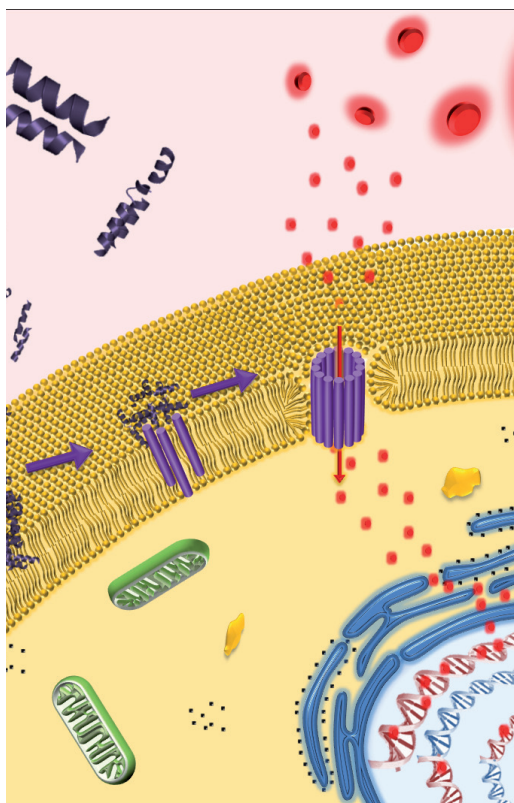
červenec 2014

Journal of Metallomics and Nanotechnologies

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano

volume 1 issue 2





Druhé číslo vychází v průběhu července 2014. Časopis Journal of Metallomics and Nanotechnologies vychází pouze elektronicky, čtvrtletně. Jeho obsahové zaměření je v oblasti nano-biochemie, nanotechnologie, biomedicína a nanomedicína. Časopis vychází bez regionálních mutací v českém, slovenském a anglickém jazyce. Vydavatel: Laboratoř metalomiky a nanotechnologií Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Česká republika.

Časopis Journal of Metallomics and Nanotechnologies je novým výukovým a především vědeckým časopisem, který sdružuje nově vznikající vědecký směr Metalomiku a stále více se rozvíjející Nanotechnologie. Tento časopis je volně přístupný a šířitelný skrze své webové stránky s minimální podporou reklamy. Cílem redakce je aby články vycházející v každém ze čtyř ročních čísel obsahovaly tematiku využití jakýchkoliv technologií v měřítku nanometrů pro účely biologického, chemického či biotechnologického výzkumu anebo přímo konkrétních nanobiotechnologických aplikací.

Na obálce

Antimikrobiální peptidy vykazují schopnost narušení buněčné membrány tvorbou pórů. Jedním ze způsobů, jak k tvorbě pórů dochází, je model „sudové skruže“, kdy vznikne pór v membráně ohraničený antimikrobiálními peptidy. Tento účinek antimikrobiálních peptidů může být specifický pro nádorové buňky, čehož lze využít pro cílený transport chemoterapeutik jako je doxorubicin.



Časopis je volně šířitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Journal of Metallomics and Nanotechnologies

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, **Vedoucí editor:** Ondřej Zítka, Vydání: první 2014, **Počet stran:** 92, Vychází elektronicky, ISSN 2336-3940

Ondřej Zítka^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Vážení čtenáři,

druhé číslo našeho časopisu je věnováno nejen příspěvkům odborné práce studentů, ale také pracovníků působících v Laboratoři metalomiky a nanotechnologií. V první části druhého čísla prvního vydání je věnován prostor vybraným postgraduálním studentům, kteří připravili souhrnné publikace na téma související s jejich disertačními pracemi. Uveřejněné výstupy se týkají přímo problematiky, kterou studenti během doktorandské práce řeší. Mají při tom za cíl v rámci své disertační práce připravit několik impaktovaných publikací, na dané téma. Tato témata se pohybují napříč oblastí molekulárně biologických a nanobiotechnologických aplikací.

Dále je v tomto čísle věnován prostor krátkým souhrnným článkům pregraduálních studentů, kteří v Laboratoři metalomiky a nanotechnologií uskutečnili samostatný studentský projekt v rámci plnění cílů evropského výzkumného centra SIX. Tito studenti měli za úkol se během semestru a dalších 14ti dnů intenzivní stáže seznámit s danou metodickou problematikou, která je vázána na využívání infrastruktury výzkumného centra SIX.

V poslední, třetí části tohoto čísla je věnována pozornost akci „Světový den proti rakovině“ (World Cancer Day - WCD) do které se každoročně Laboratoř metalomiky a nanotechnologií aktivně zapojuje organizací sérií přednášek.

Téma letošní série bylo „Rakovina a možnosti nanotechnologií“. Abstrakty k těmto přednáškám jsou vázány především na aktivity Ligy proti rakovině Praha.

Editorial Board of the Journal of Metallomics and Nanotechnologies:

Chief Editor: Ondrej Zitka, Mendel University in Brno, Czech Republic

Assistant Manager Editor: Michal Horak, Mendel University in Brno, Czech Republic

Assistant Manager Editor: Sylvie Skalickova, Mendel University in Brno, Czech Republic

Expert editorial board:

David Hynek, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Gabriella Emri, University of Debrecen, Hungary

Jan Labuda, Slovak Technical University in Bratislava, Slovakia

Jaromir Hubalek, University of Technology in Brno, Czech Republic

Jitka Petrlova, Lund University, Sweden

Libuse Trnkova, Masaryk University, Czech Republic

Marie Konecna, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Marie Stiborova, Charles University in Prague, Czech Republic

Marketa Vaculovicova, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Marta Zalewska, Wroclaw Medical University, Poland

Michal Masarik, Masaryk University, Czech Republic

Milan Antonijevic, University of Belgrade, Serbia

Miroslav Pohanka, University of Defence, Czech Republic

Naser A. Anjum, University of Aveiro, Portugal

Pavel Kopel, Mendel University in Brno, Czech Republic

Rene Kizek, Mendel University in Brno, Czech Republic

Tomas Eckschlager, Charles University in Prague, Czech Republic

Vojtech Adam, Mendel University in Brno, Czech Republic

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Open Access content means the content is free of cost, and no restrictions are applied on its Licensing and Copyrights. Open Access Journals provide free of charge scholarly content. The literature is available for reading, downloading, and editing. The benefit of open access is that the content can be reused for a novel cause/research/experiment.

Review

Studium interakce receptoru pro hemaglutinin.....	6
Nanopóry jako moderní nástroj pro DNA sekvenování.....	10
Účinky antimikrobiálních peptidů.....	15
Antivirové peptidy a jejich využití pro léčbu chřipky.....	20
Use of mass spectrometry technique (MALDI-TOF/TOF) for the characterization of metallothionein in biological systems.....	25
Magnetizovatelné mikro a nanočástice pro barkódování unikátních sekvencí.....	32
Doxorubicin: pomoc i hrozba v léčbě rakoviny.....	39
Rizika spojená s expozicí estrogenům a sloučeninám s estrogení aktivitou a možnosti jejich eliminace z vodního prostředí.....	44

Review

Zapojení pregraduálních studentů do řešení výzkumných aktivit centra SIX.....	52
Elektrochemická studie flavonoidů ve víně.....	53
Elektrochemická analýza resveratrolu ve víně.....	57
Optimalizace multiplex PCR.....	60
Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS.....	64
Studium vlivu neplatinyových cytostatik na polymerázovou řetězovou reakci.....	67

Scientific abstract

Rakovina a možnosti nanotechnologií.....	70
Viruses and cancer: papilloma, hepatitis, epstein-barr and rous-sarcoma virus.....	71
Antisens oligonukleotidy jako nástroj pro boj s nádorovými onemocněními.....	73
Apoferitinový transportér léčiv.....	75
Separční techniky ve výzkumu rakoviny.....	77
Carbon nanotubes as etoposide nanocarrier.....	79
Fluorescence imaging of quantum dots systems.....	81
Metallothionein jako prognostický nádorový marker.....	83
Úvod k diagnostickým možnostem nádorových onemocnění.....	85

Laboratory reports

Zapojení Laboratoře metalomiky a nanotechnologií do celonárodní sbírky Ligy proti rakovině Praha.....	87
Doxorubicin: pomoc i hrozba v léčbě rakoviny.....	18
Antivirové peptidy a jejich využití pro léčbu chřipky.....	22
Účinky antimikrobiálních peptidů.....	26
Magnetizovatelné mikro a nanočástice pro barkódování unikátních sekvencí.....	31
Studium interakce receptoru pro hemaglutinin.....	36

Studium interakce receptoru pro hemagglutinin

Petr Michálek^a, Ondřej Zítka^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Study of interaction of the receptor for the hemagglutinin.

Influenza viruses compared to other viruses are characterized by considerable genetic variability. From the view of the ability of the virus to infect the host cell the determining factor is the structure of the surface antigens of the virus and the host cell receptor structure. To change the preferential binding of the virus to various cell receptors just one amino acid substitution in the primary structure of hemagglutinin is enough. The cause of this change in the antigenic properties is either the antigenic shift or antigenic drift. Thereby, new influenza strains with new antigenic type can develop very quickly and a human population is not capable to immunologically distinguished it with sufficient speed. Yet widely used drugs are increasingly perceived as controversial, due to their declining benefits and vice versa to growing negative effects. And despite considerable progress in the research of influenza viruses and their receptors at the molecular and structural level no sufficiently effective alternative has not been introduced yet.

Přijato k publikování: 13. 5. 2014

Klíčová slova: hemagglutinin; chřipka; léčba; sialová kyselina;

Úvod

Pandemie chřipky H1N1 v roce 1918 měla celosvětově za následek více než 50 milionů úmrtí, obdobně i chřipka H5N1 vyniká mezi ostatními typy chřipky značnou virulencí pro člověka. I přes narůstající počty očkovaných v populaci a účinnější léčbu, je sezónní chřipka stále zodpovědná za více než 250000 úmrtí ročně a desítky milionů onemocnění dýchacích cest po celém světě^{1,3}. Písmena H a N v názvech chřipky odkazují na subtypy glykoproteinu hemagglutininu a neuraminidázy, které jsou přítomny na povrchu viru chřipky (RNA virus z čeledi *Orthomyxoviridae*)⁴. Hemagglutinin může být rozdělen do dvou fylogeneticky rozdílných skupin: H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16 a H3, H4, H7, H10, H14, H15⁵. Všechny tyto subtypy jsou přenosné mezi ptáky. Člověk je vnímavý pouze ke třem subtypům: H1, H2 a H3⁶. Hemagglutinin umožňuje viru proniknout do lidské epiteliální buňky plic vazbou na glykoproteiny obsahující kyselinu sialovou. Nízké pH prostředí indukuje konformační změnu hemagglutininu a umožňuje vazbu k endoso-

mální stěně a uvolnění virové RNA do buňky⁷. Neuraminidáza odštěpuje kyselinu sialovou od nově vznikajících virionů a buněčných glykokonjugátů na povrchu virionů a zajišťuje tak uvolnění nově vytvořených virionů z infikované buňky⁵.

Struktura a funkce hemagglutininu

Hemagglutinin je homotrimer, jehož každý monomer je syntetizován jako samostatný polypeptid (HA0), ze kterého vzniknou po proteolytickém štěpení dvě podjednotky (HA1, HA2)^{8,9}. HA1 je s HA2 propojen dvěma intramonomerními disulfidickými můstky vytvořenými během skládání HA0 v endoplazmatickém retikulu¹⁰. Rozštěpení prekurzoru je zásadní nejen pro aktivaci procesu fúze membrán, ale i pro infekčnost virové částice¹¹. Po rozštěpení proteázou se HA struktury zkombinují za vzniku metastabilního trimeru ve tvaru houby. Tato forma hemagglutininu má dvě oblasti: kulovitou část tvořenou z antiparalelních β -listů a oblast kmene složenou ze tří α -šroubovic, tvořících spirálu¹². Globulární část, neboli receptor váza-

jící oblast (HA1), obsahuje receptory vázající se ke kyselině sialové, které umožňují vazbu viru na kyselinu sialovou na povrchu epiteliálních buněk dýchacích cest⁷. K fúzi membrán dochází v endosomech při kyselém pH, které indukuje nevratnou reorganizaci HA struktury¹³.

Patogenita

Schopnost vyvolat pandemii celosvětového významu mají jen některé subtypy chřipky typu A. Převážná část kmenů patří mezi sezónní a většina z nich nevykazuje vysokou virulenci. Patogenita viru je dána mnoha faktory. Jedním z faktorů, které ovlivňují schopnost viru vyvolat onemocnění, je proteázová aktivita. Většina kmenů chřipky obsahují pouze arginin jako spojení mezi HA1 a HA2 a proteázy, které mohou tuto vazbu rozštěpit, jsou vytvářeny pouze v plicním sputu¹¹. Nicméně, mnoho vysoce patogenních kmenů obsahuje v této struktuře další aminokyseliny, které mohou být aktivovány proteázami, které nejsou specifické pro dýchací cesty (např. furinové proteázy). V důsledku toho se mohou tyto vysoce patogenní kmeny šířit po celém těle¹⁴.

Druhým faktorem je specifita sialové kyseliny receptorů pro daný subtyp hemagglutininu. Hemagglutinin rozpoznává glykany buněčných receptorů obsahující kyselinu sialovou. Způsob, jakým je terminální kyselina sialová vázána ke galaktose určuje druhovou preferenci viru. Posun ve specifitě hemagglutininu je pro virus chřipky zásadním krokem při překonávání mezidruhových bariér a adaptaci na nový druh hostitele. Například při adaptaci ptačí formy viru na lidskou se mění specifita hemagglutininu k typu vazby, jakým je kyselina sialová vázána, z α -2,3 na α -2,6^{9,15}. Pokud se jedná o možný přenos infekce z ptáků na lidskou populaci, jeví se jako předním uchazečem o roli mezihostitele pro přeskupení chřipkových virů A prase. Je totiž jediným druhem savců, který umožňuje produktivní replikaci ptačích a lidských chřipkových virů v důsledku přítomnosti receptorů pro oba typy virů (α -2,3 a α -2,6). To může vést k modifikaci receptoru virů ptačí chřipky z α -2,3 na α -2,6 vazby, čímž nabízí potenciální prostor pro přenos mezi ptákem a člověkem¹⁶. Jak ukazují některé studie¹⁷⁻¹⁹, ke změně pre-

ferenční vazby sialové kyseliny stačí záměna v jedné aminokyselině v primární struktuře hemagglutininu.

Virus chřipky má pozoruhodnou schopnost uniknout obranným mechanismům hostitele tím, že mění svůj antigenní charakter, zejména prostřednictvím změny aminokyselinových zbytků v hemagglutininu, který hraje zásadní roli ve vazbě k receptoru hostitelské buňky. Tato vlastnost, označovaná jako antigenní drift, je způsobena postupným hromaděním drobných mutací, obvykle charakteru nukleotidových substitucí, ve virovém genomu, které vyústí ve změnu v antigenním místě. Oproti tomu antigenní shift se vyznačuje vznikem zcela nového subtypu, disponujícím buď novým subtypem samotného hemagglutininu nebo novým subtypem hemagglutininu i neuraminidázy. Takto vzniklý nový virus je antigenně odlišný od dříve se vyskytujících chřipkových virů v lidské populaci^{20,21}.

Léčba

Aktuálně je na trhu několik typů antivirotik s účinností proti chřipkovému viru. Prvním typem jsou antivirotika blokující M2 protein, mezi které patří amantadin a rimantadin, působící na chřipku typu A. Druhým jsou inhibitory neuraminidázy, kam patří oseltamivir a zanamivir, které jsou účinné na typy A i B. Obdobně jako u antibiotické léčby mají i virostatika paletu nežádoucích účinků a i zde je značné riziko vzniku rezistence^{23,24}. Tato fakta podporují potřebu vyvinout nové antivirové léky cílené na jiná místa. Povrchové virové antigeny, podílející se na vstupu do buňky, jsou atraktivním cílem, protože jsou nezbytné jak pro vstup virové bílkoviny do buňky, tak z důvodu nutnosti jejich konformačních změn, které zajišťují jejich funkčnost a virulenci²⁵.

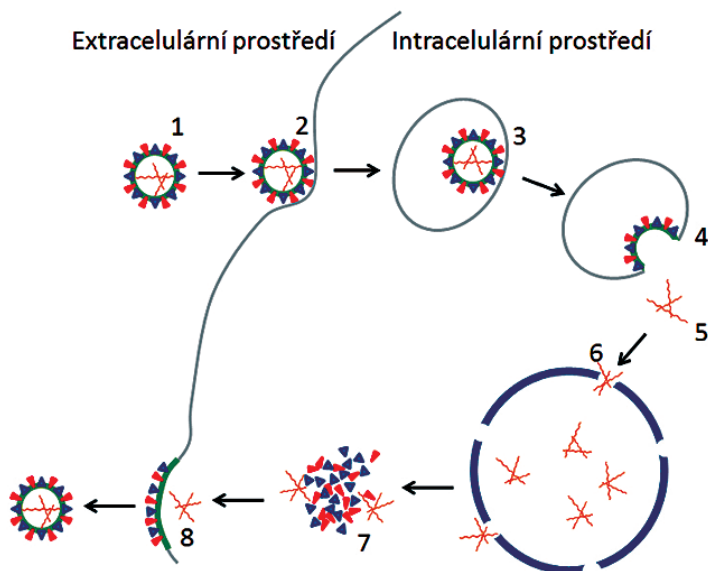
Peptidová terapie

Jedním z mechanismů účinku peptidů na virovou částici je ovlivnění pomocí sialovou kyselinu mimikujícího peptidu, který se váže na HA1 a HA3, a funguje tak jako inhibitor vazby hemagglutininu k cílové buňce²⁶. Obdobným mechanismem patrně fungují i deriváty antivirových peptidů (AVPs),

získané z podjednotek HA1 a HA2²⁷ a FluPep²⁸. Také Entry blocker (EB), peptid o 20 aminokyselinách, odvozený ze signální sekvence fibroblastového růstového faktoru, inhibuje vazbu viru na buněčné receptory tím, že se specificky váže na hemaglutinin²⁸. Dalším mechanismem účinku je inhibice hydrolyzy HAO na HA1 a HA2, kdy toto rozštěpení umožňuje fi viru a hostitelské buňky²⁶. Pokud tedy HAO není štěpen za vzniku HA1 a HA2, nemůže dojít k fúzi. Proto chřipkové viry s nerozštěpeným HAO nemohou vyvolat infekci. Mezi molekuly s tímto účinkem patří inhibitory proteáz^{29,30}, derivát lyzinu aminokapronová kyselina³¹ a lipoproteinový komplex plicního surfaktantu³².

Antisense terapie

Peptidem modifikované morfolino oligomery (PPMO) tvoří jednovláčkovou DNA antisense sekvenci, která snadno vstupuje do buněk a je schopna stericky blokovat cRNA^{33,34}. Použití některých z účinných PPMO vedlo k výraznému snížení hladiny mRNA, cRNA a vRNA v napadených buňkách. PPMO tvoří obvykle 20-25bp velké molekuly a jejich vstup do buněk je možno zefektivnit konjugací s peptidy bohatými na arginin (ARP), bez nutnosti dalších transfekčních metod a manipulací. Tyto konjugáty CPP-PMO (PPMO) jsou ve vodě rozpustné a v buňkách a v lidském séru stabilní po dobu několika hodin³⁵.



Virus chřipky (1) se váže (2) na kyselinu silovou v glycoalyx plazmatické membrány. Vázaný virus je následně endocytován (3). Hemaglutinin je barevně označen červeně; neuraminidáza modře. Iontové kanály a lipidy virové obálky jsou označeny zeleně. V průběhu zrání endozomu klesá jeho pH a je zahájeno spojení (4) virové obálky (zelená) s endosomální membránou (šedá) a uvolnění virové RNA (5) (oranžová) a virových proteinů do cytosolu. Virová RNA vstupuje (6) do jádra, kde probíhá replikace. Nově vytvořená virová RNA (7) je exportována do cytosolu a společně se strukturálními proteiny vytváří (8) nové viriony (Obr. 1).

Závěr

Viry chřipky se vyznačují oproti ostatním virům značnou proměnlivostí genetické informace. Z hlediska schopnosti viru infikovat hostitelskou buňku je determinujícím činitelem struktura povrchových antigenů viru a struktura receptoru hostitelské buňky. Pro změnu preferenční vazby viru na různé receptory buňky stačí záměna v jedné aminokyselině v primární struktuře

hemaglutininu. Příčinou změny antigenních vlastností je buď antigenní zvrát nebo antigenní posun. Vznikají tak nové kmeny chřipky s novým antigenním typem, který není lidská populace s dostatečnou rychlostí schopna imunologicky rozeznat. Dosud používaná léčiva jsou stále více vnímána jako kontroverzní, vzhledem k jejich snižujícím se benefitům a naopak rostoucím negativním vlivům. A i přes značný pokrok ve výzkumu chřipkových virů a jejich receptorů na molekulární a strukturální úrovni, nebyla dosud představena dostatečně efektivní alternativa.

Tato práce byla financována z projektu PGS23_2013

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Johnson N., Mueller J.: *Bulletin of the History of Medicine*, 76, 105 (2002).
- Ginsberg J., Mohebbi M. H., Patel R. S., Brammer L., Smolinski M. S., Brilliant L.: *Nature*, 457, 1012 (2009).
- Basler C. F., Aguilar P. V.: *Antiviral Research*, 79, 166 (2008).
- Wilson D. C., Skehel J. J.: *Annual Review of Biochemistry*, 56, 365 (1987).
- Russell R. J., Kerry P. S., Stevens D. J., Steinhauer D. A., Martin S. R., Gamblin S. J., Skehel J. J.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 17736 (2008).
- Gamblin S. J., Haire L. F., Russell R. J., Stevens D. J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D. A., Daniels R. S., Elliot A., Wiley D. C., Skehel J. J.: *Science*, 303, 1838 (2004).
- Madhusoodanan M., Lazaridis T.: *Biophysical Journal*, 84, 1926 (2003).
- Skehel J. J., Wiley D. C.: *Annual Review of Biochemistry*, 69, 531 (2000).
- Stevens J., Blixt O., Tumpey T. M., Taubenberger J. K., Paulson J. C., Wilson I. A.: *Science*, 312, 404 (2006).
- Isin B., Doruker P., Bahar I.: *Biophysical Journal*, 82, 569 (2002).
- Garten W., Klenk H. D.: *Trends in Microbiology*, 7, 99 (1999).
- Gamblin S. J., Skehel J. J.: *Journal of Biological Chemistry*, 285, 28403 (2010).
- Bullough P. A., Hughson F. M., Skehel J. J., Wiley D. C.: *Nature*, 371, 37 (1994).
- Walker J. A., Molloy S. S., Thomas G., Sakaguchi T., Yoshida T., Chambers T. M., Kawaoka Y.: *Journal of Virology*, 68, 1213 (1994).
- van Riel D., Munster V. J., de Wit E., Rimmelzwaan G. F., Fouchier R. A. M., Osterhaus A., Kuiken T.: *Science*, 312, 399 (2006).
- Brown I. H.: *Options for the Control of Influenza Iv*, 1219, 173 (2001).
- Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M. R., Donatelli I., Kawaoka Y.: *Journal of Virology*, 74, 8502 (2000).
- Glaser L., Stevens J., Zamarin D., Wilson I. A., Garcia-Sastre A., Tumpey T. M., Basler C. F., Taubenberger J. K., Palese P.: *Journal of Virology*, 79, 11533 (2005).
- Rogers G. N., Paulson J. C., Daniels R. S., Skehel J. J., Wilson I. A., Wiley D. C.: *Nature*, 304, 76 (1983).
- Chen J. Z., Deng Y. M.: *Virology Journal*, 6, (2009).
- Carrat F., Flahault A.: *Vaccine*, 25, 6852 (2007).
- Hamilton B. S., Whittaker G. R., Daniel S.: *Viruses-Basel*, 4, 1144 (2012).
- Ilyushina N. A., Govorkova E. A., Webster R. G.: *Virology*, 341, 102 (2005).
- Lackenby A., Thompson C. I., Democratis J.: *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21, 626 (2008).
- Torres J., et al.: *Bioinformatics*, 8, 870 (2012).
- Yang J., Li M. M., Shen X. T., Liu S. W.: *Viruses-Basel*, 5, 352 (2013).
- Lopez-Martinez R., Ramirez-Salinas G. L., Correa-Basurto J., Barron B. L.: *Plos One*, 8, (2013).
- Jones J. C., Turpin E. A., Bultmann H., Brandt C. R., Schultz-Cherry S.: *Journal of Virology*, 80, 11960 (2006).
- Beppu Y., Imamura Y., Tashiro M., Towatari T., Ariga H., Kido H.: *Journal of Biochemistry*, 121, 309 (1997).
- Zhirnov O. P., Ovcharenko A. V., Bukrinskaya A. G.: *Journal of General Virology*, 65, 191 (1984).
- Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A., Katunuma N.: *Journal of Biological Chemistry*, 267, 13573 (1992).
- Kido H., Sakai K., Kishino Y., Tashiro M.: *Febs Letters*, 322, 115 (1993).
- Bottcher-Friebertshausen E., Stein D. A., Klenk H. D., Garten W.: *Journal of Virology*, 85, 1554 (2011).
- Lupfer C., Stein D. A., Mourich D. V., Tepper S. E., Iversen P. L., Pastey M.: *Archives of Virology*, 153, 929 (2008).
- Gabriel G., Nordmann A., Stein D. A., Iversen P. L., Klenk H. D.: *Journal of General Virology*, 89, 939 (2008).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Nanopóry jako moderní nástroj pro DNA sekvenování

Jiří Kudr^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Nanopores as a modern tool for DNA sequencing

A nanopore-based devices are extremely sensitive analytical techniques, which uses the electrophoretic translocation of molecules in solution through a nano-scale pores. The nanopores, which mimic the functions of natural ion channels, seems to be the promising tool for future fast and low-cost DNA sequencing. However, some difficulties in generating usable sequence data have to be solved. In this article the nanopores were reviewed. In the first part the development of nanopore technique was described and the ubiquitous presence of nanopores in living cells was highlighted. Next, the most important part of the principles of nanopore analysis was described, and the knowledges about biological and solid-state nanopores were summarized. Also the pros and cons of both kinds of nanopores and different approaches designed to circumvent the issues were mentioned.

Přijato k publikování: 14. 5. 2014

Klíčová slova: DNA sekvenování; hemolysin; lipidy; nanopóry;

Úvod

Iontové kanály selektivně regulující transport biomolekul, iontů, protonů i elektronů jsou nezbytné pro téměř všechny buněčné procesy. Tyto procesy se staly inspirací pro moderní a rychle se rozvíjející obor nanopórových analýz. Elektroforetická translokace analytu přes pór o rozměrech v řádu nanometrů (nanopór) a kontinuální měření změn elektrického proudu procházejícího nanopórem v důsledku průchodu analyzovaných molekul je využívána k analýzám proteinů i syntetických nanomateriálů. Hlavním směrem vývoje současných nanopórových technologií je sekvenování DNA. Nanopóry, které by bez potřeby amplifikace a značení umožnily po izolaci levně a rychle sekvenovat dlouhé úseky DNA jsou objektem velkého zájmu a výzvou pro současnou vědu.

Vznik techniky

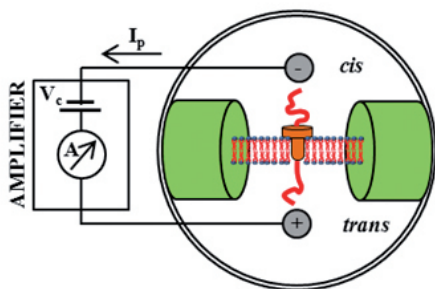
Na konci 40. let použil Wallace H. Coulter cellofán z krabičky od cigaret perforovaný horkou jehlou k tvorbě přístroje schopného počítat buňky¹. Coulterův čítač, pracující na principu detekce odporových pulsů, se později stal

základním nástrojem hematologie. Snížení rozměru perforace do sub-mikrometrových jednotek na konci 70. let umožnilo stejným způsobem detekovat i několika nanometrové částice virů². Ačkoliv se obecně předpokládá, že mechanismus použitý v Coulterově čítači byl inspirací pro nanopórové technologie a ačkoliv princip jeho fungování je stejný³, ve skutečnosti jí byly čistě biologické procesy. Transmembránové póry o rozměrech několika nanometrů (nanopóry) se nachází v každé živé buňce. Patří k nim například draslíkové kanály hERG, které selektivně propouští ionty do buněk a udržují tak v normálu elektrickou aktivitu v srdečních myocytech⁴. Komplexy jaderných pórů (nuclear pore complex) zajišťují přenos proteinů a nukleových kyselin mezi cytosolem a jádrem⁵. Proteiny tvořící nanopór u bakteriofága phi29 spojují kapsidu a krček⁶. Virová nukleová kyselina tímto útvarem (tzv. portal vertexem) prochází do prokapsidy při maturaci viru i opouští virus při infekci buňky. Zatímco většina uvedených transportních mechanismů je závislá na napětí a způsobuje tedy pouze dočasnou průchodnost nanopórů,

bakterie produkují toxiny schopné tvořit trvale průchodné póry v lipidových membránách⁷. S vědomím ubikvitní přítomnosti proteinových nanopórů a jejich funkcí v buňkách předpokládali David W. Deamer (University of California) a George Church (Harvard University), že pokud by byla molekula DNA nebo RNA elektroforeticky protáhnutá pórem vhodného průměru, mohly by jednotlivé nukleobáze modulovat proud procházející pórem⁸. Využití nanopórů v oblasti DNA sekvenování bylo patentováno v roce 1998⁹.

Princip fungování

Měření proudu iontů procházejících kanály v biomembránách nebo v umělých lipidových vrstvách je dnes v neurobiologii a biofyzice běžnou praxí^{10,11}. Ať již proteinový nanopór (biopór) vložený v lipidové membráně nebo nanopór uměle vytvořený v pevném, elektricky izolačním materiálu odděluje dvě komory vyplněné elektrolytem. Aplikace napětí mezi komory způsobí průchod iontů elektrolytu pórem. V případě otevřeného a neblokovaného nanopóru je detekován konstantní stejnosměrný proud, který je použit jako reference. V případě přítomnosti elektricky nabitého analytu v elektrolytu je analyt přitahován k elektrodě o opačném náboji, než je celkový náboj molekuly. Nukleové kyseliny, záporně nabitě vzhledem k přítomnosti fosforečnanu, jsou přitahovány ke kladné elektrodě (anodě).



Obr. 1: Ilustrační schéma aparatury využívané k analýzám nukleových kyselin (A). Zesilovač aplikuje napětí V_c a detekuje změny proudu procházejícího hemolysinem I_p . Při aplikaci napětí 120 mV a použití 1M KCl jako elektrolytu prochází hemolysinem 120 pA referenční proud, který je při translokaci ssDNA snížen na 15 pA (B).

Průchod nukleové kyseliny nanopórem z cis na trans stranu membrány způsobuje vždy alespoň částečné rozvinutí její terciální struktury. Vstup, výstup a průchod jednotlivých molekul analytu nanopórem způsobuje pokles počtu iontů procházejících pórem, tedy celkového proudu procházejícího aparaturou oproti referenčnímu proudu a je kontinuálně detekován jako soubor odporových pulzů. Změny procházejícího elektrického proudu (doba průchodu analytu nanopórem t_d a průměrná amplituda odporového pulzu δI) pak naznačují fyzikálně chemické vlastnosti procházející molekuly jako je její konformace, struktura a náboj. Naopak frekvence snižování procházejícího proudu (doba mezi vznikem dvou odporových pulzů δt) signalizuje koncentraci analytu. Tyto změny jsou detekovány citlivým zesilovačem běžně užívaným v patch-clamp technikách (**Obr. 1**). Průměr póru musí umožňovat průchod analytu (průměr dsDNA ~ 2 nm) a současně i dostatečného množství iontů elektrolytu, jejichž průchod je snižován průřezem analyzované molekuly. Nejmenší ionty jsou schopny rozlišit struktury analytu lišící se velikostí jejich hydrodynamického poloměru (~ 0.14 nm pro K^+ a Cl^-)³. Proto jsou na nanopórech založené techniky schopné detekovat i velice drobné rozdíly v polynukleotidovém řetězci, jako je například methylace CpG oblastí DNA¹². Samotné fyzikální principy průchodu nukleových kyselin pórem nejsou i přes velký zájem vědecké komunity dostatečně objasněny. Pravděpodobným důvodem je komplikovanost samotného procesu. Některé práce naznačují, že samotná translokace se skládá ze dvou úseků, během kterých probíhá translokace v nepatrně odlišných rychlostech¹³. Vliv na rychlost translokace má i samotné složení polymeru¹⁴.

Rozdělení nanopórů

Biopóry

Biologické póry vložené do lipidových membrán mají oproti solid-state nanopórům několik výhod. Především se jedná o dokonale jednotnou proteinovou strukturu, která je díky rentgenové krystalografii známá až rozlišení jednotek angströmů. Biologických nanopórů je navíc celá řada a jejich již tak heterogen-

ní vlastnosti mohou být cílenou mutagenézí upravovány¹⁵.

Objektem zájmu Johna Kasianowicze byl na počátku 90. let α -hemolysin^{16,17}. Jedná se o vodorozpustný protein (33 kDa) izolovaný z bakterie *Staphylococcus aureus*. Tento protein je schopen samovolně oligomerizovat v lipidových membránách a tvořit v nich heptamerní kanál. Důsledkem vzniku kanálu v membráně je ztráta osmotického tlaku v buňce a její lýza. Tento kanál je průchodný v neutrálním pH i při vysoké iontové síle roztoku a při potenciálu 120 mV na membráně jedním hemolysinovým kanálem prochází proud 120 pA¹⁸. Předpokládalo se, že tento proud odpovídá průchodu širokému 2 nm, což potvrdil detailní popis struktury heptamerního hemolysinu¹⁹. Nejdůležitějším místem v struktuře oligomerizovaného hemolysinu je konstriktce v místě přechodu vestibulu v β -barelu, v kterém je vnitřní kanálek široký 1.4 nm. Kasianowicz poprvé demonstroval elektroforetický transport ssDNA a ssRNA hemolysinem v roce 1996¹⁸. Detekované rozdíly v translokaci mezi RNA homopolymery (polyadenylovou a polycytidylovou kyselinou) a DNA homopolymery (polydeoxyadenylovou a polydeoxycytidylovou kyselinou) potvrdily potenciální možnost využít hemolysin jako součást sekvenovacích metod nové generace^{20,21}. V současné době se ukazuje, že hemolysin není vhodným nástrojem pro sekvenování DNA a v současné době je spíše využíván k jiným účelům jako např. detekce uridylace DNA²², studium struktury peptidů a proteinů²³, detekci iontů a jejich vazbu do DNA^{24,25}.

Druhou nejvíce používanou molekulou tvořící nanopóry k analýzám DNA je porin A (MspA). Tento extrémně stálý hydrofilní transmembránový protein bakterie *Mycobacterium smegmatis* tvoří oktamerní komplexy s kónickou strukturou²⁶. Z hlediska struktury je MspA výhodnější pro nanopórové aplikace než hemolysin. MspA poskytuje silnější procházející proudy, navíc zde nepůsobí rušivý vliv dlouhého β -barelu. Oblast konstriční zóny, v které je procházející proud nejvíce citlivý na změny struktury translokovaného polynukleotidu, odpovídá zhruba délce dvou nukleotidů

(0,5 nm)²⁷. Vzhledem k negativnímu náboji uvnitř konstriktce MspA, je vždy nutné cílenou mutagenézí nahradit negativně nabyté asparátové zbytky neutrálním asparaginem²⁸. Bylo prokázáno, že geneticky upravený MspA je schopen rozlišit všechny nukleotidy v ssDNA, pokud je její průchod zpomalován úseky dsDNA²⁹.

K dalším proteinům tvořícím póry využitých v nanopórových technikách patří aerolysin³⁰, Cytolysin A bakterií druhu *Salmonella typhi* (ClyA)³¹, receptor A pro příjem hydroxamátu železitého bakterie *E. coli* (FhuA)³², phi29 protein³³ a SP1 protein³⁴.

Rychlé a levné genomové sekvenování pomocí biologických nanopórů má ovšem i v současné době celou řadu výzev. Modulace proudu iontů bazemi nukleové kyseliny procházejícími konstrikcí hemolysinu je ovlivňována a rušena oblastí β -barelu (2 nm v průměru a 5 nm dlouhá). Tato oblast je mnohem delší než vzdálenost jednotlivých bazí (3.4 Å) a tudíž modulace signálu je důsledkem přítomnosti 10–15 bazí v této oblasti³⁵. Další technickou překážkou je rychlost translokace nukleové kyseliny hemolysinem. Za 1 μ s prochází za standartních podmínek hemolysinem jedna báze a cca 100 iontů, jejichž celkový náboj se podílí na rozlišení jednotlivých bazí. Tato doba je daleko pod rozlišovací schopností současných komerčně dodávaných detektorů. Doba translokace 1 ms a cca 1000 iontů procházejících pórem za tuto dobu by byla potřeba pro spolehlivou analýzu sekvence jednotlivých bazí³⁶. Zvýšení viskozity elektrolytu, snížení teploty nebo cílená nabitá aminokyseliny mohou částečně snížit rychlost translokace nukleových kyselin pórem, současně však dochází i k snížení mobility iontů a poklesu detekovaných proudů³⁷⁻³⁹. V současné době se snaha zpomalit průchod nukleové kyseliny nanopórem ubírá směrem vložení adaptérů jako je aminocyklohexin do lumen biopóru nebo jeho modifikace enzymem jako Klenow fragment *E. coli* DNA polymerázy nebo phi29 DNA polymerázou⁴⁰⁻⁴².

Solid-state nanopóry

Alternativou k proteinovým nanopóram jsou nanopóry vytvořené litografickými technikami

v pevných substrátech. Nejčastěji se používají membrány na bázi křemíku (SiN , Si_2N , Si_3N_4 , SiO_2) ale třeba i skla⁴³ a grafenu⁴⁴. Solid-state nanopóry mají oproti biopórům výhodu dobré mechanické, chemické a teplotní stability. Jejich rozměry a tvar mohou být libovolně měněny, na druhou stranu, jsou složitě reprodukovatelné, mají větší kapacitanci a problémy s šumem⁴⁵⁻⁴⁸. Ultra tenké membrány jsou vyráběny technikou atomic-layer deposition (ALD), která umožňuje deponovat na relativně velké plochy vrstvy s vynikající uniformitou a kontrolovat jejich složení⁴⁹. Iontovým paprskem jako první vyrobil umělý nanopór v křemíkové membráně k analýze DNA tým pod vedením Golovchenka⁵⁰.

Grafen, dvourozměrný list atomů uhlíku, je z hlediska nanopórového sekvenování nadějným materiálem. Šířka jedné grafenové vrstvy (0,32–0,52 nm) odpovídá vzdálenosti bazí v polynukleotidovém řetězci.

Drndić et al. vyrobil první nanopór v grafenové vrstvě⁵¹ a následně ho použil k analýze DNA⁵². Ačkoliv vzhledem k velmi tenké grafenové vrstvě tento nanopór poskytoval vyšší proudové signály než nanopóry z jiných materiálů, šum byl naopak několikrát vyšší vzhledem k přítomnosti perforací v grafenovém listu. Grafen by navíc mohl být materiálem využitým pro sekvenování pomocí detekce příčné vodivosti⁵³, kdy jednotlivé báze v nukleové kyselině translokované solid-state nanopórem vzhledem k jejich různému chemickému složení (hustotám elektronů) přispívají různou měrou k tunelovému proudu mezi elektrodami umístěnými transversálně v oblasti nanopóru.

V případě solid-state nanopórů existuje stejný problém jako u biologických, příliš rychlá translokace nukleové kyseliny pórem. Bashir et al. popsali zpomalení průchodu DNA pórem vyrobeného z Al_2O_3 ⁵⁴. Při ozáření amorfního nevodivého Al_2O_3 paprskem elektronů dochází k změně jeho struktury na krystalickou, což umožňuje v oblasti póru nejen manipulaci s nábojem, ale i vytvoření nanoelektrod a redukci šumu.

Závěr

I přes limitující faktory, které v současné době komplikují použití nanopórů, se jeví, že by

nanopóry v budoucnosti mohli hrát významnou úlohu v diagnostice a DNA sekvenování. Pokroky ve zpomalení translokace DNA nanopórem, výrobě solid-state nanopórů a jejich aplikace do čipů, nové principy detekce jako například měření příčné vodivosti⁵³, použití uhlíkových nanotrubiček jako nanopórů⁵⁵ a použití nanofluidických diod^{56,57} jsou příslibem rychlých a především cenově dostupných analýz lidského genomu.

Tato práce byla financována z projektu PGS20_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Graham M. D.: Cytometry Part A, 83, 1057 (2013).
2. Deblois R. W., Bean C. P., Wesley R. K. A.: Journal of Colloid and Interface Science, 61, 323 (1977).
3. Wanunu M.: Physics of Life Reviews, 9, 125 (2012).
4. Sanguinetti M. C., Tristani-Firouzi M.: Nature, 440, 463 (2006).
5. Gorlich D., Kutay U.: Annual Review of Cell and Developmental Biology, 15, 607 (1999).
6. Guasch A., Pous J., Ibarra B., Gomis-Ruth F. X., Valpuesta J. M., Sousa N., Carrascosa J. L., Coll M.: Journal of Molecular Biology, 315, 663 (2002).
7. Diep B. A., Otto M.: Trends in Microbiology, 16, 361 (2008).
8. Branton D., Deamer D. W., Marziali A., Bayley H., Benner S. A., Butler T., Di Ventra M., Garaj S., Hibbs A., Huang X. H., Jovanovich S. B., Krstić P. S., Lindsay S., Ling X. S. S., Mastrangelo C. H., Meller A., Oliver J. S., Pershin Y. V., Ramsey J. M., Riehn R., Soni G. V., Tabard-Cossa V., Wanunu M., Wiggin M., Schloss J. A.: Nature Biotechnology, 26, 1146 (2008).
9. Baldarelli R., Branton D., Church G., Deamer D. W., Kasianowicz J.: (1998).
10. van Hooft J. A., Wadman W. J.: Journal of Neurophysiology, 89, 1864 (2003).
11. Purcell E. K., Liu L. Q., Thomas P. V., Duncan R. K.: Plos One, 6, (2011).
12. Laszlo A. H., Derrington I. M., Brinkerhoff H., Langford K. W., Nova I. C., Samson J. M., Bartlett J. J., Pavlenok M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 18904 (2013).
13. Meller A., Nivon L., Brandin E., Golovchenko J.,

- Branton D.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 1079 (2000).
14. Storm A. J., Chen J. H., Zandbergen H. W., Dekker C.: *Physical Review E*, 71, (2005).
 15. Venkatesan B. M., Bashir R.: *Nature Nanotechnology*, 6, 615 (2011).
 16. Walker B., Krishnasastry M., Zorn L., Kasianowicz J., Bayley H.: *Journal of Biological Chemistry*, 267, 10902 (1992).
 17. Walker B., Kasianowicz J., Krishnasastry M., Bayley H.: *Protein Engineering*, 7, 655 (1994).
 18. Kasianowicz J. J., Brandin E., Branton D., Deamer D. W.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 13770 (1996).
 19. Song L. Z., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J. E.: *Science*, 274, 1859 (1996).
 20. Akeson M., Branton D., Kasianowicz J. J., Brandin E., Deamer D. W.: *Biophysical Journal*, 77, 3227 (1999).
 21. Meller A., Branton D.: *Electrophoresis*, 23, 2583 (2002).
 22. Clamer M., Hofler L., Mikhailova E., Viero G., Bayley H.: *Acs Nano*, 8, 1364 (2014).
 23. Lee J. S.: *Protein and Peptide Letters*, 21, 247 (2014).
 24. Wang G. H., Wang L., Han Y. J., Zhou S., Guan X. Y.: *Biosensors & Bioelectronics*, 53, 453 (2014).
 25. Asandei A., Schiopu I., Ifemi S., Mereuta L., Luchian T.: *Langmuir*, 29, 15634 (2013).
 26. Stahl C., Kubetzko S., Kaps I., Seeber S., Engelhardt H., Niederweis M.: *Molecular Microbiology*, 40, 451 (2001).
 27. Faller M., Niederweis M., Schulz G. E.: *Science*, 303, 1189 (2004).
 28. Butler T. Z., Pavlenok M., Derrington I. M., Niederweis M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 20647 (2008).
 29. Derrington I. M., Butler T. Z., Collins M. D., Manrao E., Pavlenok M., Niederweis M., Gundlach J. H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 16060 (2010).
 30. Fennouri A., Przybylski C., Pastoriza-Gallego M., Bacri L., Auvray L., Daniel R.: *Acs Nano*, 6, 9672 (2012).
 31. Soskine M., Biesemans A., Moeyaert B., Cheley S., Bayley H., Maglia G.: *Nano Letters*, 12, 4895 (2012).
 32. Mohammad M. M., Iyer R., Howard K. R., McPike M. P., Borer P. N., Movileanu L.: *Journal of the American Chemical Society*, 134, 9521 (2012).
 33. Chen Y. S., Lee C. H., Hung M. Y., Pan H. A., Chiou J. C., Huang G. S.: *Nature Nanotechnology*, 8, 452 (2013).
 34. Wang H. Y., Li Y., Qin L. X., Heyman A., Shoseyov O., Willner I., Long Y. T., Tian H.: *Chemical Communications*, 49, 1741 (2013).
 35. Stoddart D., Heron A. J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 7702 (2009).
 36. Deamer D. W., Branton D.: *Accounts of Chemical Research*, 35, 817 (2002).
 37. Kawano R., Schibel A. E. P., Cauley C., White H. S.: *Langmuir*, 25, 1233 (2009).
 38. de Zoysa R. S. S., Jayawardhana D. A., Zhao Q. T., Wang D. Q., Armstrong D. W., Guan X. Y.: *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 13332 (2009).
 39. Rincon-Restrepo M., Milthallova E., Bayley H., Maglia G.: *Nano Letters*, 11, 746 (2011).
 40. Hurt N., Wang H. Y., Akeson M., Lieberman K. R.: *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3772 (2009).
 41. Wu H. C., Astier Y., Maglia G., Mikhailova E., Bayley H.: *Journal of the American Chemical Society*, 129, 16142 (2007).
 42. Lieberman K. R., Cherf G. M., Doody M. J., Olasagasti F., Kolodji Y., Akeson M.: *Journal of the American Chemical Society*, 132, 17961 (2010).
 43. Gong X. Q., Patil A. V., Ivanov A. P., Kong Q. Y., Gibb T., Dogan F., deMello A. J., Edl J. B.: *Analytical Chemistry*, 86, 835 (2014).
 44. Hu G. H., Mao M., Ghosal S.: *Nanotechnology*, 23, (2012).
 45. Tabard-Cossa V., Trivedi D., Wiggin M., Jetha N. N., Marziali A.: *Nanotechnology*, 18, (2007).
 46. Storm A. J., Chen J. H., Ling X. S., Zandbergen H. W., Dekker C.: *Nature Materials*, 2, 537 (2003).
 47. Hoogerheide D. P., Garaj S., Golovchenko J. A.: *Physical Review Letters*, 105, (2010).
 48. Smeets R. M. M., Keyser U. F., Wu M. Y., Dekker N. H., Dekker C.: *Physical Review Letters*, 97, (2006).
 49. Kim W. K., Nam W. H., Kim S. H., Rhee S. W.: *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38, 578 (2005).
 50. Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M. J., Golovchenko J. A.: *Nature*, 412, 166 (2001).
 51. Fischbein M. D., Drndic M.: *Applied Physics Letters*, 93, (2008).
 52. Merchant C. A., Healy K., Wanunu M., Ray V., Peterman N., Bartel J., Fischbein M. D., Venta K., Luo Z. T., Johnson A. T. C., Drndic M.: *Nano Letters*, 10, 2915 (2010).
 53. Postma H. W. C.: *Nano Letters*, 10, 420 (2010).
 54. Venkatesan B. M., Shah A. B., Zuo J. M., Bashir R.: *Advanced Functional Materials*, 20, 1266 (2010).
 55. Liu H. T., He J., Tang J. Y., Liu H., Pang P., Cao D., Krstic P., Joseph S., Lindsay S., Nuckolls C.: *Science*, 327, 64 (2010).
 56. Jin X. Z., Aluru N. R.: *Microfluidics and Nanofluidics*, 11, 297 (2011).
 57. Karnik R., Duan C. H., Castelino K., Daiguji H., Majumdar A.: *Nano Letters*, 7, 547 (2007).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Účinky antimikrobiálních peptidů

Markéta Komínková^a, Ondřej Zítka^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Effect of antimicrobial peptides

Organisms can produce substances which act as protection against the negative effects of microorganisms. Many of these substances belong among the peptides and represent an important mechanism of innate immunity. Peptides having activity against bacteria, fungi, parasites, viruses and cancer are collectively referred to as antimicrobial peptides (AMPs). Due to the increasing resistance of pathogenic microorganisms to antibiotic treatment, AMPs come to the forefront as a suitable alternative. Out of an antimicrobial activity, also the possible use for the treatment of fungal, parasite and virus diseases are studied. Also it has a significant potential use for the treatment of cancer, as some AMPs demonstrated significant antitumor activity.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, antimikrobiální peptidy, mechanismus účinku, protinádorová aktivita

Úvod

Bezobratlí, rostliny i živočichové vykazují schopnost produkovat látky na ochranu proti působení mikroorganismů. Mnohé z těchto látek patří mezi peptidy a představují důležitý mechanismus vrozené imunity^{1,2}. Peptidy s aktivitou proti bakteriím, houbám, parazitům, virům a rakovinným buňkám jsou souhrnně označovány jako antimikrobiální peptidy (AMPs)³. AMPs zauímají 4 základní struktury, a to α -helix, β -skládaný list, smyčku a přímou strukturu. Podle fyzikálně-chemických vlastností jsou charakterizovány jako kationtové, aniontové, hydrofilní a amfipatické⁴. Nejběžnější jsou AMPs kationtové a amfipatické ve struktuře α -helix⁵. Velikost se pohybuje v rozmezí 6 – 100 aminokyselin, jejichž složení i pořadí je velice proměnlivé. Tepelná stabilita těchto molekul je velmi vysoká, odolávají teplotám 100 °C po dobu 15 minut⁶. Tyto látky se dostávají do popředí zájmu zejména kvůli zvyšující se rezistenci patogenních organismů na konvenční antibiotika. Právě kvůli zvyšující se rezistenci patogenních organismů je zájem o využití AMPs pro farmakologickou aplikaci^{7,8}. Díky existenci skupiny AMPs, které vykazují

schopnost inhibice nádorových buněk, jako další farmaceutická aplikace přichází v úvahu využití AMPs jako protinádorových léčiv⁹. I přes významné kladné vlastnosti mají AMPs i vedlejší účinky, mezi ty nejvýznamnější patří hemolýza. Zlepšení vlastností AMPs a snížení vedlejších účinků lze docílit i využitím nano-transportérů, které zajistí cílenou dopravu k místu účinku a také ochranu zdravých tkání¹⁰.

AMPs s antimikrobiálním účinkem

Nejrozšířenější skupinou AMPs jsou peptidy s antibakteriálním účinkem. Antibakteriální efekt je umožněn díky integraci AMPs s mikroorganismy na základě elektrostatických sil pozitivně nabitého aminokyselinového zbytku s negativně nabitým povrchem buněk. Tento mechanismus tvoří i základ selektivity a citlivosti prokaryotických a eukaryotických buněk, jelikož u eukaryotických buněk jsou na extracelulární membráně přítomny zejména neutrálně nabitě lipidy, jako jsou fosfatidylcholin a sfingomyelin. U prokaryotických buněk je membrána složena zejména z negativně nabitých lipidů jako jsou fosfatidylglycerol (PG), kardiolipin a obojetně iontový fosfati-

dylethanolamin (PE) ^{11,12}. Po interakci kladně nabitých oblastí peptidu s negativně nabitým povrchem buněk dojde k penetraci buněčné membrány. Interakce peptid-membrána hraje klíčovou roli v antimikrobiální aktivitě peptidů ¹³. V současné době existují 4 obecné modely popisující způsob antimikrobiální činnosti peptidů, a to prstencový a kobercový model, model sudové skruže a model micelárních agregátů ⁶. Největší část doposud známých AMPs účinkuje jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím ^{14,15}, jsou však i takové, které působí pouze proti grampozitivním ¹⁶⁻¹⁸ nebo gramnegativním ¹⁹.

AMPs s antimykotickým účinkem

Mykózy jsou schopné ohrozit zdraví člověka. Jejich vysoký výskyt je spoluzodpovědný za zdravotní a ekonomické problémy v tropické oblasti, ale ani celosvětový dopad není zanedbatelný ²⁰. Vzhledem ke zvýšenému výskytu plísní a omezenému výběru antimykotik jsou AMPs velmi atraktivní variantou, jak proti těmto původcům bojovat ²¹. Jako velmi účinný proti několika druhům kvasinek se ukázal syntetický čtyřmocný peptid B4010. Kromě toho tento peptid nevykazuje toxicitu ani hemolytickou aktivitu u myši ²². Mezi další peptidy, které vykazují antimykotickou aktivitu, ale nezpůsobují hemolýzu, patří např. bactrocerin-1 ²³ a drozomycin ²⁴. AMPs působí i proti onychomykózám způsobeným původci jako jsou *Epidermophyton ssp.* a *Trichophyton ssp.*, které postihují nehtové ploténky a nehtová lůžka. Zajímavá je přirozená přítomnost peptidů s antimykotickým účinkem v lidských nehtech. Tyto peptidy odpovídají za prevenci infekcí nehtových jednotek ²⁵.

AMPs s antiprotozoálním účinkem

Obdobně jako mykózy i onemocnění způsobená parazity jsou velkým problémem zejména v tropických oblastech. Tato onemocnění mají významný podíl na sociálně-ekonomické devastaci těchto oblastí a odráží se i celosvětově. AMPs mohou být použity ke kontrole nemocí, a to jak při léčbě infikovaných hostitelů, tak k zabránění přenosu nemocí tím, že interferují s prvky přímo na hmyzích přenašečích ²⁶. Aktivitu proti prvokům vykazuje phylloseptin

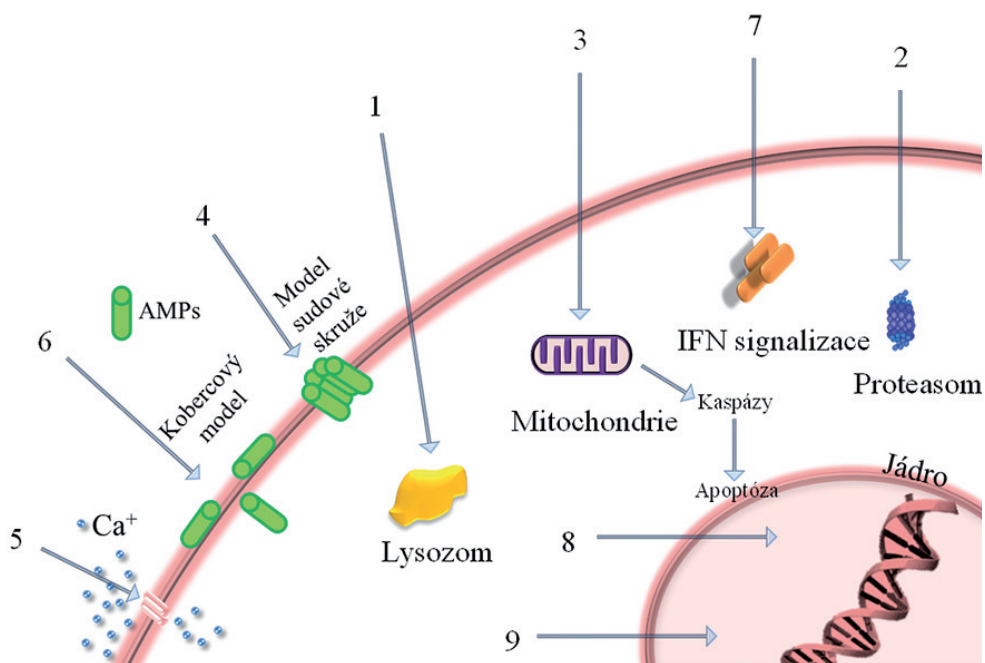
4 a 5 ze sekretu kůže dvou žab druhu *Phyllomedusa* (*Phyllomedusa oreades* a *Phyllomedusa hypochondrialis*) ²⁷. Mezi AMPs s účinkem proti prvokům rodu *Trypanosoma*, kteří způsobují africkou trypanozomíazu (spavá nemoc), patří např. leucinostatin, alamethicin I, tshushimycin ²⁸, attacin ²⁹, protegrin a ovispirin ³⁰. Malárie je onemocnění způsobené jednobuněčným parazitem zimničkou tropickou (*Plasmodium falciparum*), který je přenášen samičkami komárů rodu *Anopheles*. Aktivitu proti malárii vykazují např. peptidy defensin, stomoxyn, drosomycin, gambicin, cecropin a magainin ³¹⁻³³. Proti původcům leishmaniózy působí peptid DSR 01 a další ³⁴.

AMPs s antivirovým účinkem

Viry mohou napadat jak živočichy včetně člověka, tak rostliny, některé napadají i bakterie. Řada virů způsobuje závažná lidská onemocnění, jejichž léčba je komplikovaná až nemožná. Při napadení organismu virem dochází uvnitř buněk k replikaci tohoto viru, případně dojde k začlenění virové genetické informace do buněčného genomu. AMPs získávají protivirový efekt díky blokaci membránových receptorů hostitelské buňky nebo vazbou na virion ^{35,36}. Mezi peptidy, které by mohly být použity při prevenci nebo léčbě virových onemocnění, jako jsou virus lidské imunodeficiency (HIV), herpes simplex virus (HSV), virus hepatitidy C (HCV), lidský cytomegalovirus (HCMV), patří lactoferricin ^{35,37,38}, melittin ^{39,40}, Retrocyclin-101, Protegrin-1 ⁴¹, thymopentin ⁴².

AMPs s protinádorovými účinky

Konvenční chemoterapeutika vykazují velké množství vedlejších účinků a často podporují rozvoj lékové rezistence. Nedostatky současné léčby by mohly vyřešit AMPs, jelikož řada studií ukazuje i na selektivní cytotoxickou aktivitu AMPs vůči širokému spektru nádorových buněk ⁴³. Potenciál využití AMPs v léčbě nádorových onemocnění je i v oblasti kombinace peptidů s konvenčními chemoterapeutiky ⁴⁴. Pro tuto aktivitu byly navrženy tři mechanismy, mezi které patří lyze buněčné membrány, aktivace vnějších apoptotických drah a inhibice angiogeneze ⁴⁵. Dle současných poznatků jsou



Obr. 1: Schéma mechanismu účinku protinádorových kationtových peptidů. Údaje uvedené v závorce představují příklady peptidů působící daným mechanismem. 1 – Modifikace lysozomální membrány, která vede k okyselení intracelulárního prostoru a buněčné smrti (Kahalalid F). 2 – Amplifikace proteazomální aktivity (Magainin II). 3 – Indukce mitochondriální dráhy pro apoptózu přes uvolnění cytochromu c do cytoplasmy nebo přes aktivaci kaspázové kaskády (Lactoferricin B). 4 – Tvorba pórů koberečným modelem (Cecropin). 5 – Zvýšení příjmu Ca^{2+} (Melittin). 6 – Tvorba pórů modelem sudové skruže (Cecropin, Melittin, Lactoferricin B). 7 – Aktivace imunitní modulační dráhy indukci nukleových kyselin a interferonů (Alloferon). 8 – Inhibice genů zapojených v replikaci DNA (Kahalalid F). 9 – Zastavení buněčného cyklu v G0, G1 nebo S fázi (AGAP). Přepřacováno podle ⁴⁸.

peptidy s protinádorovou aktivitou amfipatické s hydrofobními a kationtovými zbytky. Tyto peptidy mohou tvořit póry v membráně, narušovat buněčné orgány (Obr. 1) a tím působí díky apoptóze či nekróze buněčnou smrt. Schopnost peptidů narušovat a cílit nádorové buňky umožňuje nést biologicky aktivní látky přímo do nádorů anebo do nádorového krevního řečiště ^{46,47}.

Mezi peptidy s protinádorovou účinností patří např. Cecropin A a B, který působí selektivně cytotoxicky na proliferaci nádorových buněk močového měchýře, bez negativního dopadu na fibroblasty ⁴⁹. Selektivní aktivitu proti solidním nádorům vykazuje Kahalalid F ⁵⁰.

Obdobně magainin II inhibuje proliferaci nádorových buněk močového měchýře, na které působí cytotoxicky, vůči fibroblastům je bez efektu ⁵¹. Peptid AGAP inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu lidských nádorových buněk tlustého střeva ⁵². Alloferon má sám o sobě protinádorovou účinnost nižší, než je tomu u konvenčních chemoterapeutik, ale v kombinaci s nimi dochází k výraznému zvýšení protinádorové aktivity ⁵³. Lactoferricin B způsobuje u neuroblastomových buněk buněčnou smrt ⁵⁴. Mere15 výrazně potlačuje růst plicního adenokarcinomu ⁵⁵. CPAP působí proti nádorům jater ⁵⁶

Závěr

Široká skupina antimikrobiálních peptidů představuje nové možnosti v léčbě celé řady onemocnění, ať už se jedná o onemocnění bakteriálního původu, nebo o onemocnění způsobená houbami, parazity, viry. Výrazný potenciál představuje také protinádorová aktivita AMPs. Protinádorová aktivita je způsobena řadou mechanismů, mezi které patří stejně jako u antibakteriální aktivity narušení membrány buňky, ale také např. spuštění apoptózy, aktivity imunitní dráhy, zastavení replikace DNA a buněčného cyklu. Přestože jsou některé AMPs schopné působit na širokou škálu nádorových buněk a mají specifický účinek na tyto buňky, nebyl doposud objeven peptid, který by nevykazoval žádné vedlejší účinky. Jako vhodná cesta aplikace AMPs se jeví kombinace s dalšími léčivy, případně kombinace s nanotransportéry.

Tato práce byla financována z projektu PGS21_2013

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Brogden K. A.: Nature Reviews Microbiology, 3, 238 (2005).
2. Zasloff M.: Nature, 415, 389 (2002).
3. Lopez-Abarrategui C., Figueroa-Espi V., Reyes-Acosta O., Reguera E., Otero-Gonzalez A. J.: Current Protein & Peptide Science, 14, 595 (2013).
4. Peters B. M., Shirtliff M. E., Jabra-Rizk M. A.: Plos Pathogens, 6, (2010).
5. Epanand R. M., Vogel H. J.: Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1462, 11 (1999).
6. Li Y. M., Xiang Q., Zhang Q. H., Huang Y. D., Su Z. J.: Peptides, 37, 207 (2012).
7. Hassan M., Kjos M., Nes I. F., Diep D. B., Lotfipour F.: Journal of Applied Microbiology, 113, 723 (2012).
8. Lv Y. F., Wang J. J., Gao H., Wang Z. Y., Dong N., Ma Q. Q., Shan A. S.: Plos One, 9, (2014).
9. Cerovsky V., Budesinsky M., Hovorka O., Cvacka J., Voburka Z., Slaninova J., Borovickova L., Fucik V., Bednarova L., Votruba I., Straka J.: Chembiochem, 10, 2089 (2009).
10. Urban P., Valle-Delgado J. J., Moles E., Marques J., Diez C., Fernandez-Busquets X.: Current Drug Targets, 13, 1158 (2012).
11. Lohner K.: General Physiology and Biophysics, 28, 105 (2009).
12. Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski L. D., Silva-Pereira I., Kyaw C. M.: Frontiers in Microbiology, 4, (2013).
13. Pandey B. K., Srivastava S., Singh M., Ghosh J. K.: Biochemical Journal, 436, 609 (2011).
14. Knappe D., Cassone M., Nollmann F. I., Otvos L., Hoffmann R.: Protein and Peptide Letters, 21, 321 (2014).
15. Berthold N., Hoffmann R.: Protein and Peptide Letters, 21, 391 (2014).
16. Imamura M., Wada S., Ueda K., Saito A., Koizumi N., Iwahana H., Sato R.: Developmental and Comparative Immunology, 33, 1120 (2009).
17. Snyder A. B., Worobo R. W.: Journal of the Science of Food and Agriculture, 94, 28 (2014).
18. Herbinier J., Brauquart-Varnier C., Greve P., Strub J. M., Frere J., Van Dorsselaer A., Martin G.: Developmental and Comparative Immunology, 29, 489 (2005).
19. Yoe S. M., Kang C. S., Han S. S., Bang I. S.: Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 144, 199 (2006).
20. Lupi O., Tying S. K., McGinnis M. R.: Journal of the American Academy of Dermatology, 53, 931 (2005).
21. Fjell C. D., Hiss J. A., Hancock R. E. W., Schneider G.: Nature Reviews Drug Discovery, 11, 37 (2012).
22. Lakshminarayanan R., Liu S. P., Li J. G., Nandhakumar M., Aung T. T., Goh E., Chang J. Y. T., Saraswathi P., Tang C., Safie S. R. B., Lin L. Y., Riezman H., Lei Z., Verma C. S., Beuerman R. W.: Plos One, 9, 1 (2014).
23. Dang X. L., Tian J. H., Yang W. Y., Wang W. X., Ishibashi J., Asaoka A., Yi H. Y., Li Y. F., Cao Y., Yamakawa M., Wen S. Y.: Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 71, 117 (2009).
24. Cohen L., Moran Y., Sharon A., Segal D., Gordon D., Gurevitz M.: Journal of Biological Chemistry, 284, 23558 (2009).
25. Dorschner R. A., Lopez-Garcia B., Massie J., Kim C., Gallo R. L.: Journal of the American Academy of Dermatology, 50, 343 (2004).
26. Harrington J. M.: Parasite Immunology, 33, 461 (2011).
27. Leite J., Silva L. P., Rodrigues M. I. S., Prates M. V., Brand G. D., Lacava B. M., Azevedo R. B., Bocca A. L., Albuquerque S., Bloch C.: Peptides, 26, 565 (2005).
28. Ishiyama A., Otoguro K., Iwatsuki M., Namatame M., Nishihara A., Nonaka K., Kinoshita Y., Takahashi Y., Masuma R., Shiomi K., Yamada H., Omura S.: Journal of Antibiotics, 62, 303 (2009).
29. Hu Y. J., Aksoy S.: Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35, 105 (2005).
30. McGwire B. S., Olson C. L., Tack B. F., Engman D. M.: Journal of Infectious Diseases, 188, 146

- (2003).
31. Villa-Hernandez O., Hernandez-Orihuela L., Rodriguez M. D., Zamudio-Zuniga F., Castro-Franco R., Pando V., Batista C. V. F.: *Protein and Peptide Letters*, 16, 1371 (2009).
 32. Tian C. H., Gao B., Rodriguez M. D., Lanz-Mendoza H., Ma B., Zhu S. Y.: *Molecular Immunology*, 45, 3909 (2008).
 33. Gao B., Xu J., Rodriguez M. D., Lanz-Mendoza H., Hernandez-Rivas R., Du W. H., Zhu S. Y.: *Biochimie*, 92, 350 (2010).
 34. Eaton P., Bittencourt C. R., Silva V. C., Veras L. M. C., Costa C. H. N., Feio M. J., Leite J.: *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 10, 483 (2014).
 35. Andersen J. H., Osbakk S. A., Vorland L. H., Traavik T., Gutteberg T. J.: *Antiviral Research*, 51, 141 (2001).
 36. Orsi N.: *Biomaterials*, 17, 189 (2004).
 37. Jenssen H.: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 3002 (2005).
 38. Andersen J. H., Jenssen H., Gutteberg T. J.: *Antiviral Research*, 58, 209 (2003).
 39. Falco A., Barrajon-Catalan E., Menendez-Gutierrez M. P., Coll J., Micol V., Estepa A.: *Antiviral Research*, 97, 218 (2013).
 40. Gee M. L., Burton M., Grevis-James A., Hossain M. A., McArthur S., Palombo E. A., Wade J. D., Clayton A. H. A.: *Scientific Reports*, 3, (2013).
 41. Lee S. B., Li B. C., Jin S. X., Daniell H.: *Plant Biotechnology Journal*, 9, 100 (2011).
 42. Wang Y., Ke X. Y., Khara J. S., Bahety P., Liu S. Q., Seow S. V., Yang Y. Y., Ee P. L. R.: *Biomaterials*, 35, 3102 (2014).
 43. Mader J. S., Hoskin D. W.: *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15, 933 (2006).
 44. Riedl S., Zwegtick D., Lohner K.: *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 766 (2011).
 45. Dobrzynska I., Szachowicz-Petelska B., Sulkowski S., Figaszewski Z.: *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276, 113 (2005).
 46. Boohaker R. J., Lee M. W., Vishnubhotla P., Perez J. M., Khaled A. R.: *Current Medicinal Chemistry*, 19, 3794 (2012).
 47. Paredes-Gamero E. J., Nogueira-Pedro A., Miranda A., Justo G. Z.: *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5, 130 (2013).
 48. Mulder K. C. L., Lima L. A., Miranda V. J., Dias S. C., Franco O. L.: *Frontiers in Microbiology*, 4, (2013).
 49. Suttman H., Retz M., Paulsen F., Harder J., Zwergel U., Kamradt J., Wullich B., Unteregger G., Stockle M., Lehmann J.: *BMC urology*, 8, 5 (2008).
 50. Hamann M. T., Otto C. S., Scheuer P. J., Dunbar D. C.: *Journal of Organic Chemistry*, 61, 6594 (1996).
 51. Lehmann J., Retz M., Sidhu S. S., Suttman H., Sell M., Paulsen F., Harder J., Unteregger G., Stockle M.: *European Urology*, 50, 141 (2006).
 52. Gu Y., Liu S. L., Ju W. Z., Li C. Y., Cao P.: *Oncology Letters*, 5, 483 (2013).
 53. Chernysh S., Irina K., Irina A.: *International Immunopharmacology*, 12, 312 (2012).
 54. Eliassen L. T., Berge G., Leknessund A., Wikman M., Lindin I., Lokke C., Ponthan F., Johnsen J. I., Sveinbjornsson B., Kogner P., Flaegstad T., Rekdal O.: *International Journal of Cancer*, 119, 493 (2006).
 55. Wang C. C., Liu M., Cheng L. Y., Wei J. T., Wu N., Zheng L. H., Lin X. K.: *Experimental Biology and Medicine*, 237, 442 (2012).
 56. Wang X. Q., Zhang X. W.: *Biotechnology Progress*, 29, 681 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Antivirové peptidy a jejich využití pro léčbu chřipky

Sylvie Skaličková^a, Ondřej Zítka^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Therapeutical application of antiviral peptides against influenza virus

Influenza spreads around the world in seasonal epidemics and it is caused by a variety of species and strains of viruses, in any given year some strains can die out while others create epidemics, while yet another strain can cause a pandemic. The peptides may present the new generation of antiviral drugs with the broad spectrum of activity. The antiviral effects depend on their structure as well as the target part of the virus. We showed the manner of action of peptides on the influenza virus. The entry blocker peptides interact with hemagglutinin and inhibit the viral fusion. Furthermore the peptides are capable to disrupt viral envelope or block the viral replication. The perceptivity of therapeutic peptides is supported by wild abilities of their synthesis, possibility of modifications, synthesis for specific action, minimizing the emergence of resistance. Clearly, all these studies are promising, and need to be expanded.

Přijato k publikování: 21. 5. 2014

Klíčová slova: antivirové peptidy, protivirová terapie, virus chřipky

Úvod

Součástí vrozeného a adaptovaného imunitního systému všech savců jsou peptidy¹, které vykazují účinnou chemickou obranu eukaryotických buněk proti bakteriím, houbám a virům². V současnosti jsou často diskutované peptidy se schopností inhibovat virové infekce jako je HIV, hepatitis, herpes simplex a v neposlední řadě virus chřipky³. Mimo přírodní peptidy vytvořené živočišnými organismy pro obranu před patogeny, je zde velký pokrok v jejich laboratorní přípravě. A to jak za pomoci bakteriofágů, tak syntézou umělou, obvykle na pevném nosiči⁴. Pomocí moderních metod, například knihovnou fágového displeje (Ph. D.), lze sledovat interakce mezi peptidem a virem, ale i navrhnout vhodné sekvence, které by vykazovaly nejvyšší účinnost proti danému viru⁵. Neméně užitečné jsou také softwarové programy umožňující provedení prediktivních studií, kterými je možné sledovat možnosti protein-protein, protein-peptid interakce a lze zaznamenat změny konformace původního proteinu⁶. Neméně studovanou oblastí antivirových pep-

tidů je jejich enkapsulace do nanotransportérů jako jsou liposomy nebo různé nanokonstrukty. Díky tomuto propojení lze na jedné straně zvýšit jejich selektivitu a účinnost ochranou proti biodegradaci v organismu a na straně druhé volbou vhodného transportéru lze zamezit jejich toxicitě vůči okolním buňkám v organismu⁷.

Chemické a fyzikální vlastnosti peptidů

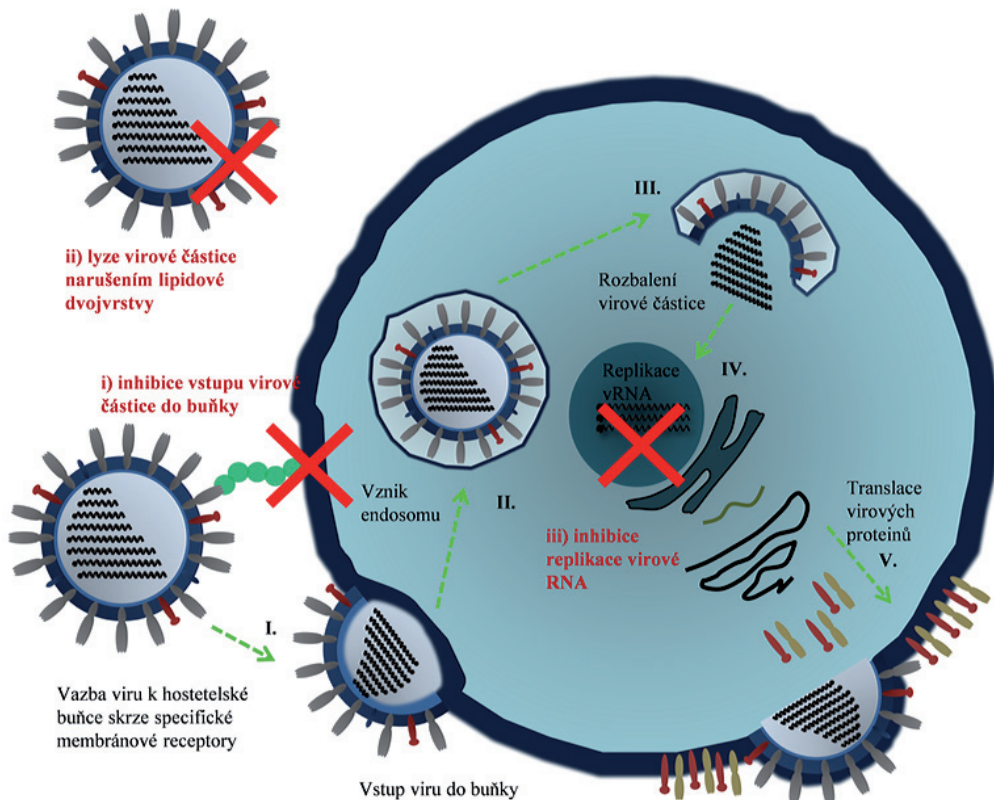
Primární struktura peptidu a případně z ní vyplývající sekundární struktura ovlivňují jeho výsledný náboj. Z tohoto pohledu lze peptidy rozdělit na anionické, a kationické. Anionické peptidy vykazují celkový náboj v rozmezí od -1 do -7 a je u nich běžná posttranslační modifikace při jejich biologické syntéze, která je klíčová pro antimikrobiální aktivitu. Kationické peptidy vykazují celkový náboj od +2 do +9 a amfipatické vlastnosti, které jim umožňují reagovat a narušovat lipidové membrány patogenních mikroorganismů⁸. Zatímco primární struktura je u většiny peptidů značně homologní, u sekundárních struktur dochází

ke značné konformační variabilitě. Na základě sekundární struktury peptidů je lze rozdělit na α -helikální peptidy tvořící nejpočetnější skupinu a konformaci β -listu, která se vyznačuje poměrně malým množstvím helikálních domén organizovaných dle amfipaticity. Mimo tyto dvě nejpočetnější skupiny se vyskytují peptidy s rozvolněnou strukturou, nebo uspořádané do smyčky. Všechny peptidy vykazují schopnost tvořit amfipatickou nebo amfilní konformaci, která je charakteristická periodicky se opakujícími úseky, ve kterých se střídají hydrofobní a hydrofilní domény ⁹. Díky různorodé struktuře peptidů se mění jejich hydrofobicita, velikost, náboj, amfipatie, úhly polárních vazeb tak stejně jako tyto vlastnosti určují jejich mechanismus účinku a specifitu,

kteřá je dána rozdíly ve složení a struktuře membrán savčích buněk a virů ¹⁰.

Interakce virů s peptidy

Interakce peptidů s částicí viru nejsou dosud komplexně prozkoumány, avšak byly obecně popsány tři mechanismy: i) peptidy interagují se složkami virové obálky a tím je dosažena inhibice adheze a invaze částice do hostitelské buňky, ii) peptidy naruší lipidovou dvojvrstvu virové obálky obdobně jako je tomu u patogeních mikroorganismů a dochází k lyzi částice, iii) peptidy inhibují replikaci virové RNA či DNA, většinou interakcí s virovou DNA/RNA polymerázou, která katalyzuje replikaci nukleové kyseliny ¹¹ (Obr. 1).



Obrázek 1: Schéma působení peptidů v protiviřivé terapii: i) peptidy interagují se složkami virové obálky a tím je dosažena inhibice adheze a invaze částice do hostitelské buňky, ii) peptidy naruší lipidovou dvojvrstvu virové obálky a dochází k lyzi částice, iii) peptidy inhibují replikaci virové RNA či DNA, většinou interakcí s virovou DNA/RNA polymerázou

Peptidy interagující se složkami virové obálky (blokátory vstupu)

Chřipkový virus je pleomorfní částice sférického nebo vláknitého tvaru. Virová RNA je uložena v helikoidální kapsidě a nukleokapsida je obalena lipidovou membránou, které na svém povrchu nese dva glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuramidiázu, zodpovědné za patogenitu viru¹². Působení antivirových peptidů je zaměřeno na interakci s těmito proteiny tím, že je omezena nebo zastavena jejich funkce a virus tak není schopen proniknout do hostitelské buňky¹³. Do této skupiny patří 20-ti aminokyselinový peptid, odvozený od signální sekvence růstového faktoru⁴ fibroblastů, který se specificky váže na chřipkový HA protein u většiny mutací chřipkových virů *in vivo* i *in vitro*. Mimo jiné vykazuje nízkou cytotoxicitou vůči tkáňovým buňkám¹⁴. Peptid C₁₇H₃₅CO-ARL-PRTMVHPKPAQP-NH₂ s konzervativní sekvencí ARLPR, který se přímo váže na podjednotku hemaglutininu byl navržen pomocí knihovny fágového displeje. Díky strukturální podobnosti s kyselinou sialovou blokuje vstup viru do hostitelské buňky. Další antivirové peptidy patří do skupiny cyklických delta defenzinů, tzv. retrocyklinů, které jsou tvořeny spojením N a C domény dvou peptidů^{13,15}. Předchozí studie potvrdily jejich schopnost inhibovat fúzi HIV viru s hostitelskou buňkou a podobným mechanismem přes HA také fúzi viru chřipky^{16,17}.

Peptidy působící na virovou obálku

Virová obálka se formuje z buněčné membrány hostitelských buněk^{18,19}. Obálky chřipkového viru jsou bohaté na sfingolipidy a cholesterol²⁰, který jim udává amfipatické vlastnosti a negativní náboj²¹ vytvářející elektrostatické membránové interakce s pozitivně nabitými kationickými antimikrobiálními peptidy^{22,23}. Peptidy náležící do skupiny katelicidinů jsou zapojeny do imunitního systému²⁴ a vykazují schopnost přímo deaktivovat virovou částici narušením lipidové dvojvrstvy²⁵. První izolovaný peptid z této skupiny je lidský LL-37 peptid²⁶. Jeho účinky byly studovány na viru způsobující neštovice (VACV), který patří do stejné rodiny jako chřipkový virus. Mechanismus účinku byl popsán pomocí kobercového modelu²⁵, kdy se

peptidy nevmezeřují do membrány, ale seřazují se paralelně k dvojvrstvě, setrvávají v kontaktu s lipidovými skupinami a pokrývají okolní oblast. Orientace peptidů vede k lokálním poruchám ve stabilitě membrány, což má za následek tvorbu trhlin, vytékání složek cytoplazmy, porušení membránového potenciálu a ve výsledku dezintegraci membrány. Dalším peptidem, u kterého byly prokázány antivirotické účinky je melitin (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂), který byl izolován z jedu včely evropské (*Apis mellifera*)^{27,28}. Bylo potvrzeno, že jeho primární struktura je schopna deformovat lipidovou dvojvrstvu, vytvářet umělé póry, což vede k protržení a lyzi virové částice²⁹. S tímto peptidem jsou spojovány dva mechanismy účinku; a to kobercový model³⁰ a model toroidního póru^{31,32}, který je charakteristický shlukem peptidů na povrchu mikrobiální membrány podobně jako je tomu u kobercového modelu. Následně dochází k postupnému vkládání peptidů do lipidové dvojvrstvy kolmo k mikrobiální membráně a tím dochází k její deformaci.^{33,34} Zcela odlišným mechanismem se vyznačují peptidy, které jsou schopné se koncentrovat v prostředí o nízkém pH (pHlip), například v místě infikované plicní tkáně. Tyto peptidy jsou ve vodě rozpustné membránové peptidy, slabě reagující s buněčnou membránou při neutrálním pH bez toho aniž by vstoupily do lipidové dvojvrstvy. Pokud je pH prostředí nižší než 7, pHlip peptidy vstoupí do membrány a vytváří stabilní transmembránové α -helix struktury, které lze využít jako nosič různých léčiv určených pro inaktivaci virové částice³⁵.

Peptidy, které jsou schopny inhibovat replikaci virové RNA

Pod virovým obalem se nachází strukturální matrixový protein M1 obalující molekulu RNA, nukleoprotein tvořící kapsidu a virovou RNA polymerázou, která je nezbytná pro virovou transkripci. Peptidová terapie je v tomto případě zacílena na interakci s virovou RNA polymerázou, která je složena ze tří proteinových podjednotek PB1, PB2 a PA, kódovaných třemi segmenty virového genomu^{36,37}. Polymerázový komplex se specificky naváže na 5'-konec genomové RNA, tím se aktivuje k vazbě na čepičku

buněčné mRNA. Dochází ke změně konformace genomové RNA do vlásenkové struktury, čímž se aktivuje endonukleáza polymerázového komplexu. Endonukleáza štěpí čepičku buněčné mRNA a dojde k vytvoření aktivního transkripčního komplexu³⁸. Antivirová terapie je v tomto případě zacílená na interakci mezi virovou polymerázou a peptidem, který navázáním na specifický úsek virové polymerázy zabrání jejímu rozštěpení a tím nedochází k transkripci virového genomu. Příkladem zmíněného způsobu inhibice je 25 aminokyselinový peptid odvozený z N domény PB1 podjednotky, kde navázáním na specifické místo trimeru způsobí narušení vazby PA-PB³⁹. V porovnání s ostatními druhy terapeutik přináší peptidy, které inhibují virus chřipky interakci s virovou polymerázou, mnoho výhod v antivirové terapii v porovnání s ostatními druhy léčiv. Oproti jiným terapeutikům mají odlišný mechanismus účinku a tím výrazně snižují pravděpodobnost křížové rezistence. Dále mají nepostradatelné aminokyseliny pro podjednotky PB1, PB2 a PA velmi konzervativní sekvence u všech kmenů viru chřipky a tím jsou účinné v širokém spektru virových rodů. V neposlední řadě je zde možnost zacílit odlišné interakční místa v polymerázovém komplexu, například mezi PA a PB1, tak jako mezi PB1 a PB2. Díky tomu lze vytvořit antivirový „koktejl“, který by měl značnou účinnost proti mutantům viru, které unikly působení protilátek⁴⁰.

Závěr

Chřipkové viry pravidelně způsobují každoroční epidemii, která prochází napříč světem. Současné terapeutické přístupy mají proti viru dostatečnou efektivitu, avšak díky častým mutacím chřipkového genomu dochází k rezistenci tohoto viru proti již některým používaným léčivům. Peptidová terapie představuje novou generaci antivirotik se širokým spektrem působení. Jejich účinek může být zacílený i na bakteriální infekce, které se často spouští po oslabení organismu vzniklou virózou. Antivirové působení peptidů závisí na jejich struktuře stejně tak jako na cíli inhibice virové částice. V tomto přehledu jsou uvedeny hlavní strategie antivirové terapie proti viru chřipky. Peptidy blokující vstup do

hostitelské buňky interagují s povrchovým glykoproteinem hemaglutininem a tím zabrání vstup virové částice do hostitelské buňky. Další skupina peptidů je schopna narušit lipidový obal viru a tím částici lyzovat a inaktivovat. Nejrozšířenějším modelem pro tyto interakce je kobercový model nebo model toroidního póru, avšak není vyloučeno, že ostatní peptidy mohou vykazovat další mechanismy účinku jako je model sudové skruže nebo micelárních agregátů. Neméně významnou skupinou jsou peptidy, které přímo inhibují replikaci viru a to interakcí s virovou RNA polymerázou. Antivirové peptidy se jeví jako perspektivní terapeutika nejen proti viru chřipky, ale také i pro ostatní virové onemocnění, například HIV, VACV nebo lidského papilomaviru (HPV).

Tato práce byla financována z projektu PGS17_2013

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Wiesner J., Vilcinskas A.: *Virulence*, 1, 440 (2010).
2. Lok S. M., Costin J. M., Hrobowski Y., Hoffmann A. R., Rowe D. K., Kukkaro P., Holdaway H., Chipman P., Fontaine K. A., Holbrook M. R., Garry R. F., Kostyuchenko V., Wimley W. C., Isern S., Rossmann M. G., Michael S. F.: *Plos One*, 7, (2012).
3. Albericio F., Kruger H. G.: *Future Medicinal Chemistry*, 4, 1527 (2012).
4. Saladino R., Botta G., Crucianelli M.: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 277 (2012).
5. Castel G., Chteoui M., Heyd B., Tordo N.: *Molecules*, 16, 3499 (2011).
6. Hetenyi C., van der Spoel D.: *Protein Science*, 11, 1729 (2002).
7. Rajendran L., Knoelker H.-J., Simons K.: *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 29 (2010).
8. Teixeira V., Feio M. J., Bastos M.: *Progress in Lipid Research*, 51, 149 (2012).
9. Doležilková I., Macková M., Macek T.: *Chemické Listy*, 105, 346 (2011).
10. Brogden K. A.: *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238 (2005).

11. Yang J., Li M. M., Shen X. T., Liu S. W.: *Viruses-Basel*, 5, 352 (2013).
12. Medina R. A., Garcia-Sastre A.: *Nature Reviews Microbiology*, 9, 590 (2011).
13. Cederlund A., Gudmundsson G. H., Agerberth B.: *Febs Journal*, 278, 3942 (2011).
14. Jones J. C., Turpin E. A., Bultmann H., Brandt C. R., Schultz-Cherry S.: *Journal of Virology*, 80, 11960 (2006).
15. Doss M., White M. R., Tecle T., Gantz D., Crouch E. C., Jung G., Ruchala P., Waring A. J., Lehrer R. I., Hartshorn K. L.: *Journal of Immunology*, 182, 7878 (2009).
16. Wang W., Cole A. M., Hong T., Waring A. J., Lehrer R. I.: *Journal of Immunology*, 170, 4708 (2003).
17. Doss M., Ruchala P., Tecle T., Gantz D., Verma A., Hartshorn A., Crouch E. C., Luong H., Micewicz E. D., Lehrer R. I., Hartshorn K. L.: *Journal of Immunology*, 188, 2759 (2012).
18. Nayak D. P., Barman S.: *Advances in Virus Research*, Vol 58, 58, 1 (2002).
19. Ono A., Freed E. O.: *Virus Structure and Assembly*, 64, 311 (2005).
20. Schaap I. A. T., Eghiaian F., des Georges A., Veigel C.: *Journal of Biological Chemistry*, 287, 41078 (2012).
21. Needham B. D., Trent M. S.: *Nature Reviews Microbiology*, 11, 467 (2013).
22. Anaya-Lopez J. L., Lopez-Meza J. E., Ochoa-Zarzosa A.: *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 180 (2013).
23. Mercer D. K., O'Neil D. A.: *Future Medicinal Chemistry*, 5, 315 (2013).
24. Barlow P. G., Svoboda P., Mackellar A., Nash A. A., York I. A., Pohl J., Davidson D. J., Donis R. O.: *Plos One*, 6, e25333 (2011).
25. Dean R. E., O'Brien L. M., Thwaite J. E., Fox M. A., Atkins H., Ulaeto D. O.: *Peptides*, 31, 1966 (2010).
26. Bals R., Wang X. R., Zasloff M., Wilson J. M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9541 (1998).
27. Raghuraman H., Chattopadhyay A.: *Bioscience Reports*, 27, 189 (2007).
28. Lee M. T., Hung W. C., Chen F. Y., Huang H. W.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5087 (2008).
29. Ladokhin A. S., White S. H.: *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1514, 253 (2001).
30. Lu N.-Y., Yang K., Li J.-L., Yuan B., Ma Y.-Q.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828, 1918 (2013).
31. Gordon-Grossman M., Zimmermann H., Wolf S. G., Shai Y., Goldfarb D.: *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 179 (2012).
32. Gordon-Grossman M., Gofman Y., Zimmermann H., Frydman V., Shai Y., Ben-Tal N., Goldfarb D.: *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 12687 (2009).
33. Oren Z., Shai Y.: *Peptide Science*, 47, 451 (1998).
34. Benachir T., Lafleur M.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1235, 452 (1995).
35. Li N., Yin L., Thevenin D., Yamada Y., Limmon G., Chen J. Z., Chow V. T. K., Engelman D. M., Engelward B. P.: *Future Microbiology*, 8, 257 (2013).
36. Neumann G., Brownlee G. G., Fodor E., Kawaoka Y.: *Biology of Negative Strand Rna Viruses: The Power of Reverse Genetics*, 283, 121 (2004).
37. Deng T., Sharps J., Fodor E., Brownlee G. G.: *Journal of Virology*, 79, 8669 (2005).
38. Martin-Benito J., Ortin J.: *Advances in Virus Research*, Vol 87, 87, 113 (2013).
39. Chase G., Wunderlich K., Reuther P., Schwemmler M.: *Methods*, 55, 188 (2011).
40. Palu G., Loregian A.: *Antiviral Research*, 99, 318 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Use of mass spectrometry technique (MALDI-TOF/TOF) for the characterization of metallothionein in biological systems

Miguel Angel Merlos Rodrigo^{a,b}, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic, European Union

^b Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00

Use of mass spectrometry technique (MALDI-TOF/TOF) for the characterization of metallothionein in biological systems

Metallothioneins (MTs) are intracellular, low molecular mass and cysteine-rich proteins having several interesting biological roles associated with the protection against DNA damage, oxidative stress and apoptosis. Recent developments in the mass spectrometry have brought clinical proteomics to the forefront of diagnosis and treatment of diseases, offering reliable, robust, and efficient analytical methods for discovery and monitoring of biomarkers. MALDI-TOF/TOF mass spectrometry has been proven an effective tool not only for analysis of MTs in biological samples, but also for the identification of its isoforms in various types of samples. Importantly, it has been reported that MTs play a role in oncogenesis and prognosis of cancer, and there is an evidence of possible involvement of these proteins in the development of the resistance of cancer cells to anticancer metal-based drugs including cisplatin as the most used cytostatics. We review MALDI-TOF profiling techniques as tools for the MTs detection in cancers.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

Klíčová slova: cancer biomarker, MALDI-TOF, metal, Metallothionein

Biochemistry of Metallothionein

Metallothioneins (MTs) were discovered in 1957 and identified as low-molecular weight sulfhydryl-rich proteins. MTs belong to a superfamily of intracellular metal-binding proteins, present in virtually all living organisms, with features common to the archetypal. MT was first isolated from horse kidney and characterized by Margoshes and Vallee¹. In this work, we wish to briefly summarize the current knowledge regarding the MT forms. All vertebrates examined contain two or more distinct MT isoforms designated MT-1 through MT-4. The three-dimensional structures of MTs from mammalian that have been determined so far show a monomeric protein composed of two globular domains, each encompassing a metal–thiolate cluster. The metallothionein isoform A (MTA) is a 64-residue metalloprotein, which contains essentially the same number of metal-chelating Cys–Cys and Cys–Xxx–Cys motifs (where Xxx

stands for any amino acid, other than Cys) and metal ions^{2,3}. These cysteine-rich proteins are localized in cytoplasm and some organelles, predominantly in mitochondria, where their presence is sensitively and strictly regulated by the oxidative state induced by mitochondrial respiration. Depending on the cell state, but especially presence of oxidative stress, MTs are rapidly translocated to the nucleus through nuclear pore complexes. MT localized in the nuclei is oxidized there and it is transported to cytosol; this system is balanced³.

Interaction of metallothionein and metals

MTs are currently classified into 15 families. Mammalian MTs are single-chain polypeptides of 61 to 68 amino acid residues. There are no free thiol groups, and divalent metals are bound by sulfur atoms in thiolate clusters with a tetrahedral geometry (or trigonal for Cu⁺).

The binding affinity varies between metals, with Cu having the greatest stability constant (10^{19} – 10^{17}) followed by Cd (10^{17} – 10^{15}) and then Zn (10^{14} – 10^{11}). As many as 18 different metals may associate with MT, but only Cu(I), Cd(II), Pb(II), Ag(I), Hg(II) and Bi(II) can displace Zn⁴. MT can incorporate up to 7 divalent metal or 12 monovalent Cu atoms per molecule. The Figure 1 shows the photos of 3-dimensional structure of MT isolated from liver rabbit liver without and with heavy metal. Cu⁺ binds in multiple stoichiometry with a minimum of 7 Cu(I)/mol⁵. MT has two subunits: the more stable a domain (C-terminal), which incorporates four divalent metal atoms, and the more reactive b-domain (N-terminal), which contains only three⁶. The three-dimensional protein structure of this was reported by both X-ray crystallography and NMR spectroscopy in the 1990s. Structural studies have shown that this unusual protein with 61 amino acids (mammalian MT) can bind with both essential metals (Zn and Cu) and toxic metals (Cd and Hg) in two distinct cluster structures within the molecule. One cluster is closer to the N-terminal and three metal atoms are bound to nine cysteines with three bridging sulfur atoms, while in the second cluster closer to the C-terminal and four metal atoms are bound to 11 cysteines with five bridging sulfur atoms⁷.

Metallothionein physiological functions

MTs have many important and crucial functions (Figure 2). Expression of MTs is induced by many factors including physical stress, chemical stress and endogenous factors^{8,9}. The most important of them includes detoxification of essential as well as non-essential heavy metal ions, such as Cd(II) or Hg(I, II), homeostasis and control of Zn(II) and Cu(II) ions and metal transfer reactions¹⁰. This role is still claimed by most authors working in the MT field and often supported by data from species ranging from fungi to mammals, which could explain the wide variety of MT isoforms¹¹. A copper-specific MT isoform was shown to preferentially bind 12 copper ions in the snail's taxonomic *Helix pomatia*¹². Thus, one of the most important MT functions consists in cell protection against free radicals¹³. It is clear that MT is induced by oxidative stress. Free oxygen radicals are associated with ubiquitous cell functions, especially by the mitochondrial electron transport system and by NADPH oxidase in cells. The danger of free radicals consists of the ability of damage to biomolecules, including proteins and polyunsaturated fatty acids, major components of cell biomembranes¹⁰, and protection against DNA damage^{14,15}.

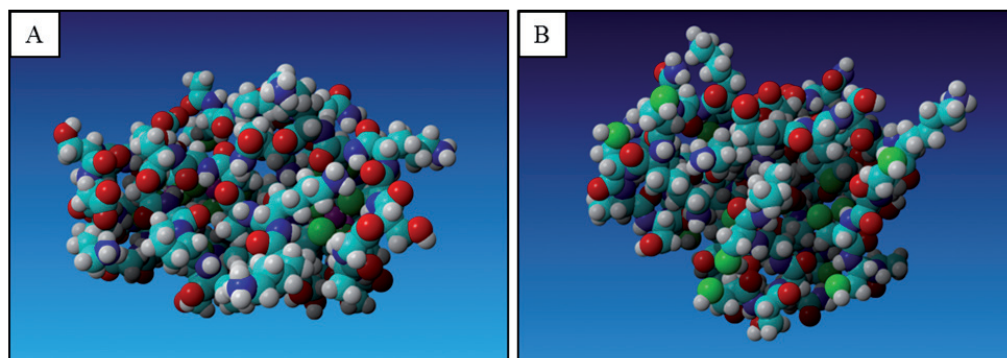


Figure 1: Photos of 3-dimensional structure of MT isolated from liver rabbit liver without (A) and with heavy metal (B). These photos were created by an advanced molecule editor (Avogadro 1.1.1) in our laboratory

Regulation of expression of metallothionein in biological systems

Although the metals, Zn, Cu, Cd, Hg, Au and Bi all induce MTs, Zn is the primary physiological inducer since, Cu excepted, the other metals can be regarded as environmental toxicants. Interestingly, nontoxic Cu levels do not induce MT, although it is often bound to MT in vivo. The binding of Zn to metal transcription factor (MTF-1) allows the protein to bind to metal response elements (MREs) in the promoter region which, in turn, initiates MT-gene transcription. It has been proposed that MTF-1 regulates the free zinc concentration by controlling the expression of MT as well as that of a Zn-transporter protein, ZnT-1¹⁶. The binding of Zn to MTs has proven to be a physiologically relevant. Several studies have produced strong evidence to support the idea that MTs function as zinc chaperones for the regulation of gene expression and activity of proteins, such as metalloproteins and metal-dependent transcription factors¹⁷. A hallmark of the mouse MT-1 and MT-2 genes is their transcriptional induction by Zn and Cd. Essential for this induction are DNA motifs, termed metal response elements (MRE), present in multiple copies in the proximal promoters of MT genes. MREs were shown to confer response to Zn and Cd and to oxidative stress^{18,19}.

Metallothionein and tumor pathology

A number of studies have demonstrated the presence or enhanced synthesis of MTs in rapidly proliferating normal cells, regenerating cells and cancer cells²⁰. MTs have been shown to protect cells against the cytotoxic effects of electrophilic anticancer drugs. The enhanced expression of MT in cells induces the antiapoptotic effects and a lack of MT in MT-null cells increases the susceptibility to apoptotic cell death after exposure to certain anticancer drugs²¹. MTs have also been shown to be involved in the development of resistance to anticancer drug cisplatin, one of the most widely used chemotherapeutic metal-based drugs. The increase in cellular content of MTs was considered to be a possible biomarker of resistance to treatment with cisplatin^{21,22}. MT overexpression has been revealed in variety of human tumors. Positive correlation between MT overexpression and aggressive biological behaviour as well as poorer prognosis have been found in many of them (e.g. for carcinomas of urinary and digestive tract, breast cancers, lung carcinomas, squamous cell carcinomas of oral cavity and larynx as well as malignant melanoma)²³⁻²⁶. Knocking down MT1X by siRNA could sensitize cells to cisplatin through increased apoptosis of cancer cells and inhibition of cell proliferation. The study suggests that inhibitors of MT1X

may have potential therapeutic application in inducing apoptosis in oral squamous cell carcinoma. These findings may help in the developing better cancer chemotherapy strategies²⁷. Moreover, MTs might be involved in the protection against *Helicobacter pylori* induced-gastric chronic inflammation associated with gastric carcinogenesis²⁸. p53, p21, BAX, c-kit, and MTs may have different

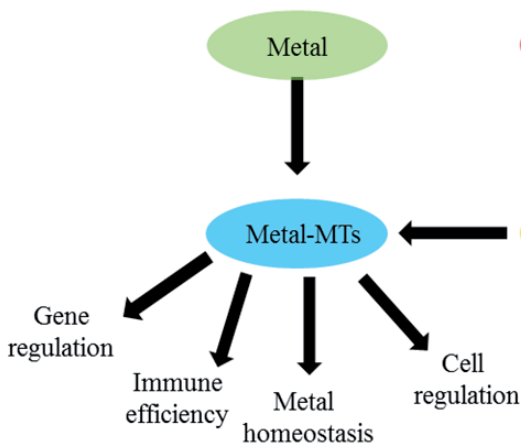


Figure 2: Overview of MT function

roles in the pathogenesis of ovarian tumors. p53 and MTs may be helpful in the typing the borderline and malignant ovarian tumors²⁹.

Different studies have shown that MT has important functions in hematopoietic cells; these studies consider also possible role of MTs in these cells. MT has been reported to be involved in the differentiation and proliferation of hematopoietic cells^{30,31}, and prevention of apoptosis³². The MT1A, E, X and MT2A isoforms have been revealed to play an important function in prostate cancer. It has been shown that MT1 and MT2 isoforms may be related to the proliferative activity of breast, colon and prostate human cancers^{33,34}. Five isoforms of MT were overexpressed in non-small cell lung cancer; overexpression of the MT1F and MT2A isoforms predicted patient's poor prognosis. Both these isoforms might be involved in progression of this type of cancer; this fact has been confirmed by the correlation analysis of up-regulated MT1F expression, size of primary tumor and rate of grade of malignancy³⁵. Connection between zinc and MTs in central nervous system is still studied. In the central nervous system, zinc is released along with glutamate during neurotransmission and, in excess, can promote neuronal death. Experimental studies have shown that MT1 and MT2, which chelate free zinc, can affect seizures and reduce neuronal death after status epilepticus³⁶. MTs have role in the pathogenesis of autoimmune diseases. The expression of MT1 and MT2 and the concentrations of Zn and Cu in tissues of the brain, spinal cord and in the liver during the periods of attacks and remissions in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis have been estimated to have a role in the disorders of central nervous system. This data, obtained by clinical assessment, immunohistochemistry and inductively coupled plasma spectrometry, showed that MT1 and MT2 were markedly up-regulated in the subarachnoid regions and perivascular space in astrocytes, microglia and spinal neurons; copper in the liver was significantly increased³⁷.

MALDI-TOF-MS as an analytical technique for the detection of Metallothionein

Recent developments in mass spectrometry have introduced clinical proteomics to the fo-

refront of diseases diagnosis, offering reliable, robust and efficient analytical method for biomarker discovery and monitoring.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) offers high sample throughput and the flexibility to couple with different off-line sample fractionation techniques. MALDI-TOF MS is an extremely sensitive technique that permits the detection of chemical and biological compounds at abundances below sub-femtomole (< 10⁻¹⁵ mol). The technique offers soft ionization potential, a relatively low degree of fragmentation, and uncomplicated spectra comprised of mostly singly charged ions³⁸. MALDI-TOF is a powerful tool for surveying proteins and peptides comprising the realm for clinical analysis. MALDI-TOF MS has the potential to revolutionize cancer diagnostics by facilitating biomarker discovery, enabling tissue imaging and quantifying biomarker levels³⁹.

Detection of metallothionein

Andon et al. established a method for the separation and characterization of rabbit liver MTs subisoforms by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (CE-ESI-TOF MS). The analysis described here revealed the presence of the apothioneins MT1a, MT1d, and MT1e, belonging to MT1 sample, and MT2a, MT2b, and MT2c belonging to MT2. Similar results were found when MALDI-TOF experiments were performed; they enable to identify all the sequenced rabbit liver MTs as apo-MT-forms, as in the CE-ESI-TOF MS coupling⁴⁰. Other study verified that the subisoforms of MT in rabbit liver have a different apparent molecular mass under different conditions. This experiment predicted that there probably exist a stable peptide structure of MT2 using MALDI-TOF MS to study the subisoforms of MTs and get their exact primary structure⁴¹. Moreover, two-dimensional gel electrophoresis (2DGE), MALDI-TOF MS, the peptide mass fingerprinting (PMF) map, and bioinformatic analysis used for studying differentially expressed proteins between multidrug resistant cells HL-60/DOX and drug sensitive cells HL-60 of

acute myeloblastic leukemia were potential methods for identification of proteins in these cells. The results revealed presence of MTs only in HL-60 cells⁴².

Cancer

MALDI-TOF MS acts as one of the most comprehensive and versatile tools for research in proteomics⁴³. Wang et al. have shown a simple and rapid method for identification of MTs isoforms in cultured human prostate cells (RWPE-1 cell line) by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry⁴⁴ and they demonstrated that MS method allows correlation between expression of isoform-specific proteins and expression of isoform-specific mRNA by providing information about expression of MTs isoforms in a rapid fashion. The lack of publications is well evident in the area of MALDI analysis of MTs in cancer. For example, MALDI imaging of cancer tissue could be very beneficial to confirm hypotheses about possible connection of MTs with matrix metalloproteinases, which due to presence of zinc ions in peripheral tumor tissue⁴⁵.

Anticancer drugs

The MALDI-TOF MS was used for comparative study focused on interactions of cisplatin and ruthenium arene anticancer complexes with MTs. The results showed that the novel ruthenium arene anticancer complexes are much less reactive with thiol-rich MTs, which overexpression in the cancer tissues is closely connected with increased resistance to cisplatin. This finding may be helpful to understand better the distinct pharmacological profile of ruthenium arene anticancer complexes, such as reduced toxicity and no cross-resistance to cisplatin²². Platinum(II) complexes have been demonstrated to form covalent bonds with sulfur-donating ligands (in MTs, GSH and other sulfur-containing biomolecules) or coordination bonds with nitrogen-donating ligands (such as histidine and guanine). Terpyridine platinum(II) (TP-Pt(II)) complexes was used as model system. Moreover, it has been demonstrated that the TP-Pt(II) complex formed a covalent bond with the active-site cysteine residue in two other types of cysteine

protease by using MALDI-TOF MS. This results showed unequivocally that TP-Pt(II) complexes can selectively bind into the active site of most of cysteine proteases and can be useful in the design of new platinum(II) compounds with promising anti-cancer, anti-parasitic or anti-viral activities⁴⁶.

MALDI-TOF optimization for metallothionein determination in cancer cells

In this review, we summarize the different parameters and materials used in the detection and identification of MTs in biological samples (matrixes) by MALDI-TOF MS. Researchers have discussed the importance of choosing the matrix, conditions of crystallization of the matrix and analyte, concentration of matrix, and the use of matrix additives, for different proteins and peptides elsewhere. The matrix consists of small organic compounds, which show strong resonance absorption at the applied laser wavelength. Pulsed laser systems are used to enable an explosive disintegration of a laser-light-excited matrix-analyte volume, and thus subsequent desorption with ionisation. In the most of the studies reviewed, 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) were the constituents of matrix used for appropriate determination of MTs^{44, 47}. In few studies published focused on the determination of MTs in cancer tissues by MALDI-TOF MS, both 2,5-DHB and CHCA were used for detection and the samples of MTs were prepared in TFA and ACN in different concentrations (50% ACN containing 0.1% TFA or 30% ACN with 0.1% TFA) for obtain better signal⁴⁴. An increase in the intensity and the signal-to-noise ratio of peaks (signals) of peptide in MALDI-TOF mass spectra was observed benefit of the addition of ammonium monobasic phosphate to samples. Combining both of the approaches, addition of ammonium salts into the CHCA matrix followed by one post-crystallization washing step with ammonium buffer provided a substantial improvement of the sensitivity of MALDI-MS detection compared to unwashed sample spots. This method of

preparation of sample is necessary to improve quality of spectra obtained and is essential for successful searching in databases for subnanomolar concentrations of protein digests⁴⁸.

Conclusion

Despite impressive scientific, medical and technological achievements over the past few decades, cancer is still a leading cause of death, largely because most cancer patients are diagnosed when disease is advanced. The early detection is associated with improved survival rates. The MALDI-TOF/TOF mass spectrometry has the potential to revolutionize cancer diagnostics by facilitating biomarker discovery and quantifying biomarker levels. Also the role in cancerogenesis and the potential applicability of MT as a biological marker of disease progress is in the centre of interest. Large number of studies have been published demonstrating benefits of MT in cancer diagnostics. As summarized, MALDI-TOF MS is a rapid and simple method for identification and characterization of MT isoforms in cancer cells.

This work was supported from PGS19_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Reference

1. Tan, Y., et al., Metallothionein expression and nuclear size-in benign, borderline, and malignant serous ovarian tumours. *Journal of Pathology*, 1999. 189(1): p. 60-65.
2. Vasak, M. and D.W. Hasler, Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000. 4(2): p. 177-183.
3. Babula, P., et al., Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 2012. 4(8): p. 739-750.
4. Kagi, J.H.R. and M. Vasak, CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF METALLOTHIONEIN. Highlights of Modern Biochemistry, Vols 1-2, ed. A. Kotyk, et al. 1989, Zeist: Vsp Bv. 299-308.
5. Chen, P., et al., Stoichiometry and cluster specificity of copper binding to metallothionein: Homogeneous metal clusters. *Biochemical Journal*, 1996. 317: p. 395-402.
6. Coyle, P., et al., Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002. 59(4): p. 627-647.
7. Thirumoorthy, N., et al., A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 2011. 9.
8. Trnkova, L., et al., Paramagnetic antibody-modified microparticles coupled with voltammetry as a tool for isolation and detection of metallothionein as a bioindicator of metal pollution. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011. 13(10): p. 2763-2769.
9. Cai, L., et al., Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*, 1999. 132(2-3): p. 85-98.
10. Ruttkay-Nedecky, B., et al., The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. 14(3): p. 6044-6066.
11. Carpena, E., G. Andream, and G. Isam, Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2007. 21: p. 35-39.
12. Gehrig, P.M., et al., Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: Evidence for metal-binding cooperativity. *Protein Science*, 2000. 9(2): p. 395-402.
13. Bizon, A., et al., Changes in pro/antioxidant balance in smoking and non-smoking pregnant women with intrauterine growth restriction. *Reproductive Toxicology*, 2011. 32(3): p. 360-367.
14. Cai, L., J.B. Klein, and Y.J. Kang, Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(50): p. 38957-38960.
15. Chiaverini, N. and M. De Ley, Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radical Research*, 2010. 44(6): p. 605-613.
16. Langmade, S.J., et al., The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(44): p. 34803-34809.
17. Jacob, C., W. Maret, and B.L. Vallee, Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. 95(7): p. 3489-3494.
18. Andrews, G.K., Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 2000. 59(1): p. 95-104.
19. Giedroc, D.P., X.H. Chen, and J.L. Apuy, Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): Structure, function, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001. 3(4): p. 577-596.
20. Thirumoorthy, N., et al., Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology*, 2007. 13(7): p. 993-996.
21. Takahashi, S., Molecular functions of metallothionein and its role in hematological

- malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 2012. 5.
22. Zhang, G.X., et al., A comparative study on interactions of cisplatin and ruthenium arene anticancer complexes with metallothionein using MALDI-TOF-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011. 307(1-3): p. 79-84.
 23. Zamirska, A., et al., Expression of Metallothioneins in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Actinic Keratosis. *Pathology & Oncology Research*, 2012. 18(4): p. 849-855.
 24. Ohshio, G., et al., Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1996. 122(6): p. 351-355.
 25. Cardoso, S.V., et al., Expression of Metallothionein and p53 Antigens are Correlated in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*, 2009. 29(4): p. 1189-1193.
 26. Joseph, M.G., et al., Metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung - Correlation with other molecular markers and clinical outcome. *Cancer*, 2001. 92(4): p. 836-842.
 27. Peng, B., et al., Microarray-Assisted Pathway Analysis Identifies MT1X & NF kappa B as Mediators of TCRP1-Associated Resistance to Cisplatin in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, 2012. 7(12).
 28. Mita, M., et al., Metallothionein deficiency exacerbates chronic inflammation associated with carcinogenesis in stomach of mice infected with *Helicobacter pylori*. *Journal of Toxicological Sciences*, 2012. 37(6): p. 1261-1265.
 29. Ozer, H., et al., Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors. *Diagnostic Pathology*, 2012. 7.
 30. Duval, D., et al., Apoptosis and differentiation commitment: novel insights revealed by gene profiling studies in mouse embryonic stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 2006. 13(4): p. 564-575.
 31. Bagheri, P.M., et al., Differential quantitative zinc-induced expression of human metallothionein isogenes in haematopoietic precursor cell lines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2009. 23(2): p. 124-131.
 32. Abdel-Mageed, A.B., et al., Erythropoietin-induced metallothionein gene expression: Role in proliferation of K562 cells. *Experimental Biology and Medicine*, 2003. 228(9): p. 1033-1039.
 33. Cherian, M.G., A. Jayasurya, and B.H. Bay, Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003. 533(1-2): p. 201-209.
 34. Jin, R.X., et al., Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathology & Oncology Research*, 2004. 10(2): p. 74-79.
 35. Werynska, B., et al., Metallothionein IF and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients. *Experimental and Molecular Pathology*, 2013. 94(1): p. 301-308.
 36. Peixoto-Santos, J.E., et al., Increased Metallothionein I/II Expression in Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Plos One*, 2012. 7(9).
 37. Jakovac, H., et al., Time-course expression of metallothioneins and tissue metals in chronic relapsing form of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histology and Histopathology*, 2011. 26(2): p. 233-245.
 38. Cho, Y.T., et al., Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 2013. 415: p. 266-275.
 39. Merlos, M., et al., MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014. Volume 95 p. Pages 245-255.
 40. Andon, B., J. Barbosa, and V. Sanz-Nebot, Separation and characterization of rabbit liver apothioneins by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2006. 27(18): p. 3661-3670.
 41. Zhao, R., et al., Separation of rabbit liver metallothionein sub-isoforms by RP-HPLC with MALDI-TOF-MS detection. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 2002. 23(6): p. 1086-1090.
 42. Chen, C.Y., et al., Proteomic analysis on multi-drug resistant cells HL-60/DOX of acute myeloblastic leukemia (vol 48, pg 115, 2005). *Chinese Journal of Physiology*, 2005. 48(4): p. 230-230.
 43. Zhang, Y., et al., On-plate enrichment methods for MALDI-MS analysis in proteomics. *Analytical Methods*, 2012. 4(9): p. 2622-2631.
 44. Wang, R.Y., et al., Simple method for identification of metallothionein isoforms in cultured human prostate cells by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(12): p. 4433-4441.
 45. Zitka, O., et al., Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 2010. 17(31): p. 3751-3768.
 46. Lo, Y.C., et al., Terpyridine Platinum(II) Complexes Inhibit Cysteine Proteases by Binding to Active-site Cysteine. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2011. 29(2): p. 267-282.
 47. Zhang, G., et al., A comparative study on interactions of cisplatin and ruthenium arene anticancer complexes with metallothionein using MALDI-TOF-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011. 307(1-3): p. 79-84.
 48. Smirnov, I.P., et al., Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2004. 76(10): p. 2958-2965.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Magnetizovatelné mikro a nanočástice pro barkódování unikátních sekvencí

Kristýna Číhalová^a, Dagmar Chudobová^a, Pavel Kopel^{a,b}, Marie Konečná^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Magnetic micro and nanoparticles for unique sequences barcoding

This review is focused on identification of bacterial species by their antigens by barcoding oligonucleotides by application of magnetic micro and nanoparticles. In the first part of this review is discussed the structures and types of magnetic particles and their synthesis. In the next and the most important part we described the principle and the existing status of barcoding system and antigens markers for identification of organisms such as animals, plants and microorganisms.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

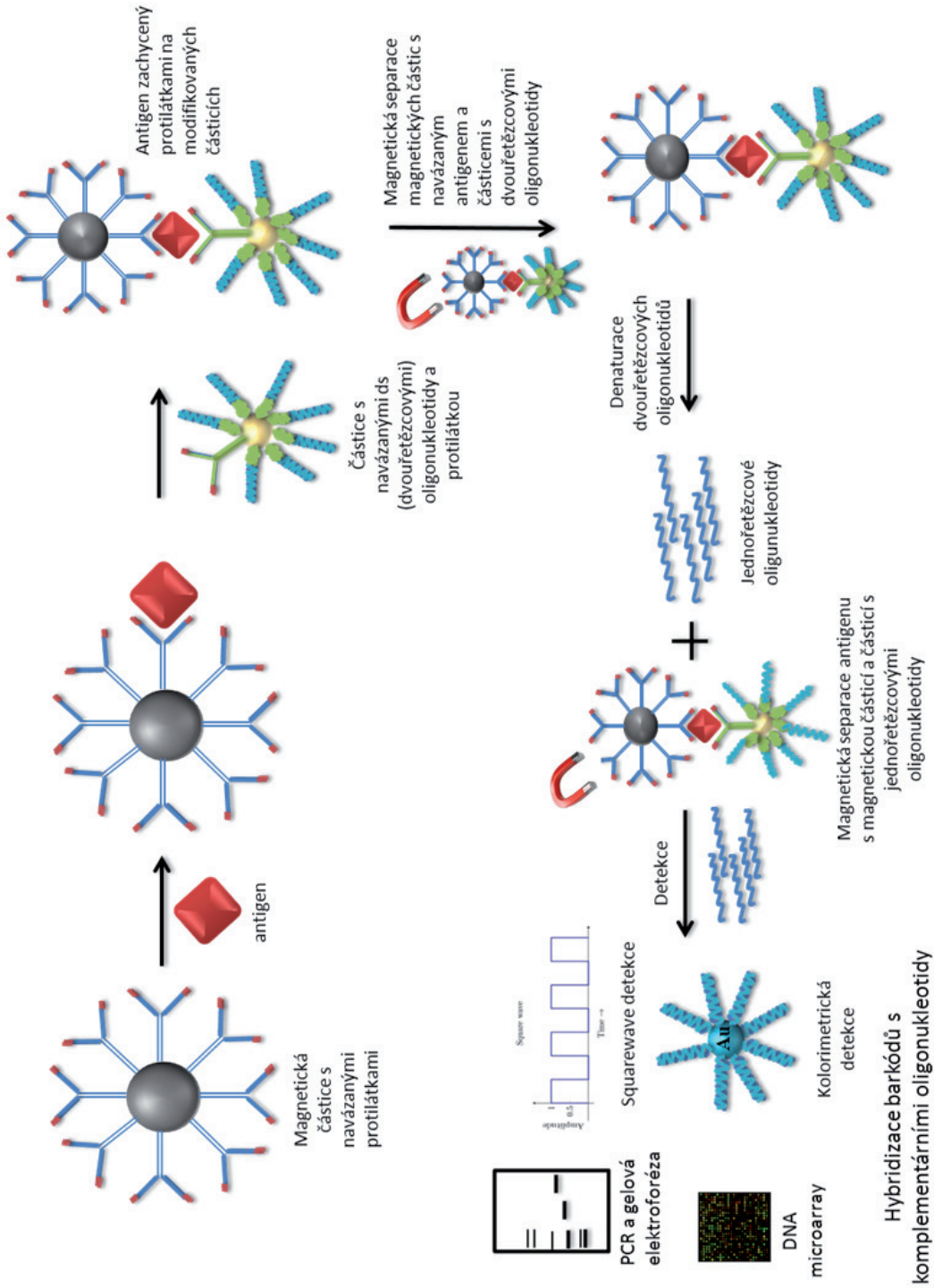
Klíčová slova: magnetické mikročástice, magnetické nanočástice, modifikace, barkódování, oligonukleotidy

Úvod

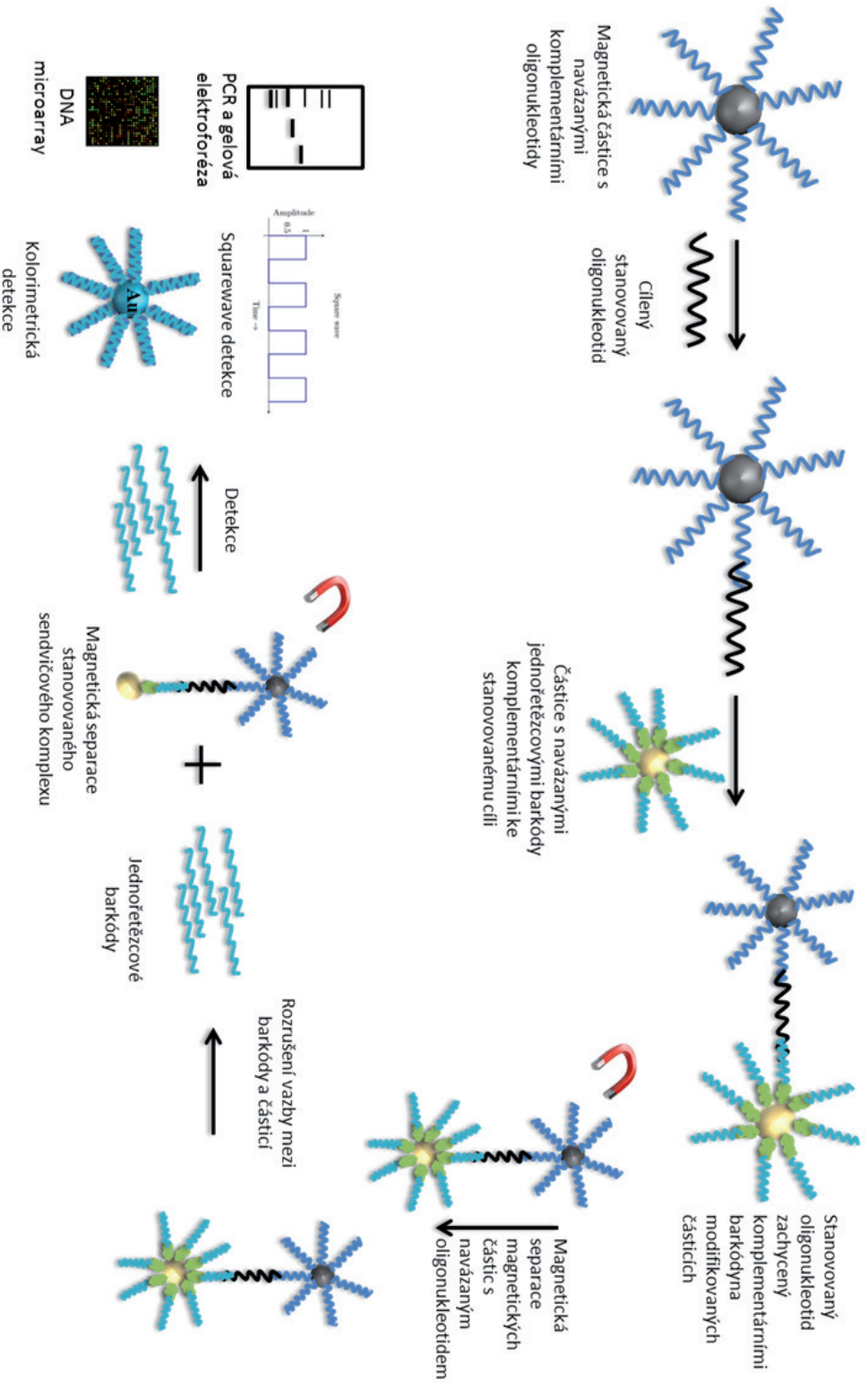
Magnetizovatelné mikro a nanočástice jsou v současnosti jedním z nejvyužívanějších nástrojů moderního biochemického a molekulárně biologického výzkumu. Postupně se jejich využití dostává i do lékařské praxe, kde jsou v podobě kontrastních látek využívány pro zobrazování pomocí magnetické rezonance¹ či cílenému transportu léčiv². Tyto částice nalézají využití hlavně v separaci a transportu jednotlivých molekul (nukleové kyseliny, proteiny), ale i celých buněk. Pro své fyzikální vlastnosti a možnosti modifikace povrchu jsou nedílnou součástí diagnostiky, kde jsou využívány pro extrakci biologicky důležitých látek z tělních tekutin³. Magnetizovatelné mikro a nanočástice představují nové unikátní nástroje pro separaci a následnou senzitivní detekci biomolekul DNA, proteinů a metabolitů. V následujících letech lze očekávat jejich další velmi významný rozvoj⁴.

Pod názvem biobarcode assay se ukrývá technologie, která je kombinací imunochemických reakcí a polymerázové řetězové reakce (**Obr. 1**). Jedná se o metodu časově náročnou, ale na druhou stranu je její nespornou výhodou vysoká citlivost, která je přibližně 100krát vyšší než ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay) metody⁵. Metoda je založena na sendvičové imunoreakci⁴. Sledovaný analyt se váže pomocí specifických protilátek mezi magnetickou partikulí a částicí značenou určitou DNA sekvencí, barkódem DNA. Pro multiplexní analýzu má každý měřený parametr svou vlastní dvojici partikulí. Vzniklý imunokomplex se z roztoku separuje působením magnetického pole. K detekci se využívá pro analyt specifická nukleotidová sekvence uvolněná z partikulí. Pro stanovení barkódové DNA je možné využití běžných metod a modifikací PCR (polymerase chain reaction) techniky⁶. Hebert et al. (2003) je toho názoru, že taxonomický systém se hroutí, a proto je důležité věnovat se vývoji identifikace a zařazování bakterií pomocí oligonukleotidových sekvencí^{7,8}. Naopak Packer et al. (2009) tvrdí, že nynější systematika bakteriálních druhů je bezproblémová⁹. Nicméně zdá se, že začínající fáze vývoje používání barkódování je velmi efektivní. Vzhledem k velmi široké biodiverzitě bylo ale zatím zahájeno velmi málo experimentů. Rozvoj digitalizace barkódování je tak stále v počátcích¹⁰.



Obr. 1: Izolace antigenu pomocí protilátek, oligonucleotidů a magnetickou separací s následnou detekcí navázání odseparovaného oligonucleotidu ke komplementárním oligonucleotidům pomocí různých metod



Obř. ř. 2: Izolace oligonukleotidů pomocí komplementárních oligonukleotidů na magnetické částici a na částici s barkódovými oligonukleotidy, komplementárními zátověň na stanovovaný oligonukleotid. Magnetickou separací s následnou detekcí navázání odseparovaného oligonukleotidu ke komplementárním oligonukleotidům pomocí různých metod.

Spojením magnetických nosičů, v podobě magnetických nano (velikost do 100 nm) a mikro částic, s biologicky aktivní látkou lze dosáhnout unikátních vlastností vzniklých materiálů využitelných v biochemii, molekulární a buněčné biologii, nanobiotechnologii, nanomedicině a jinde^{17,18}. Cílové molekuly je tak možné separovat i ze složitých biologických systémů jako jsou buněčné suspenze, homogenity či fermentační média¹⁹. Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů biologicky aktivních látek jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa - magnetit a maghemit²⁰, s příslušnou modifikací s vhodnou afinitou k vázané látce²¹. Unikátní magnetické vlastnosti nanočástic, spolu s jejich velkým specifickým povrchem umožňujícím navázat velké množství ligandů, jsou podstatou jejich využití jako efektivních nosičů pro účinnou a rychlou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek²².

Modifikace magnetických částic pro barkódování

K detekci organismů prostřednictvím barkódování pomocí magnetických částic se běžně používá jako vhodná modifikace magnetických částic streptavidin, který tvoří silnou specifickou vazbu s biotinem, na který je možné navázat příslušný, biotinem modifikovaný oligonukleotid sloužící k zachycení komplementárního proteinu²³. Dalším vhodným modifikátorem povrchu magnetických částic je zlato, nebo použití zlatých mikro či nano částic. Příslušný oligonukleotid značený thiolovou skupinou zajistí pevnou vazbu mezi zlatou částicí a oligonukleotidem²⁴. Další možností modifikace magnetických částic pro vazbu s oligonukleotidy je použití 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) nebo 3-[2-(2-aminoethylamino)-ethylamino]-propyltrimethoxysilane (AEEA) tvořící povrchové amino skupiny, které zachycují oligonukleotidy²⁵.

Barkódování unikátních sekvencí Mikrobiologické rozmanitosti a barkódování DNA pro mikrobiální společenstva

Barkódování se používá jako účinný nástroj pro identifikaci již známých druhů a objevování druhů nových. Rozpoznávání vzorků vede díky proteinové rozmanitosti k alternativnímu postupu identifikace od jednotlivého kmene až ke konkrétnímu poddruhu organismu²⁶. Unikátními sekvencemi jsou geny, které se v haploidním genomu vyskytují pouze v jedné kopii nebo několika málo kopiích. Také to mohou být antigeny specifické pro jednotlivé druhy²⁷ a díky jim a jejich vazby ke komplementárním oligonukleotidům nebo protilátkám lze tyto druhy pomocí knihoven zařadit²⁸. Značný počet bakterií není kultivovatelný, protože netvoří kolonie na agarových živných půdách. Proto je velkou výzvou pro mikrobiology vyvíjet další možnosti identifikace bakterií bez jakékoli selektivity²⁹, jen díky použití specifických antigenů³⁰.

Barkódování unikátních sekvencí

Klíčem barkódování je separace antigenů sendvičovou metodou pomocí částic, na kterých jsou navázány oligonukleotidy. Částice nesou specifické protilátky. V tomto případě je protilátka komplementární ke stanovovanému druhu bakterie, k jeho specifickému povrchu²⁴.

K protilátkám na modifikované magnetické částici je navázaná protilátka, pomocí které chceme stanovit přítomnost antigenu, který je typický pro stanovované buňky. Antigen stanovované buňky, je zachycen další, specifitější protilátkou, která je navázaná na další částici s oligonukleotidy. Tento magnetický komplex je odseparován z roztoku obsahující přebytečné částice s dvouřetězcovým oligonukleotidem a získáme roztok pouze s komplexem obsahující antigen. Denaturací dvouřetězcových oligonukleotidů je získán komplex s magnetickou částicí, antigenem a s částicí, která je pokryta již jednořetězcovými oligonukleotidy a oddělené jednořetězcové oligonukleotidy. Komplex s magnetickou částicí, antigenem a částicí s jednořetězcovým oligonukleotidem je magneticky odseparován a roztok obsahující pouze

jednořetězcové oligonukleotidy je použit pro detekci^{31–33}. Tyto oligonukleotidy mohou být potvrzeny pomocí elektrochemických metod³⁴, kolorimetricky³⁵, gelovou elektroforézou³⁶ nebo pomocí DNA microarray³⁷ (**Obr. 1**).

Na stanovovaný oligonukleotid je navázán oligonukleotid komplementární k levému konci stanovovaného oligonukleotidu na modifikované magnetické částici. Pravý konec stanovovaného oligonukleotidu je zachycen druhým komplementárním oligonukleotidem na další částici modifikované barkódy. Vzniklý magnetický sendvičový komplex je odseparován z roztoku obsahující přebytečné nenavázané částice komplementární k pravému konci oligonukleotidu. Po odštěpení jednořetězcových barkódů z částic dochází k magnetické separaci magnetického komplexu^{38,39} a následná detekce přítomných barkódů stejnými metodami jako je zmíněno výše (**Obr. 2**).

Lze tedy poznamenat, že metoda je využitelná jak pro stanovení oligonukleotidů, tak pro jakýkoliv další antigen.

Porovnání rutinní identifikace bakteriálních druhů s barkódováním

Hlavním problémem při konvenční identifikaci druhů je fenotypová flexibilita a genetická variabilita znaků, které vedou k identifikaci jiných druhů organismů, což směřuje k nepřesným výsledkům⁴⁰. Naopak použití metody barkódování DNA se při identifikaci druhů ukázalo být rychlejší, přesnější, z ekonomického hlediska výhodnější a časově nenáročné. Automatizovaný proces barkódování může klasifikovat velké počty vzorků ve stejnou dobu, například 1000 a více vzorků za den. Barkódování je tedy podle všeho perspektivní metoda ve srovnání s tradičními postupy⁴¹.

Závěr

Barkódování DNA poskytuje taxonomický význam, výsledky v populační genetice, fylogenezi a výpočetní biologii pro záznam na základě barkódu. Zpočátku bylo barkódování DNA navrženo pro identifikaci živočichů, kdy Hebert et al. (2003) testovali gen k identifikaci druhů ptáků pomocí barkódování DNA. Vědci zkoušeli gen mitochondriálního cytochromu

c oxidázy (COI), který vykazuje nižší vnitrodruhovou variabilitu bazí než mimodruhovou a slouží globálně jako jádro bioidentifikace zvířat⁷. Od té doby byla COI sekvence využita jako indikátor u většiny živočišných kmenů, včetně obratlovců⁴² a bezobratlých⁴³. V uplynulých letech se barkódování projevilo jako atraktivní nástroj, který pomůže vyřešit taxonomické nejasnosti⁷, ukázat biodiverzitu a podpořit aplikaci ochrany přírody^{44,45}. Databáze sekvencí DNA se rozrůstá o více než 100 000 vzorků za rok. Identifikace organismů pomocí jejich antigenů a protilátek může probíhat stejným způsobem jako snímač čárového kódu v supermarketu¹⁰. To znamená, že musí být stále rozvíjena digitalizace barkódů DNA. Tak by mohla být v budoucnu pro identifikaci vzorků použita jakási čtecí zařízení, která podle databáze určí, díky detekované sekvenci DNA, druh organismu. První etapou tohoto systému je vytvoření spojení identifikace unikátní sekvence pomocí barkódování DNA s digitalizačními zařízeními⁴⁶. S rozvojem sekvenování a výpočetní techniky mají vědci jak z různých genomických center, tak z akademických obcí standardizované sekvence DNA pro identifikaci mikroorganismů pomocí krátkých sekvencí⁴⁷. Mnoho sekvencí, unikátních pro vybraný druh mikroorganismu, je evidováno ve veřejných databázích. Identifikace bakteriálních druhů pomocí digitálního barkódování DNA je vizí moderních identifikačních technik, a proto je třeba podstupovat výzkumné kroky, které pomohou tuto metodu zavést do odvětví vyžadujících přesnou a rychlou identifikaci bakterií jako je lékařská, potravinářská, ekologická či environmentální praxe.

Tato práce byla financována z projektu PGS18_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Yezhelyev M. V., Gao X., Xing Y., Al-Hajj A., Nie S. M., O'Regan R. M.: *Lancet Oncology*, 7, 657 (2006).
2. Gupta A. K., Gupta M.: *Biomaterials*, 26, 3995 (2005).
3. Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T.: *Electroanalysis*, 19, 755 (2007).
4. Hill H. D., Mirkin C. A.: *Nature Protocols*, 1, 324 (2006).
5. Tang S. X., Zhao J. Q., Storhoff J. J., Norris P. J., Little R. F., Yarchoan R., Stramer S. L., Patno T., Domanus M., Dhar A., Mirkin C. A., Hewlett I. K.: *Jaids-Journal of Acquired Immunity Deficiency Syndromes*, 46, 231 (2007).
6. Nam J. M., Thaxton C. S., Mirkin C. A.: *Science*, 301, 1884 (2003).
7. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., DeWaard J. R.: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, 313 (2003).
8. Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R.: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, S96 (2003).
9. Packer L., Gibbs J., Sheffield C., Hanner R.: *Molecular Ecology Resources*, 9, 42 (2009).
10. Merker J. D., O'Grady N., Gojenola L., Dao M., Lenta R., Yeakley J. M., Schrijver I.: *PeerJ*, 1, e91 (2013).
11. Vainshtein M., Belova N., Kulakovskaya T., Suzina N., Sorokin V.: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41, 657 (2014).
12. Kilianova M., Pucek R., Filip J., Kolarik J., Kvitok L., Panacek A., Tucek J., Zboril R.: *Chemosphere*, 93, 2690 (2013).
13. Asgharinezhad A. A., Mollazadeh N., Ebrahimezhad H., Mirbabaei F., Shekari N.: *Journal of chromatography. A*, 1338, 1 (2014).
14. Maschke M.: (2014).
15. Tasoglu S., Gurkan U. A., Wang S. Q., Demirci U.: *Chemical Society Reviews*, 42, 5788 (2013).
16. Belinsky M. I.: *Chemical Physics*, 325, 326 (2006).
17. Tamada J., Oaku Y., Mishima F., Akiyama Y., KiomyOsako M., Shimamura M., Nakagami H., Nishijima S.: *Ieee Transactions on Applied Superconductivity*, 24, (2014).
18. Song Z. L., Zhao X. H., Liu W. N., Ding D., Bian X., Liang H., Zhang X. B., Chen Z., Tan W. H.: *Small*, 9, 951 (2013).
19. Rittich B., Spanova A.: *Journal of Separation Science*, 36, 2472 (2013).
20. Schwalbe M., Pachmann K., Hoffken K., Clement J. H.: *Journal of Physics-Condensed Matter*, 18, S2865 (2006).
21. Pecova M., Zajoncova L., Polakova K., Cuda J., Safarikova M., Sebela M., Safarik I.: *Chemické Listy*, 105, 524 (2011).
22. Hamoudeh M., Fessi H.: *Journal of Colloid and Interface Science*, 300, 584 (2006).
23. Gong P. J., Peng Z. Y., Wang Y., Qiao R., Mao W. X., Qian H. S., Zhang M. Y., Li C. C., Shi S. Y.: *Journal of Nanoparticle Research*, 15, (2013).
24. Loo J. F. C., Lau P. M., Ho H. P., Kong S. K.: *Talanta*, 115, 159 (2013).
25. Nakagawa T., Tanaka T., Niwa D., Osaka T., Takeyama H., Matsunaga T.: *Journal of Biotechnology*, 116, 105 (2005).
26. Aliabadian M., Beentjes K. K., Roselaar C. S. K., van Brandwijk H., Nijman V., Vonk R.: *Zookeys*, 25 (2013).
27. Berman H. F., Riley L. W.: *Bmc Microbiology*, 13, (2013).
28. Godfray H. C. J.: *Nature*, 420, 461 (2002).
29. Schloss P. D., Handelsman J.: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 686 (2004).
30. Curtin K., Samowitz W. S., Wolff R. K., Ulrich C. M., Caan B. J., Potter J. D., Slattery M. L.: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18, 3384 (2009).
31. Wang Y., Mao H. J., Zang G. Q., Zhang H. L., Jin Q. H., Zhao J. L.: *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38, 1133 (2010).
32. Walsh P. C.: *Journal of Urology*, 183, 1838 (2010).
33. Thaxton C. S., Elghanian R., Thomas A. D., Stoeva S. I., Lee J. S., Smith N. D., Schaeffer A. J., Klocker H., Horninger W., Bartsch G., Mirkin C. A.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18437 (2009).
34. Mir L. M., Bureau M. F., Rangara R., Schwartz B. T., Scherman D.: *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 321, 893 (1998).
35. Thavanathan J., Huang N. M., Thong K. L.: *Biosensors & Bioelectronics*, 55, 91 (2014).
36. Rocha M. S., Cavalcante A. G., Silva R., Ramos E. B.: *The journal of physical chemistry. B*, 118, 4832 (2014).
37. Kiyama R., Zhu Y.: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71, 2065 (2014).
38. Liu Z. B., Zhou B., Wang H. Q., Lu F., Liu T. J., Song C. X., Leng X. G.: *Journal of Nanoparticle Research*, 15, (2013).
39. Pratiwi F. W., Rijiravanich P., Somasundrum M., Surareungchai W.: *Analyst*, 138, 5011 (2013).
40. Crainey J. L., Mattos-Gloria A., Hamada N., Luz S. L. B.: *Acta Tropica*, 131, 47 (2014).
41. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. H., Vogler A. P.: *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 70 (2003).
42. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M.: *Plos Biology*, 2, 1657 (2004).
43. Hajibabaei M., Janzen D. H., Burns J. M., Hallwachs W., Hebert P. D. N.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968 (2006).
44. Plaisance L., Knowlton N., Paulay G., Meyer C.: *Coral Reefs*, 28, 977 (2009).
45. Hebert P. D. N., deWaard J. R., Landry J. F.: *Biology Letters*, 6, 359 (2010).
46. Chen S., Guo B., Zhang G., Yan Z., Luo G., Sun S., Wu H., Huang L., Pang X., Chen J.: *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 37, 1043 (2012).
47. Kharytonchyk S., Pedersen F. S.: *Rna-a Publication of the Rna Society*, 16, 572 (2010).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Doxorubicin: pomoc i hrozba v léčbě rakoviny

Romana Konečná^a, Markéta Vaculovičová^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic, European Union

^b Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00 Brno, Czech Republic, European Union

Doxorubicin: help and threat in cancer therapy

This article is focused on reviewing the benefit and limitations of utilization of doxorubicin, which is one of the most widely used anticancer drug even though it causes severe side effects. The mechanism of action of common cytostatic drugs is described and special attention is paid to doxorubicin. Its pathway through the body is highlighted and its toxicity is emphasized. Finally, strategy of elimination of the negative effects induced by doxorubicin therapy is mentioned and the most widely approach – the use of liposomes – is summarized.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

Klíčová slova: doxorubicin; enkapsulace; liposomy; rakovina

Úvod

Rakovina patří celosvětově mezi jednu z nejzávažnějších chorob 21. století. Většina úmrtí je zapříčiněna rakovinou plic, jater, žaludku, tlustého střeva a prsu. Vznik onemocnění je způsoben širokou škálou vnějších a vnitřních podmínek a významnou roli tu hrají genetické predispozice, především u rakoviny prostaty (13,94%), prsu (7,46%) a kolorekta (6,78%)¹. I přesto, že této chorobě ročně podlehnou více než 8 milionu lidí a předpokládá se v roce 2030 narůst až na 13,1 milionů, vznik a mechanismus této zákeřné nemoci není stále zcela objasněn a mechanismy působení různých druhů cytostatik jsou stále předmětem zkoumání. Vzhledem k závažné toxicitě cytostatik je snaha vyvinout specifické systémy podávání léků, které jsou schopny omezit toxicitu léčiva a cíleně dopravit léčivo do místa nádoru².

Rakovina

Rakovina zahrnuje širokou skupinu onemocnění, jejichž společným rysem je nekontrolovaný růst vlastních buněk, ačkoli za normálních okolností jsou buňky schopny svou mutaci detekovat a opravit, nebo v jiném případě buňku donutit k apoptóze. Hlavním úkolem každého mnohobuněčného organismu je zajistit normální průběh buněčného cyklu. Při poškození správného fungování buněčného cyklu dochá-

zí k nekontrolované proliferaci buněk, což je jedním z hlavních charakteristických znaků rakoviny³. Buněčný cyklus je řízen několika kontrolními body, tzv. mechanismy zajišťujícími bezchybné dělení eukaryotické buňky. Nejdůležitější funkcí kontrolních bodů je dohled nad poškozením DNA, které detekují senzorové mechanismy, a pomocí signálních mechanismů je buněčný cyklus zastaven do doby opravy. V případě že nelze provést opravu dochází ke spuštění programované buněčné smrti (apoptózy). Buněčný cyklus je v kontrolních bodech řízen pomocí cyklinů (A, B, D, E) a jejich příbuznými cyklin-dependentními kinázami (CDK). Specifické přechody v buněčném cyklu jsou řízeny specifickými CDK. Je-li tato specifčnost udržována v nádorových buňkách, selektivní inhibice těchto kináz představuje potenciální možnost léčby nádorů⁴.

Cytostatická léčiva a jejich působení na lidský organismus

Chemoterapie patří k základním léčebným postupům mnoha druhů nádorů. Klinická užitečnost protinádorových léčiv je do značné míry omezena vývojem nežádoucích účinků a získáním rezistence protinádorových buněk na tyto léky. Mechanismus toxicity protinádorových léčiv není stále zcela objasněn⁵. Obecně je popsáno několik základ-

ních mechanismů působení: 1) interkalace do DNA, což má za následek inhibici syntézy makromolekul, 2) vznik volných radikálů, což vede k poškození DNA nebo peroxidaci lipidů, 3) alkylace DNA, 4) DNA cross-linking, 5) interakce s membránovými proteiny, což vede k redukci DOX a tvorbě ROS, 6) poškození DNA vlivem inhibice topoisomerázy II, 7) indukce apoptózy v závislosti na inhibici topoisomerázy II^{6,7}. Dále je důležité se zmínit o tzv. tumor supresorovém proteinu p53, který je jedním z nejdůležitějších ovladačů buněčného cyklu u normální i rakovinové buňky. V případě výskytu nebezpečí zahajuje různé kaskády apoptózy a tím dochází k odumření poškozené buňky⁸. Asi 60 % nádorů obsahuje mutovaný typ p53, což způsobuje jeho zvýšenou stabilitu nebo ztrátu aktivity. Ztráta aktivity normálního typu p53 je hlavním prediktorem absence odpovědi na radioterapii a chemoterapii u různých typů nádorů^{9,10}. Preneoplastické buňky mají silnou tendenci eliminovat funkčnost proteinu p53, což naznačuje, že nádorové buňky mohou eliminovat apoptickou smrt buňky¹¹. Další třídou genů ovlivňující potenciální vznik rakoviny jsou onkogeny stimulující buněčný růst¹². Veškeré výše popsané změny na genetické úrovni mohou vyústit až v nádorové bujení a jsou výsledkem nahromadění chyb během mitózy. Je velmi důležité si uvědomit, že jediná genetická změna nestačí k podpoře maligního nádoru¹³.

K nejběžnějším cytostatikům patří dvě skupiny léčiv, jedna skupina zahrnuje léčiva na bázi platiny, jejichž nejvýznamnějšími zástupci jsou cisplatina, oxaliplatina a karboplatina. Hlavním cílovým místem působení těchto léčiv je DNA. Druhou velmi významnou skupinu tvoří antracyklinová antibiotika. Existuje více než 2000 derivátů antracyklinů, ale i přesto je stále nepoužívanějším léčivem z této skupiny doxorubicin (DOX). Hlavním mechanismem působení DOX je interkalace do DNA. Strukturální modifikace způsobené interkalací mohou vést k funkčním změnám, např. inhibice transkripce, replikace a opravných mechanismů DNA^{14,15}. DOX má vysokou schopnost proniknout do tkání a zároveň zůstat v jádře buňky a to jak díky svým lipofilním vlastnostem a DNA interkalaci. Je zajímavé, že i přes vysokou

penetrační schopnost nemůže DOX přecházet přes hematoencefalitickou bariéru do mozku. Byla provedena řada studií, které se zaměřují na využití DOX jak samostatně, tak v kombinaci s dalšími terapiemi. Většina těchto studií popisuje distribuční poločas DOX v rozsahu 3 – 5 minut, naopak terminální poločas se pohybuje kolem 24 – 36 hodin. Hodnoty stabilní distribuce jsou v rozmezí 500 až 800 l/m²¹⁶. Jako většina léků, DOX vstupuje do buňky pasivní difuzí a obvykle se hromadí v intracelulárním prostoru v koncentraci 10 – 500 x vyšší než v extracelulárním prostoru. V jádře se nachází asi 50x více DOX než v cytoplasmě (340 μM), nebo-li jedna molekula je interkalována mezi každou pátou bázi na řetězci DNA^{17,18}. Volný intracelulární DOX (2% z celkového podaného léku) je stejnoměrně distribuován mezi ostatní orgány (Golgiho aparát, lysosomy a mitochondrie)¹⁹. Většina studií se přiklání k faktu, že se DOX nejvíce hromadí v játrech v důsledku biotransformace, nelze však opomenout vysokou koncentraci v kostní dřeni a bílých krvinkách, kde je na hladině stále 200 – 500x vyšší než v plasmě. Plasmová clearance zprostředkovaná játry se pohybuje v rozmezí 324 – 809 ml/min/m². Polovina léčiva je vylučována žlučí obvykle 5 – 7 dní od počátku léčby. Pouze 2 – 15 % léčiva je vyloučeno močí po delší časové periodě, z toho cca 3 % v moči tvoří doxorubicinol. Do 24 hodin je 10 – 20% vyloučeno stolicí a 50 % do 150 hodin.

Toxicita doxorubicinu (DOX)

Používání antracyklinů je zatíženo celou řadou vedlejších účinků jako je nevolnost, zažívací potíže, ztráta vlasů a poruchy na neurologickém systému²⁰. Bohužel DOX není specificky zaměřen jen na nádorovou tkáň, ale ovlivňuje růst i jiných typů buněk v těle, což má za následek porušení správného fungování imunitního systému²¹. Nejvyšší riziko představuje kardiotoxicita, která je hlavním důvodem omezení podávané dávky DOX. DOX je odpovědný za strukturální změny kardiomyocytů v srdci. Geny za to odpovědné nesou označení BNP a ANP. Při zvýšené expresi těchto genů dochází k srdeční hypertrofii. Molekulární mechanismus této akce zvyšuje tvorbu vol-

ných radikálů. Literatura popisuje nejčastější 4 mechanismy vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (ROS): 1) vznikem semichinonu, 2) aktivace NAD(P)H oxidoreduktázy, 3) neenzymatické mechanismy, 4) produkty metabolismu DOX. Blíží-li se životní akumulace DOX 500 mg/m² plochy těla je riziko kardiomyopatie výrazně zvýšeno a k akutnímu selhání srdce dochází až u 20 % pacientů²².

Až u 40 % pacientů se v průběhu léčby projeví poruchy jater. Vlivem metabolické a detoxifikační aktivity jater dochází k akumulaci DOX v játrech. Při vyšších dávkách DOX je vlivem metabolismu v játrech zvýšena produkce ROS způsobujících poškození DNA, peroxidaci lipidů, snížení vitamínu E a pokles redukovaného glutathionu. Dále může docházet k aktivaci IKB kinázy, která fosforyluje inhibitory IKK a tím aktivuje jaderný faktor κ B, který způsobí uvolnění prozánětlivých cyklinů spouštějících apoptózu. Toxicita DOX je dále odpovědná za snižování hladiny anorganického fosfátu (ADP, ATP, AMP), které může vyústit až k patologickým stavům v hepatocytech. Tento proces je jednou z hlavních příčin neustálé svalové a psychické únavy. DOX působí toxicky také na ledviny, kde způsobuje tzv. nefrotoxicitu a proteinurii, vlivem porušení glomerulárních podocytů²³. K nefropatii dochází při narušení normálního fungování mitochondrií. To způsobí, že hladina triglyceridů, superoxidáz a syntéza citrátu je zvýšena, zatímco je sníženo množství vitamínu E a antioxidantů. Následkem je opět změna struktury nefronů. Na rozdíl od jater, schopnost regenerace ledvin je výrazně nižší, pokud již došlo k poškození glomerulů. Poškození glomerulů způsobuje glomerulární léze, zánět, tubulární dilataci a také ovlivňuje kapilární propustnost²⁰. U některých pacientů, v těžkých případech, může docházet k závažné infekci v tlustém a slepém střevě, které mohou být fatální.

Liposomy jako nanotransportéry pro přenos doxorubicinu

Vzhledem k závažné toxicitě cytostatik je snaha vyvinout specifické systémy podávání léků, které jsou schopny omezit toxicitu léčiva a cíleně dopravit léčivo do místa nádoru. Použití

těchto systémů se stále testuje a zlepšuje, aby se zvýšila selektivita a celkový účinek léků. Největší pozornost je dnes věnována polymerním nosičům, jako jsou liposomy, hydrogely a nanočástice. Počáteční vývoj liposomálního doxorubicinu ukázal velikou naději v nové éře moderní léčby, ale také některé kritické nedostatky. Liposomy vykazovaly rychlé odbourávání z oběhového systému prostřednictvím retikuloendoteliálního systému²⁴. První studie vysvětlují krátký oběhový čas složením a velikostí částic. Postupem času byly liposomy formulovány tak, aby bylo léčivo lépe zapouzdřeno a setrvalo déle v oběhovém systému a tím se zvýšila jeho účinnost²⁵. Povrch liposomu se proto brzy potáhl polyethylenglykolem (PEG) a tím se výrazně prodloužil čas cirkulace léčiva v těle. Liposom potažený PEG se nakonec stal známý jako „stealth“, z nichž jedna skupina byla na trh uváděna s doxorubicinem²⁶. Doxorubicin je zapouzdřený ve vnitřním prostoru, v gelové fázi obsahující 10000 až 15000 pevně balených molekul. Průměr těchto liposomů musí být dostatečně malý, aby byl zajištěn jejich prostup přes stěnu krevních cév v nádoru²⁷. Studie na zvířecích modelech zkoumající farmakologické vlastnosti liposomů potažených PEG ukázaly na inhibici růstu nádorů, zlepšení celkového stavu organismu a zlepšení kvality života ve srovnání s pravidelnou léčbou volným DOX. Jednou z hlavních farmakologických schopností léku je potlačení antiapoptických cest a zesílení apoptické aktivity. Distribuční objem je 3l, což je hodnota srovnatelná s hodnotou objemu plasmy. Rychlost clearance je 33,6 ml/l, na rozdíl od volného DOX, který vykazuje hodnotu v rozsahu 24 – 73 l/hod/m²²⁸. Liposomy bez PEG mají hydrofilní povrch a ten výrazně snižuje vazbu liposomu na složky plazmy. Je důležité si uvědomit, že 95 % DOX nacházejícího se v plazmě je stále uzavřeno v liposomu, což znamená, že není biologicky dostupný. DOX zapouzdřený v liposomu s PEG má díky své malé velikosti (100 nm) velký potenciál být velmi selektivní k nádoru. Zapouzdřený DOX v liposomu se hromadí v místě nádoru více než samotný DOX. Některé studie však poukazují na 4 – 48× vyšší prostup do jater a kůže po počáteční injekci, proto tyto částice nejsou ještě stále ideální.

V jiné práci byly provedeny experimenty na potkanech, s implantovaným sarkomem, které ukazují že liposomální DOX s PEG důkladně pronikl do mozku a zároveň byl šetrný k okolní mozkové tkáni, což je důkazem podstatné výhody nad použitím volného DOX ²⁹.

Závěr

Doxorubicin je široce využívané cytostatické léčivo aplikované pro širokou škálu nádorových onemocnění. I přesto, že se toto léčivo v klinické praxi využívá již déle než 30 let, příčiny jeho negativního efektu podléajícího se na vzniku kardiotoxicity nebyly stále zcela objasněny. Z tohoto důvodu je důležité vyvinout specifické systémy podávání léků, které by byly schopny omezit toxicitu léčiva a popřípadě cíleně dopravit léčivo do místa nádoru. Jako nejslibnější nanotransportér pro přenos léčiv se prozatím jeví liposom. Mezi další látky využití pro podobné účely můžeme řadit různé nanočástice a hydrogely.

Tato práce byla financována ze zdrojů PGS24_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Frank C., Fallah M., Ji J. G., Sundquist J., Hemminki K.: *International Journal of Cancer*, 134, 1899 (2014).
2. Liu Y. Z., Guo M. Q.: *Proteomics*, 14, 399 (2014).
3. Urrego D., Tomczak A. P., Zahed F., Stuhmer W., Pardo L. A.: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 369, (2014).
4. Aarts M., Linardopoulos S., Turner N. C.: *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 529 (2013).
5. Takahashi T.: *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 131, 355 (2011).
6. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: *Pharmacological Reviews*, 56, 185 (2004).
7. Sinha B. K., Mimnaugh E. G.: *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 567 (1990).
8. Hahn W. C., Weinberg R. A.: *New England Journal of Medicine*, 347, 1593 (2002).
9. Zhang Y., Zhang Y. J., Zhao H. Y., Zhai Q. L., Shen Y. F.: *Biochimie*, 99C, 215 (2014).
10. Kiyosaki K., Nakada C., Hijiya N., Tsukamoto Y., Matsuura K., Nakatsuka K., Daa T., Yokoyama S., Imaizumi M., Moriyama M.: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 7 (2010).
11. Benchimol S.: *Cell Death and Differentiation*, 8, 1049 (2001).
12. Zhang Z., Li M., Rayburn E. R., Hill D. L., Zhang R. W., Wang H.: *American Journal of Pharmacogenomics*, 5, 247 (2005).
13. Croce C. M.: *New England Journal of Medicine*, 358, 502 (2008).
14. Liu H.-K., Sadler P. J.: *Accounts of Chemical Research*, 44, 349 (2011).
15. Xu X. X., Persson H. L., Richardson D. R.: *Molecular Pharmacology*, 68, 261 (2005).
16. Zheng Z., Pavlidis P., Chua S., D'Agati V. D., Gharavi A. G.: *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 1796 (2006).
17. Wang Y., Wang Y. P., Tay Y. C., Harris D. C. H.: *Kidney International*, 58, 1797 (2000).
18. Rook M., Lely A. T., Kramer A. B., van Goor H., Navis G.: *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20, 59 (2005).
19. Lal S., Mahajan A., Chen W. N., Chowbay B.: *Current Drug Metabolism*, 11, 115 (2010).
20. Carvalho C., Santos R. X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P. J., Santos M. S., Moreira P. I.: *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3267 (2009).
21. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J. S.: *Cardiology*, 115, 155 (2010).
22. Sakata Y., Dong J.-W., Vallejo J. G., Huang C.-H., Baker J. S., Tracey K. J., Tacheuchi O., Akira S., Mann D. L.: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292, H503 (2007).
23. Wang J. X., Yuan Z. X.: *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67, 199 (2013).
24. Anders C. K., Adamo B., Karginova O., Deal A. M., Rawal S., Darr D., Schorzman A., Santos C., Bash R., Kafri T., Carey L., Miller C. R., Perou C. M., Sharpless N., Zamboni W. C.: *Plos One*, 8, (2013).
25. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y.: *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 419 (2003).
26. Nogueira E., Loureiro A., Nogueira P., Freitas J., Almeida C. R., Harmark J., Hebert H., Moreira A., Carmo A. M., Preto A., Gomes A. C., Cavaco-Paulo A.: *Faraday Discussions*, 166, 417 (2013).
27. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J. W., Thurston G., Roberge S., Jain R. K., McDonald D. M.: *American Journal of Pathology*, 156, 1363 (2000).
28. von Mehren M., Schilder R. J., Cheng J. D., Temmer E., Cardoso T. M., Renshaw F. G., Bayever E., Zannikos P., Yuan Z., Cohen R. B.: *Annals of Oncology*, 19, 1802 (2008).
29. Orditura M., Quaglia F., Morgillo F., Martinelli E., Lieto E., De Rosa G., Comunale D., Diadema M. R., Ciardiello F., Catalano G., De Vita F.: *Oncology Reports*, 12, 549 (2004).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Rizika spojená s expozicí estrogenům a sloučeninám s estrogenní aktivitou a možnosti jejich eliminace z vodního prostředí

Zbyněk Heger^{a,b}, Ondřej Zítka^{b,c}, Vojtěch Adam^{b,c}, René Kizek^{b,c}

^a Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého třída 1, CZ-612 42, Česká Republika - Evropská unie

^b Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno - Česká republika

^c Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno - Česká republika

Risks associated with exposure to estrogens and substances with estrogenic activity and their elimination from water environment.

Estrogenic pollutants are a heterogeneous group of substances, contaminating the water environment. This group includes endogenous estrogens, naturally producing by organisms, exogenous estrogens that are contaminating the environment as a consequence of metabolic degradation and subsequent excretion and also other substances with estrogenic activity that have broad spectrum of industrial utilization. This work summarizes physiological molecular-biological nature of action estrogenic substances, and the pathological effect on the organism, leading to plenty health complications, such as endocrine disruption or tumorigenesis. There are also discussed possible ways of degradation of these substances from waste water that are contaminated by substances with estrogenic potential.

Přijato k publikování: 29. 6. 2014

Klíčová slova: Biodegradace, Endokrinní disrupce, Estrogenní receptor, Estrogen-responsivní element, Kancerogeneze, Malformace, Transkripční faktory

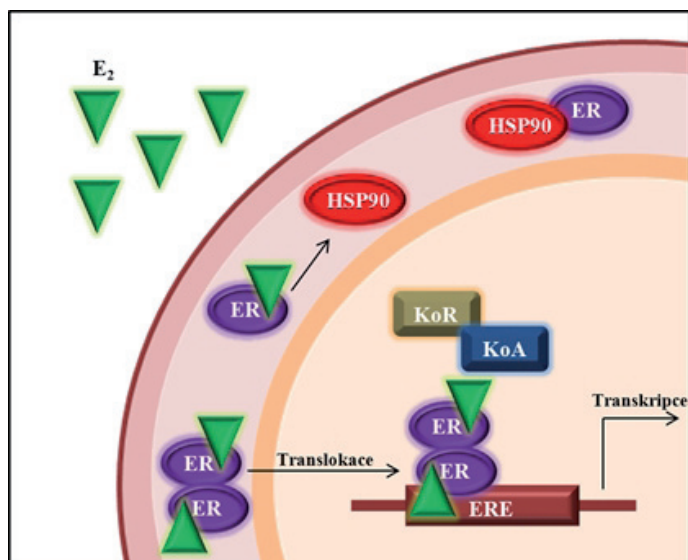
Úvod

Sloučeniny vykazující estrogenní aktivitu (nebo také endokrinní disruptory, anglicky *endocrine disrupting chemicals* – EDC) se běžně vyskytují v odpadních, ale i povrchových vodách. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek přírodního, ale i antropogenního původu (exogenní polutanty). EPA (*Environmental Protection Agency* – Úřad pro ochranu životního prostředí) definuje polutanty s estrogenní aktivitou jako látky, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem nebo rozkladem přirozených hormonů, jež v těle zodpovídají za homeostázu, reprodukci, vývoj nebo chování¹. Díky neustále se zvyšujícím hladinám těchto látek především ve vodních ekosystémech jsou EDC středobodem zájmu mnoha výzkumných skupin². S neustálým rozvojem hospodářských a průmyslových odvětví je do prostředí vypouštěna celá škála estrogenních polutantů. Důležitým producentem jsou také velkochovy hospodářských zvířat, v jejichž exkrementech

jsou vylučovány hlavně přírodní estrogeny³ či ženy, jejichž moč obsahuje nezmetabolizované či metabolizované, avšak stále estrogenně aktivní residua kontraceptiv, jejich spotřeba se každoročně rapidně zvyšuje^{4,5}. Sloučeniny s estrogenní aktivitou mají strukturální rysy velmi podobné estrogenním hormonům a v důsledku toho jsou schopné je imitovat⁶.

Přírodní estrogeny jsou důležité v mnoha fyziologických procesech například při iniciaci transkripce či signalizaci v rozličných buněčných mechanismech. Mezi nejvýznamnější patří regulace produkce jaterních proteinů, koagulačních faktorů (antitrombinu, plasminogenu), lipoprotein triglyceridu (HDL), kortisolu, feomelaninu a dalších⁷.

Účinek těchto látek v živém organismu je iniciován interakcí ligandů (estrogenů či jim podobných látek) s jaderným receptorovým systémem (estrogenní receptory α a β – značně homologní). Výsledný ligand-receptorový komplex interaguje s nukleotidovou sekvencí



Obr. 1: Receptor (ER) je po kontaktu s ligandem (E₂) disociován z multiproteinového komplexu s heat shock proteiny (HSP 90). Po vytvoření homodimeru dochází k translokaci do jádra a interakcím s koregulátory (korepresory - KoR a koaktivátory - KoA) transkripce. Ta vede k vytvoření vazby s estrogen responsivním elementem (ERE), který spouští transkripci mRNA. Následná translace dává za vznik novému proteinu. Volně přepracováno z 8

označovanou jako estrogen response element (ERE). Tím je zahájena transkripce DNA⁸. Obecné schéma aktivace transkripce ligací 17 β -estradiolu (E₂) je znázorněno na **Obr. 1**.

Ačkoliv jsou estrogény pro každý živý organismus nezbytné, nadměrná expozice či vystavení organismu syntetickým estrogením polutantům může vést k rozvoji nežádoucích zdravotních účinků⁹.

Polutanty s estrogení aktivitou

Mezi endogenní estrogény patří ženské pohlavní hormony 17 β -estradiol, estron a estriol. Ostatní látky s endokrinní aktivitou, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému, se označují jak exogenní estrogény⁸. Podle původu je můžeme rozdělit na xenoestrogény, fytoestrogény, mykoestrogény a metaloestrogény, kde podezřelým z estrogení aktivity je především kadmium, avšak mechanismy účinku jsou stále neobjasněny¹⁰. Všechny zmíněné substance mají schopnost tvořit vazbu ligand-receptor s ligand-vázací doménou (*ligand binding domain* – LBD) estrogeního receptoru.

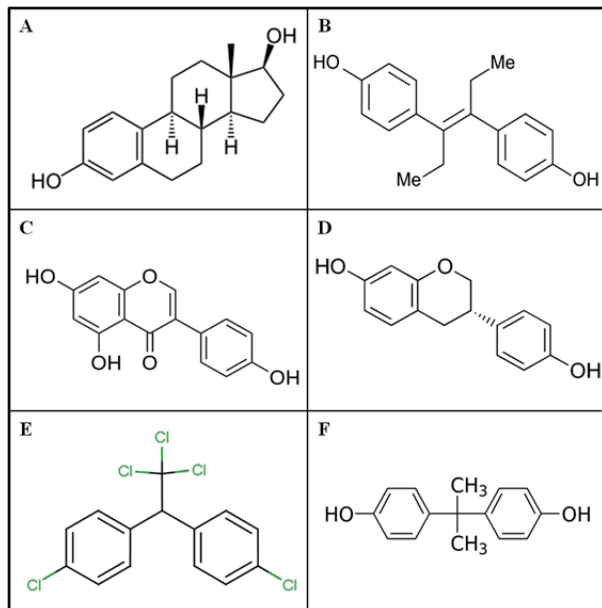
Podobně jako velká část proteinů tvořených de novo, i proteiny formující estrogení receptory podléhají posttranslačním modifikacím – fosforylaci, acetylaci, ubikvitinaci apod., což ovlivňuje jejich výslednou aktivitu a stabilitu¹¹. Takto pozměněný protein může spouštět transkripci dalšími možnými mechanismy, mimo již zmíněnou klasickou genomickou cestu, závislou na vazbě ligandu. Mezi ně řadíme i) tethering, při kterém se místo homodimeru estrogeního receptorů tvoří heterodimer s jiným transkripčním faktorem¹² a ii) ligand-independentní genomický mechanismus, kdy jsou estrogení receptory schopny aktivovat transkripci po fosforylaci, iniciované proteiny z rodiny kináz¹³.

I když jsou genomické mechanismy látek s estrogení aktivitou již poměrně dobře zmapovány existují ještě non-genomické mechanismy, které zůstávají stále ne zcela objasněny¹⁴.

Při nadměrné expozici organismu mohou estrogény ligovat také jiné proteiny než estrogení receptory, a to hlavně strukturně velmi podobné GPER (na G-protein vázané receptory). Jako nejpravděpodobnější mechanismus non-genomického působení estrogeního látek se jeví následná iniciace signálních kaskád skrze sekundární aktivátory, jako je například cAMP (cyklický adenosinmonofosfát)¹⁵.

Tímto mechanismem může být jednak aktivována transkripce jinými transkripčními faktory (jako následek fosforylace epidermálního růstového faktoru – EGFR vlivem matrixových metaloproteináz – MMP a interakcí s MAPK – mitogenem aktivovanými proteinkinázami či PI3K/Akt - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázami) nebo může být pozorována rychlá fyziologická odpověď buňky bez genomického efektu jako například tvorba oxidu dusnatého (NO) s následným nepříznivým dopadem na

tkáň – např. rozvoj zánětlivého ložiska s proliferčním potenciálem¹⁶.



Obr. 2: Strukturální vzorce různých látek s estrogení aktivitou. (A) 17β-estradiol (E2), patří do skupiny endogenních estrogenů. (B) Diethylstilbestrol (DES) ze skupiny syntetických estrogenů, obsažený v kontraceptivech. (C) Genistein a (D) equol ze skupiny fytoestrogenů. (E) 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT), zakázaný pesticid, který však stále perzistuje v prostředí. (F) Bisphenol A (BPA), používaný při výrobě polykarbonátů

Estrogenní látky ve vodním prostředí a ekologická rizika s nimi spojená

Estrogenní polutanty neúčinkují akutními mechanismy, nýbrž chronickou toxicitou při dlouhodobé expozici, přičemž hormonálně účinné bývají již při velmi nízkých dávkách. Tyto látky mohou navíc ovlivňovat nejen konkrétní jedince vystavené jejich působení, ale také celá společenstva, a to kvůli výrazným bioakumulačním schopnostem¹⁷. Na **Obr. 2** jsou strukturálně znázorněny zástupci látek s estrogení aktivitou patřící do různých skupin.

Z obrázku je patrná různorodost látek, z níž také vyplývá jejich rozdílná schopnost potenciovat nežádoucí účinky. Vstup a příjem estrogenů může být určen na základě estrogenního ekvivalentu (EQ). Ten je roven součtu koncentrací (EC) látek vynásobených jejich estrogení potenci (EP), která se běžně vztahuje na standard 17β-estradiolu či syntetického diethylstilbestrolu a je vyjádřen jako:

$$EQ = \sum (EC_i \times EP_i)$$

Přičemž, čím nižší je estrogenní ekvivalent (EQ), tím vyšší je schopnost substance aktivovat nežádoucí estrogení odpověď⁶.

Mezi aktuálně nejzávažnější problémy způsobené přítomností látek s estrogení aktivitou ve vodním prostředí patří disrupce endokrinního systému a jejich vliv na rozvoj maliných novotvarů.

Endokrinní disrupce

Celá řada látek kontaminujících vodní prostředí vykazuje potenciál negativně ovlivňovat funkce a pohlavní vývoj organismů imitováním či antagonismem efektů hormonů nebo narušováním mechanismy jejich přírodní syntézy¹⁸. Nízké koncentrace endokrinně disruptivních látek nemusí způsobovat škodlivé efekty živočichům nejnižších trofických úrovní, avšak u predátorů, které je loví, mohou být vážná poškození neuroendokrinního systému pozorována¹⁹. Účinky na endokrinní systém jedinců jsou natolik rozmanité a závažné, že se projevují i na úrovni populací a ekosystému. Působení endokrinních disruptorů v prostředí je tedy velmi důležitým problémem z hlediska zachování stability ekosystémů²⁰.

Hlavními projevy estrogení aktivity jsou poruchy pohlavní diferenciaci a následně pohlavního dimorfismu. Při sledování sexuálního dimorfismu jsou pozorovány změny ve vývoji primárních i sekundárních pohlavních znaků. Popsané formy poruch sexuálního dimorfismu jsou – imposex, intersex a superfemale²¹.

Imposexem je označován jev, kdy se u samice vyvinuly samičí i samčí pohlavní orgány a samčí přerostly původní (neporušené) samičí, nebo obráceně. Jev byl již pozorován u více než 160 živočišných druhů. *Intersexem* je nazýván jev, kdy jsou samičí orgány modifikovány směrem k samčím, nebo obráceně, ale ne kompletně. Superfemale se vyznačuje abnormální až patologickou velikostí samičích pohlavních orgánů²². Tyto poruchy mohou způsobit sterilitu jedinců s fatálními následky pro celý ekosystém, jako je vymizení celých populací.

Poruchy pohlavního dimorfismu jsou úzce spojené s vitelogeninem (VTG), což je samičí protein – prekurzor vaječného žloutku²³. Vitelogeneze je tedy zjednodušeně proces syntézy estrogenů (především E₂). Vytvořený estradiol je uvolňován do krve a transportován do jater, kde navázáním na jaderný receptor spouští transkripci VTG. Ten vstupuje do krve a putuje do vaječníků, kde je transformován na vaječné proteiny, které slouží jako zásoba živin pro vyvíjející se plod. Ačkoliv gen pro tvorbu VTG je přítomen i u samčí populace, hladina proteinu je u nich díky velmi nízké hladině estradiolu v plazmě prakticky zanedbatelná, avšak díky působení látek s estrogení aktivitou se tato hladina významně zvyšuje²⁴.

Nejvíce zasažené jsou taxonomické skupiny korýšů, ryb a obzvláště obojživelníků, kvůli zvýšené citlivosti způsobené schopností transdermálního přenosu²⁵. Pokud jsou estrogením polutantům vystaveny larvy obojživelníků, dochází k předčasné metamorfóze, kdy vznikají extrémně malí jedinci, neschopní žít se větší potravou a s nízkými energetickými rezervami, které vedou k neodvratnému úhynu. Pozorovány jsou také časté malformace končetin, způsobené abnormálním, urychleným vývojem²⁶.

Efekt na proliferaci buněk

Dalším rizikem spojeným s látkami s estrogení aktivitou je rozvoj nádorového bujení. Estrogením látkám je přisuzováno spojení s mnoha typy rakovin, jako nádory vaječníků²⁷, dělohy²⁸, kolorektálním karcinomem²⁹, rakovinou endometria³⁰ či karcinomy prsu⁸.

Karcinom prsu je nejčastější malignitou u žen a jeho incidence v rozvinutých zemích světa

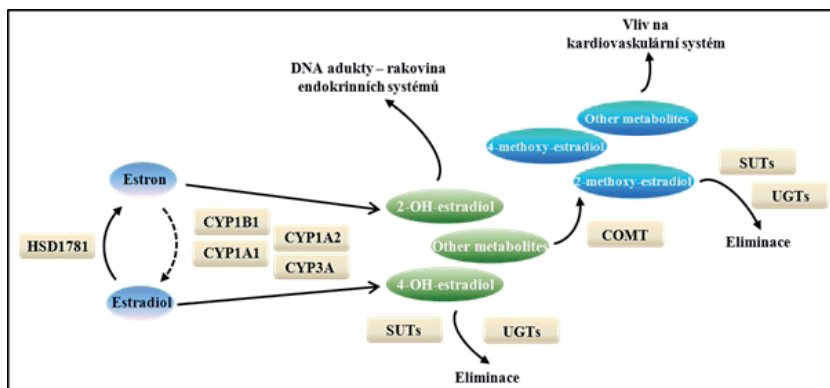
stále stoupá. Mortalita v České republice je ve srovnání se státy západní Evropy či Severní Ameriky stále vysoká. Avšak díky zavedení řádného mamografického screeningu a systémové adjuvantní léčby je ale každým rokem snižována.

Tumory prsu jsou v současné době považovány za genetickou aberaci somatických buněk, kterou získávají mnohočetnými mutacemi v průběhu své klonální expanze a výsledkem je nekontrolovaný invazivní a metastatický růst. Přes pokroky v genetickém výzkumu, objevení onkogenů, tumor supresorových genů, hormonálních a růstových faktorů a jejich úlohy v řízení proliferace normální a nádorové tkáně zůstává příčina tohoto onemocnění nejasná. Karcinom prsu je velmi heterogenní onemocnění a dá se předpokládat, že příčina nebude jedna³¹. Již dříve bylo ukázáno, že estrogeny mohou potenciovat rozvoj nádorů. V roce 1932 Lacassagne experimentálně prokázal indukci nádorů mléčných žláz koček po podání estradiol benzoátů. O devět let později Noble a Collip prokázali spojení mezi růstem nádorů mléčných žláz krys a estrogeny. Po vložení podkožních pelet s estrogeny došlo k rychlému rozvoji nádorového bujení³².

Od roku 1970, kdy byla provedena izolace buněčné linie MCF-7, odvozené od duktálního estrogen receptor pozitivního adenokarcinomu prsu³³ bylo provedeno mnoho experimentů, prokazujících potenciál estrogeních látek aktivovat nekontrolovanou proliferaci a odhalujících mechanismy tohoto fenoménu.

Bylo dokázáno, že estrogeny po vazbě s receptory v buňce aktivují hormon-responzivní geny, které mohou obsahovat mutace, které vedou k over-expresi proto-onkogenů či down-regulaci tumor supresorů. V takovém případě nastává v tkáni nekontrolované buněčné dělení – nádor²⁹. K tomuto datu již bylo popsáno velké množství mutací v genech, zapojených v signálních kaskádách růstových faktorů a buněčného cyklu jako je *p53*, *fos*, *myc*, *myb*, *cdc25a*, *A2*, *stk15*, *GATA-3*, *FOXA-1* či notoricky známých tumor supresorů *BRCA-1* a *BRCA-2*⁸.

Postupem času bylo zjištěno, že nejen vazbou s receptory jsou estrogeny schopné spouštět nádorové procesy, ale že z hlediska chemické-



Obr. 3: Metabolická cesta biotransformace estronu (E1) a estradiolu (E2) pomocí 17 β -hydroxysteroid oxidoreduktázy (HSD1781). Metabolity vznikající aktivitou enzymů z rodiny Cytochromů P450 tvoří adukty s DNA, další transformací pomocí katechol-O-methyltransferázy (COMT) vznikají především methoxy-estradioly, které mohou mít jak pozitivní, tak i negativní vliv na kardiovaskulární systém. Metabolity mohou být aktivně eliminovány pomocí sulfatačních (SUTs) a glukuronidačních enzymů (UGTs). Volně přepracováno dle 34

látky s biomakromolekulami jako je DNA či proteiny *per se*? Jak efektivně stimulovat reparační mechanismy, aby byl organismus před nežádoucími mutacemi chráněn?

ho mohou estrogeny či spíše jejich metabolity iniciovat kancerogenezi. Estrogeny jsou v těle hydroxylovány jaterními enzymy z rodiny cytochromů P450 (CYP) 2B1, 1A a 3A. Hydroxylované deriváty (2- a 4-OH) jsou dále převáděny na metoxy metabolity vlivem katechol-O-methyltransferázy (COMT) na 2- a 4-metoxy deriváty (Obr. 3).

Právě 2- a 4-hydroxy deriváty estrogenů jsou schopné poškozovat DNA tvorbou depurinujících aduktů, stejně jako endokrinní disruptory ze skupiny polyaromatických uhlovodíků. Obzvláště elektrofilní katechol estrogen-3-, 4-chinony generují při interakci s DNA kritické mutace, vedoucí k rozvoji nádorů³⁵. Toto zjištění vedlo k identifikaci specifických antioxidantů, které mohou blokovat formaci aduktů díky jejich chemickým a biochemickým vlastnostem. Dva z nich N-acetylcystein a resveratrol jsou v nynější době detailně zkoumány jako kandidáti schopní preventivně bránit organismus před rakovinou nejen prsu³⁶.

Z výše uvedeného je zřejmé, že estrogenní látky hrají zásadní roli při tumorigenezi. Ačkoliv byly základní mechanismy účinku těchto látek již popsány, stále ještě existují otázky, které bude nutno zodpovědět. Syntetické estrogeny podléhají metabolické degradaci jen velmi těžce. Jak interagují nezmetabolizované estrogenní

Možnosti eliminace estrogenních polutantů z vodního prostředí

Ačkoliv lze označit estrogenní polutanty díky nízkým koncentracím ve vodách za stopové znečištění, jsou z odpadních vod konvenčními čistírenskými procesy odstraňovány jen velmi neuspokojivě³⁷.

Eliminace estrogenů z odpadních vod lze řešit konvenčními postupy, ale tyto procesy mohou mít řadu nevýhod, jako jsou vysoké náklady, časově náročné postupy nebo vznik toxických derivátů. Mezi potenciálně využitelné metody pro odstranění estrogenních polutantů z vod se aktuálně řadí hlavně sorpce a biodegradace.

Sorpce

Vzhledem k hydrofobnosti látek s estrogenním potenciálem se předpokládá, že výrazným faktorem při snižování koncentrace ve vodách může být sorpce na suspendované látky nebo na sedimenty. Obecně platí, že čím jsou chemické látky hydrofobnější, tím větší množství se kumuluje v pevné fázi³⁸.

Jako adsorbér s vysokým degradačním potenciálem bylo zkoumáno především aktivní uhlí, které vyniká nízkými výrobními náklady a vysokou mechanickou a chemickou odolností. Výhodou je také jeho jednoduchá degradace. Nejčastěji je testováno ve formě granulí či práš-

ku^{39,40}. Problémem však mohou být rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti EDCs a také přítomnost jiných hydrofobních chemikálií ve vodách, které mohou zabírat vazebná místa estrogenům. Rozdílné výsledky byly také pozorovány při změně sorpčních podmínek (pH, teplota, salinita). Při protonaci molekuly (u většiny estrogenů pH > 10.4) dochází k rapidnímu zefektivnění sorpce, díky zvýšení elektrostatických interakcí, avšak takto vysoké pH je na druhou stranu nevýhodné pro další čistírenské procesy⁴¹. Dobré výsledky byly dosaženy také s použitím uhlíkových nanočástic, především fullerenu a uhlíkových nanotrubic. Uhlíkové nanomateriály vykazují vysokou adsorpční kapacitu avšak výrobní cena je ve většině případů pro environmentální aplikace, vyžadují velké množství materiálu stále vysoká^{42,43}.

Z toho důvodu je nutné hledat efektivnější sorpční materiály, které mohou sloužit jako výborná platforma pro primární eliminaci estrogenních polutantů před dalšími čistírenskými procesy.

Biodegradace

Jako perspektivní nástroj schopný efektivní biodegradace se jeví především houby bílé hniloby, produkující velké množství extracelulárních enzymů (mangan peroxidáza – MnP, lignin peroxidáza – LiP nebo laktáza – Lac), účastnících se biodegradčních procesů EDCs⁴⁴.

Popsána byla i degradace nonylfenolu několika bakteriálními kulturami, a to především *Sphingomonas xenophaga*, *Sphingomonas cloacae* a *Sphingobium amense*. Tyto bakterie metabolizují aromatickou část molekuly na odpovídající C9 alkoholy⁴⁵. U bakterií izolovaných z aktivovaného kalu ČOV (především *Sphingomonas sp.*, *Pseudomonas paucimobilis*) byla identifikována schopnost biodegradace bisfenolu A. Za aerobních podmínek degradují BPA na 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 4-hydroxyacetofenon⁴⁶. Kritická je pravděpodobně přítomnost enzymů z rodiny cytochromů P450, nicméně degradační produkty mohou vykazovat toxické či endokrinně disruptivní vlastnosti, a proto jsou stále hledány vhodné mikroorganismy, jako třeba zelené řasy *Chlorella fusca*, *Chlorococcum sp.* či *Scenedesmus sp.*, u kterých

byl degradační potenciál také identifikován⁴⁷.

Bohužel, antropogenní sloučeniny mají často substituenty a strukturální vlastnosti, které se liší od přírodních produktů⁴⁸ a mikroorganismy nemusí mít vyvinuty enzymy, které jsou schopny tyto chemické struktury odstranit.

Pro eliminaci látek s estrogenními vlastnostmi bude nutné vyvinout víceřadový systém, složený z jejich adsorpce a následné degradace pomocí mikroorganismů. Potencionálně mohou být použity i další metody jako například fotodegradace, nicméně u té byla prokázána jen nízká schopnost eliminace a doposud o použití této metody neexistuje příliš mnoho informací.

Závěr

Estrogenní polutanty tvoří velmi heterogenní skupinu látek. Neustálé zvyšování jejich koncentrací v prostředí vede k ekologickým problémům, kterým je nyní lidstvo nuceno čelit. Nežádoucí efekt na ekosystém, způsobený feminizací populace organismů, obývajících vodní prostředí může v budoucnosti vést k vymírání druhů na celé trofické úrovni. Neméně problematický je také vliv estrogenních látek na rozvoj maligních novotvarů. Při zvýšeném příjmu těchto látek z pitné vody dochází k nárůstu incidence nádorových onemocnění. Proto je nutné rozvíjet čistírenské procesy, které mohou estrogény z odpadních vod eliminovat. Z fyzikálně-chemické povahy těchto látek bude vývoj nových čistírenských metod problematický a nyní není zcela jasné, které procesy budou pro toto využity. Ačkoliv některé z nich vykazují relativně dobré výsledky, heterogenita těchto kontaminantů zásadně komplikuje celou situaci.

Tato práce byla financována z projektu CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Crisp T. M., Clegg E. D., Cooper R. L., Anderson D. G., Baetcke K. P., Hoffmann J. L., Morrow M. S., Rodier D. J., Shaefar J. E., Touart L. W., Zeeman M. G., Patel Y. M., Wood W. P.: (1997).
- Jeffries M. K. S., Conoan N. H., Cox M. B., Sangster J. L., Balsiger H. A., Bridges A. A., Cowman T., Knight L. A., Bartelt-Hunt S. L., Kolok A. S.: *Aquatic Toxicology*, 105, 189 (2011).
- Tang X. J., Naveedullah, Hashmi M. Z., Zhang H., Qian M. R., Yu C. N., Shen C. F., Qin Z. H., Huang R. L., Qiao J. N., Chen Y. X.: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90, 391 (2013).
- Preda C., Ungureanu M. C., Vulpoi C.: *Environmental Engineering and Management Journal*, 11, 1697 (2012).
- Qiang Z. M., Nie Y. F., Ben W. W., Qu J. H., Zhang H. Q.: *Chemosphere*, 91, 366 (2013).
- DeRosa C., Richter P., Pohl H., Jones D. E.: *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 1, 3 (1998).
- Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Strom A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J. A.: *Physiological Reviews*, 87, 905 (2007).
- Heger Z., Zitka O., Krizkova S., Beklova M., Kizek R., Adam V.: *Neuroendocrinology Letters*, 34, 123 (2013).
- Acconcia F., Kumar R.: *Cancer Letters*, 238, 1 (2006).
- Silva N., Peiris-John R., Wickremasinghe R., Senanayake H., Sathiakumar N.: *Journal of Applied Toxicology*, 32, 318 (2012).
- Manavathi B., Dey O., Gajulapalli V. N. R., Bhatia R. S., Bugide S., Kumar R.: *Endocrine Reviews*, 34, 1 (2013).
- Candelaria N. R., Liu K., Lin C. Y.: *Journal of Cellular Biochemistry*, 114, 2203 (2013).
- O'Leary K. A., Jallow F., Rugowski D. E., Sullivan R., Sinkevicius K. W., Greene G. L., Schuler L. A.: *Endocrinology*, 154, 4483 (2013).
- Abbondanza C., De Rosa C., D'Arcangelo A., Pacifico M., Spizuoco C., Piluso G., Di Zazzo E., Gazzero P., Medici N., Moncharmont B., Puca G. A.: *Journal of Cellular Physiology*, 227, 964 (2012).
- Losel R. M., Falkenstein E., Feuring M., Schultz A., Tillmann H. C., Rossol-Haseroth K., Wehling M.: *Physiological Reviews*, 83, 965 (2003).
- Heger Z., Merlos Rodrigo M. A., Krizkova S., Zitka O., Beklova M., Kizek R., Adam V.: *Oncology Letters*, 7, 1341 (2014).
- Mendes J. J. A.: *Food and Chemical Toxicology*, 40, 781 (2002).
- Pereira M., Eppler E., Thorpe K. L., Wheeler J. R., Burkhardt-Holm P.: *Environmental Toxicology*, 29, 199 (2014).
- Lange I. G., Hartel A., Meyer H. H. D.: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 219 (2002).
- Jin Y. X., Lin X. J., Miao W. Y., Wu T., Shen H. J., Chen S., Li Y. H., Pan Q. Q., Fu Z. W.: *Toxicology Letters*, 225, 392 (2014).
- Laurent M., Antonio L., Sinnesael M., Dubois V., Gielen E., Classens F., Vanderschueren D.: *Asian Journal of Andrology*, 16, 213 (2014).
- Billinghurst Z., Clare A. S., Fileman T., McEvoy J., Readman J., Depledge M. H.: *Marine Pollution Bulletin*, 36, 833 (1998).
- Nicolas J. M.: *Aquatic Toxicology*, 45, 77 (1999).
- Dang Z. C.: *Environmental Pollution*, 185, 266 (2014).
- McRobb F. M., Sahagun V., Kufareva I., Abagyan R.: *Environmental Science & Technology*, 48, 1964 (2014).
- Mann R. M., Hyne R. V., Choung C. B., Wilson S. P.: *Environmental Pollution*, 157, 2903 (2009).
- Hung Y. C., Chang W. C., Chen L. M., Chang Y. Y., Wu L. Y., Chung W. M., Lin T. Y., Chen L. C., Ma W. L.: *Journal of Cellular Physiology*, 229, 752 (2014).
- Etoh T., Nakai H.: *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40, 820 (2014).
- van Halteren H., Mulder D., Ruijter E.: *Histopathology*, 64, 787 (2014).
- Vercellini P., Vigano P., Somigliana E., Fedele L.: *Nature reviews. Endocrinology*, 10, 261 (2014).
- Athma P., Rappaport R., Swift M.: *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 92, 130 (1996).
- Leake R.: *Lancet*, 347, 1780 (1996).
- Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M.: *Journal of the National Cancer Institute*, 51, 1409 (1973).
- Whirl-Carrillo M., McDonagh E. M., Hebert J. M., Gong L., Sangkuhl K., Thorn C. F., Altman R. B., Klein T. E.: *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92, 414 (2012).
- Yang L., Zahid M., Rogan E. G., Cavalieri E. L., Yager J. D., Visvanathan K., Groopman J., Davidson N. E., Kensler T. W.: *Cancer Research*, 73, (2013).
- Cavalieri E., Rogan E. E.: *Molecular Aspects of Medicine*, 36, 1 (2014).
- Carballa M., Omil F., Lema J. M., Llopart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T.: *Water Research*, 38, 2918 (2004).
- Press-Kristensen K., Ledin A., Schmidt J. E., Henze M.: *Science of the Total Environment*, 373, 122 (2007).
- Pikaar I., Koelmans A. A., van Noort P. C. M.: *Chemosphere*, 65, 2343 (2006).
- Snyder S. A., Westerhoff P., Yoon Y., Sedlak D. L.: *Environmental Engineering Science*, 20, 449 (2003).
- Lai K. M., Johnson K. L., Scrimshaw M. D., Lester J. N.: *Environmental Science & Technology*, 34, 3890 (2000).
- Chang H. S., Choo K. H., Lee B., Choi S. J.: *Journal of Hazardous Materials*, 172, 1 (2009).
- Pyrzynska K., Stafiej A., Biesaga M.: *Microchimica Acta*, 159, 293 (2007).
- Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.: *Chemosphere*, 42, 271 (2001).
- Gabriel F. L. P., Heidlberger A., Rentsch D., Giger W., Guenther K., Kohler H. P. E.: *Journal of Biological Chemistry*, 280, 15526 (2005).
- Sasaki M., Maki J., Oshiman K., Matsumura Y., Tsuchido T.: *Biodegradation*, 16, 449 (2005).
- Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z. L., Williams B. D., Lewis G., Naidu R.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3030 (2004).

48. Robinson B. J., Hellou J.: Science of the Total Environment, 407, 5713 (2009).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Zapojení pregraduálních studentů do řešení výzkumných aktivit centra SIX

Dagmar Chudobová², Ondřej Zítka^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

V druhém čísle časopisu *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* je pro toto čtvrtletí věnován prostor i výzkumným aktivitám na projektu „Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů“ vedeného pod zkratkou SIX (CZ.1.05/2.1.00/03.0072).

Projekt a jeho řešení započalo v roce 2009 a až do svého ukončení v roce 2016 je kladen důraz na řešení hlavního cíle, kterým je výzkum snímání a detekce chemických a biologických látek, a fyzikálních veličin přenášejících komunikačními kanály. V rámci řešení projektu dochází k úzké spolupráci pracovníků Laboratoře Metalomiky a Nanotechnologií pod vedením profesora Reného Kizeka, Vysokého učení technického v Brně pod záštitou docenta Jaromíra Hubálka a Středoevropského technologického institutu, za VUT v čele s profesorem Radimírem Vrbou.

Prostor v aktuálním vydání časopisu dostali studenti bakalářského studijního programu na Mendelově univerzitě v Brně v oboru Biotechnologie rostlin. V rámci jejich studijní praxe vykonávané na našem pracovišti byli zapojeni do laboratorní a výzkumné činnosti úzce spojené s projektem SIX a jejich závěrečným výstupem jsou právě uveřejněné práce mapující v teoretické rovině konkrétní studované problematiky.

Elektrochemická studie flavonoidů ve víně

Nela Bačovská^a, Markéta Komínková^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b,
Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Electrochemical study of flavonoids in wine

Many studies have already proven the positive effects of flavonoids on organisms. There are many plants which content important amounts of these secondary metabolites in their bodies, one of those being certainly vine (*Vitis vinifera*). The consumption of wine products is very popular all over the world and it is also connected with the health beneficial effects that it provides. Red wines content more flavonoids than other white or rosé varieties. It is mainly the consequence of the winemaking process during which the grape skin is either removed or left to release its secondary metabolite content, in case of the red and partially the rosé varieties.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: katechin; kyselina ferulová; pelargonin; resveratrol; víno

Úvod

Vinná réva (*Vitis vinifera*) patří mezi nejdéle pěstované a jednoznačně nejpobulárnější kulturní plodiny na světě. Její oblíbenost je spojena především s výrobou a konzumací vína, ale v menší míře i s přímou konzumací hroznů díky obsahu vitamínu C, E, fenolům a karotenoidům¹. Spotřeba vína celosvětově rok od roku roste, ať už tento trend připisujeme vědecky prokázanému pozitivnímu vlivu jeho konzumace na lidský organismus nebo stále se rozvíjející ekonomice. Dle Českého statistického úřadu se v České republice v roce 2004 vypilo 16,5 litrů vína na osobu, kdežto v roce 2012 se jeho objem zvedl na 19,8 litrů². Hrozny obecně obsahují mnoho kvalitních fenolických látek majících pozitivní vliv na lidský organismus. Mezi nejznámější patří anthokyany, flavonoly a stilbeny, jež zároveň hrají roli v konečné kvalitě vína³.

Obecná charakteristika flavonoidů

Flavonoidy jsou rostlinné pigmenty, neboli produkty sekundárního metabolismu, které je možno najít ve více než 6000 rostlinách⁴, kde plní různorodé funkce. Ve východním Oregonu v USA se podařilo uskutečnit nález flavonolů

a flavonů ve fosíliích z období miocénu, tzn. před 25 - 17 miliony let. Lze tak usuzovat, že schopnost syntézy flavonů je velice starobylým znakem pocházejícím z doby, kdy rostliny začaly osidlovat souš⁵.

Díky ochranné funkci lze většinu flavonoidů klasifikovat jako fytoalexiny⁶. Po ozáření prudkým světlem nebo UV se začnou syntetizovat anthokyany, flavony a isoflavonoidy. Při působení patogenů pak isoflavony a flavanoly. Anthokyany chrání před chladem a nedostatkem fosforu, málo dusíku kompenzují flavonoidy a isoflavonoidy. Obsah kyseliny fenolové se zvýší při pořezání a při nedostatku železa. Další významnou funkcí flavonoidů je zatraktivnění rostliny pro opylovače, jsou semennými vektory a signalizací mezi rostlinami⁴. Flavonoidy se syntetizují z aminokyseliny fenylyalaninu přes fenylypropanoidovou dráhu za účasti tří molekul malonyl-CoA. V prvním kroku je nezbytná přítomnost chalkon syntázy, která závisí na enzymatické aktivitě a transkripci. Dále ji ovlivňují i okolní vlivy, jako množství slunečního záření⁷.

Vzniká tak buď přímo nebo dalšími reakcemi základní flavonoid flavanon, z něhož se diferencuje šest podskupin (**Tab. 1**), jež lze klasifikovat dle stupně oxidace^{5,8}.

SKUPINA	PŘÍKLAD	ZDROJ
Anthoky-anidy	Kyanidin, Pelargonidin, Peonidin	Lílek, ostružina, borůvka, černý rybíz
Flavanoly	Katechin, Epikatechin, Epigallokatechin	Čokoláda, zelený čaj, fazole, třešně
Flavanony	Hesperidin, Naringenin, Eriodictyol	Pomerančový, grepový, citronový džus
Flavonoly	Quercetin, Kaempferol, Myricetin	Cibule, jablka, kapusta, pórek
Flavony	Apigenin, Luteolin	Pažitka, celer, paprika
Isoflavony	Genistein, Daidzein, Glycitein	Sója

Tab. 1: Přehled základních skupin flavonoidů (přepřacováno podle ⁹)

Role flavonoidů v organismech

Anthokyany lze najít napříč celým rostlinným spektrem. Patří mezi největší skupinu rostlinných pigmentů rozpustnou ve vodě. Jejich barva závisí na pH, v kyselém prostředí bude červená, v zásaditém zase modrá ^{10,11}. Role anthokyanů v rostlině je velice rozmanitá, chrání před slunečními paprsky, UV zářením a patogeny. Interakcí s volnými radikály snižují oxidativní stres a svojí pigmentací pomáhají lákat opylovače a semenné přenašeče ⁶. Dále se využívají jako indikátory odrůdové pravosti vína ³. Také jejich přítomnost v lidské výživě přináší mnoho výhod, jako například antioxidační vlastnosti, ochranu nervové soustavy, prevenci proti kardiovaskulárnímu onemocnění a vzniku některých druhů rakoviny nebo redukci vzniku cukrovky ¹⁰. V rostlinné buň-

ce jsou veškeré anthokyany soustředěny do vakuoly, kde se mohou buď volně pohybovat, nebo jsou součástí tonoplastu ¹². Pokud se zaměříme na hrozny, pak na úrovni celých bobulí se akumulují ve slupce, výjimečně u některých variet i v dužnině ³. Konečné množství anthokyanů ve víně tak záleží na způsobu macerace a na její délce, protože k vylouhování je zapotřebí rozrušit pevnou buněčnou stěnu a tonoplast, čímž je umožněno pigmentům přejít do roztoku ^{13,14}. Stárnutím vína se ovšem obsah anthokyanů snižuje a předpokládá se, že interakcí s kyselinou hroznovou vzniká pigment vitisin ¹⁵. I přes složitou syntézu v rostlinné buňce je vstřebávání anthokyanů v těle živočichů velice rychlým procesem. Svého maxima v krevním oběhu dosahují po 15 až 20 minutách po konzumaci, což dokazuje absorpci jejich glykosidů buňkami žaludeční stěny, narozdíl od ostatních flavonoidů, které jsou vstřebávány především v tenkém střevě ^{16,17}. Nicméně jejich reálné využití je velice malé, protože více než 99% je vyloučeno v nezměněné formě z těla močí ¹⁸.

Flavanoly, jako bezbarvé rostlinné pigmenty jsou přítomny ve většině vyšších rostlin ¹⁹, jmenovitě lze uvést např. rod *Camellia* (čajovník), *Theobroma* (kakaovník) a *Vitis vinifera* (réva vinná) ²⁰. Svými funkcemi se velice podobají anthokyanům. Vykazují pozitivní vliv v prevenci kardiovaskulárního onemocnění ^{19,21}.

Flavanony jsou bezbarvé nebo světle žluté pigmenty ²², jsou nejhojněji zastoupené fenoly v citrusech, kde způsobují hořkou chuť těchto plodů. Kromě výše zmíněných společných vlastností pro flavonoidy (antioxidační aktivita, ochrana kardiovaskulárního systému, protizánětlivý účinek) ²³, byl pozorován pozitivní vliv hesperidinu a naringeninu na zpomalení rozvoje nádoru ²⁴.

Flavonoly jsou to žluté kopigmenty anthokyanu, které pomáhají stabilizovat jeho výslednou barvu ^{17,22}. Jejich obsah roste s dobou vystavení slunečnímu záření ²⁵. Flavonol isoquercitrin se jeví jako ideální kandidát na ochranu nervového systému. Poruchy nervového systému mohou vést k Parkinsonově chorobě ²⁶.

Flavony je možno charakterizovat jako žlutá, v tucích nerozpustná rostlinná barviva, která jsou přítomna ve více než 70 různých rodech.

Vyskytují se v celé rostlině, na rozdíl od jejich glykosidů, u kterých formace závisí především na světle, proto se nacházejí hlavně v listech, méně v podzemních částech^{16,25}.

Isoflavony jsou bezbarvý druh flavonoidů, jejichž výskyt a účinky jsou nejlépe prozkoumány u sóji (*Glycine sp.*)²⁷, kde mají za úkol indukovat geny vyvolávající tvorbu hlízek rodem *Bradyrhizobium*²⁸. Lze je zařadit mezi fytoestrogeny pro jejich estrogenní nebo častější antiestrogenní účinky. Tyto pigmenty se ukázaly jako dobrá alternativa nejen pro symptomy během menopauzy, ale také jako ochrana kardiovaskulárního systému²⁹. Pro léčbu osteoporózy lze taktéž využít syntetického isoflavonu postrádajícího estrogenní aktivitu³⁰.

Závěr

Flavonoidy, nebo bioflavonoidy jsou známé zejména pro své antioxidační působení a poskytují ochranu lidskému organismu proti volným radikálům. Nejčastěji je problematika prospěšnosti flavonoidů zmiňována u vína, kde jsou obsaženy ve vyšších koncentracích. Červená vína obecně obsahují v průměru více flavonoidů než vína bílá či růžová. Koncentrace těchto látek je u červených vín několikanásobně vyšší než v bílých vínech. Vyšší obsahy flavonoidů v červeném víně z něj dělají víno zdraví prospěšnější, konzumace vína je pak pozitivní zejména pro osoby se srdečními obtížemi nebo při regeneraci cév.

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Llobera A., Canellas J.: *Food Chemistry*, 101, 659 (2007).
2. urad C. s.: (2011).
3. Flamini R., Mattivi F., De Rosso M., Arapitsas P.,

- Bavaresco L.: *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19651 (2013).
4. Forbes A. M., Meier G. P., Haendiges S., Taylor L. P.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2175 (2014).
5. Martens S., Mithofer A.: *Phytochemistry*, 66, 2399 (2005).
6. He F., Mu L., Yan G. L., Liang N. N., Pan Q. H., Wang J., Reeves M. J., Duan C. Q.: *Molecules*, 15, 9057 (2010).
7. Marinova K., Kleinschmidt K., Weissenböck G., Klein M.: *Plant Physiology*, 144, 432 (2007).
8. Winkel-Shirley B.: *Plant Physiology*, 126, 485 (2001).
9. Eger S., Rimbach G.: *Advances in Nutrition*, 2, 8 (2011).
10. Pojer E., Mattivi F., Johnson D., Stockley C. S.: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 483 (2013).
11. Pecket R. C.: *Journal of Experimental Botany*, 17, 177 (1966).
12. Cadot Y., Chevalier M., Barbeau G.: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1963 (2011).
13. Shahidi F., Naczki M., *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, 2004.
14. O'Byrne P., *Red Wine and Health (Food and Beverage Consumption and Health)*, 2009.
15. Garcia-Alonso M., Rimbach G., Sasai M., Nakahara M., Matsugo S., Uchida Y., Rivas-Gonzalo J. C., De Pascual-Teresa S.: *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 1112 (2005).
16. Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F.: *Febs Letters*, 544, 210 (2003).
17. Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Lamaison J. L., Remesy C.: *Journal of Nutrition*, 133, 4178 (2003).
18. Moller P., Loft S., Alftan G., Freese R.: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551, 119 (2004).
19. Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C. L., Hollenberg N. K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H. H., Kelm M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1024 (2006).
20. Horn P., Amabile N., Angeli F. S., Sansone R., Stegemann B., Kelm M., Springer M. L., Yeghiazarians Y., Schroeter H., Heiss C.: *The British journal of nutrition*, 111, 1245 (2014).
21. Ried K., Sullivan T. R., Fakler P., Frank O. R., Stocks N. P.: *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2012).
22. Velisek J., Cejpek, J., *Biosynthesis of food components*, 2008.
23. Khan M. K., Zill E. H., Dangles O.: *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 85 (2014).
24. So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M., Carroll K. K.: *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 26, 167 (1996).
25. Herrmann K.: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 186, 1 (1988).
26. Magalingam K. B., Radhakrishnan A., Haleagrahara N.: *BMC research notes*, 7, 49 (2014).
27. Lee S. J., Seguin P., Kim J. J., Moon H. I., Ro H. M., Kim E. H., Seo S. H., Kang E. Y., Ahn J. K., Chung I. M.: *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 160 (2010).

28. Chabot S., Belrhlied R., Chenevert R., Piche Y.: *New Phytologist*, 122, 461 (1992).
29. Han K. K., Soares J. M., Haidar M. A., de Lima G. R., Baracat E. C.: *Obstetrics and Gynecology*, 99, 389 (2002).
30. Setchell K. D. R., Cassidy A.: *Journal of Nutrition*, 129, 758S (1999).
31. Rashidinejad A., Birch E. J., Sun-Waterhouse D., Everett D. W.: *Food Chemistry*, 156, 176 (2014).
32. Kopp P.: *European Journal of Endocrinology*, 138, 619 (1998).
33. Estevez L., Mosquera R. A.: *Journal of Physical Chemistry A*, 111, 11100 (2007).



Článek je volně
šiřitelný pod licencí
Creative Commons

(BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Elektrochemická analýza resveratrolu ve víně

Jaroslava Hladíková^a, Markéta Komínková^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b, Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Electrochemical analysis of resveratrol in wine

Previously, it has been proved that resveratrol exhibits beneficial effect towards human health, mainly due to its antioxidant attributes. Naturally, resveratrol occurs in its trans-form and is contained in plenty of plants, but the highest levels were determined in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Thus, a wine contains negligible amounts of this attractive substance and consumption of a wine in appropriate quantity provides advantageous effects on the human body.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: polyfenoly; resveratrol; vinná réva;

Úvod

Četné epidemiologické studie provedené v mnoha zemích naznačují, že strava bohatá na antioxidanty zpomaluje proces stárnutí a snižuje riziko různých civilizačních a jiných onemocnění, například kardiovaskulárních chorob, rakoviny, revmatoidní artritidy, onemocnění plic, šedého zákalu, Parkinsonovy nebo Alzheimerovy choroby nebo aterosklerózy^{1,2}. Předpokládá se, že sloučeninami, které jsou ve velké míře zodpovědné za tyto ochranné účinky, jsou polyfenoly, mezi které se řadí i resveratrol. Jejich aktivita se projevuje schopností redukovat reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) jako jsou hydroxyly, peroxidové radikály a další³. Tyto diskutované sloučeniny inhibují aktivitu enzymů a tvoří komplexy s kovy, které katalyzují oxidační reakce. Jak ukazuje klinický výzkum, biologická dostupnost těchto přirozeně se vyskytujících sloučenin je oproti lékovým formám zdravotně výrazně přírodnější⁴. Nejvíce studované zdroje přírodních antioxidantů jsou ovoce, zelenina, obiloviny, jahody, víno, čaj, cibule, olivový olej a aromatické rostliny⁵.

Polyfenoly v bobulovém ovoci

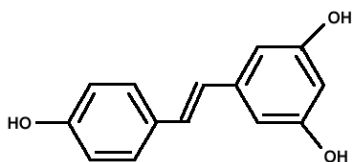
Bobulové ovoce, jako například borůvky (*Vaccinium myrtillus*), ostružiny (*Rubus fruticosus*), černý rybíz (*Ribes nigrum*), kanadské borůvky

(*Vaccinium corymbosum*), arónie (*Aronia melanocarpa*), brusinky (*Vaccinium macrocarpon*), maliny (*Rubus idaeus*), jahody (*Fragaria vesca*) a hroznové víno (*Vitis vinifera*), jsou mimořádně bohatým zdrojem biologicky aktivních látek, zejména fenolických sloučenin^{6,7}. Jejich koncentrace je obvykle vyšší v epidermis a v tkáni bezprostředně pod ní, než ve střední části plodu⁷.

Réva vinná (*Vitis vinifera* L.) hromadí v průběhu zrání velká množství různých fenolických sloučenin v epidermální tkáni, zatímco jejich prekurzory a meziprodukty jsou přítomné v celém plodu. Také je charakteristická syntézou velmi vysokého počtu flavonoidů, které jsou odpovědné za barvu, chuť a nutriční hodnotu plodů. Kromě toho flavonoidy ovlivňují kvalitu vína a jeho uchování⁸. Obsah fenolických látek v bobulích je dán mnoha faktory, jako je druh, odrůda, způsoby a podmínky pěstování, region, klimatické faktory, zralost, doba sklizně, agrotechnické zpracování, posklizňové úpravy, doba a podmínky skladování⁴.

Resveratrol (3,5,4'-trans – trihydroxystilben), jehož strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 1, je látka produkovaná rostlinami zejména v průběhu mykotické infekce a při nepříznivých podmínkách prostředí, jako je například UV záření, a nízké teploty⁹. Je vytvářen konstitutivně nebo se hromadí jako fytoalexin u ně-

kolika rostlinných druhů¹⁰. Bobule hromadí stilbeny v exokarpu jako cis- a trans- izomery resveratrolu.¹¹ Obě formy (cis- i trans-) mohou být vázány na molekuly glukózy. V hroznech je nejhojnější glykosilátová forma¹².

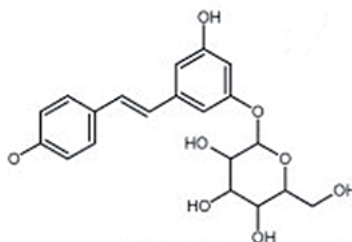
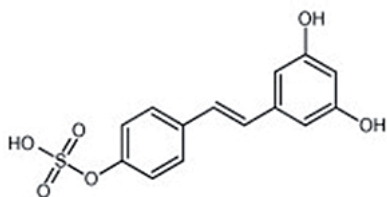


Obrázek 1: Strukturální vzorec resveratrolu

Nejvyšší hladiny přirozeně se vyskytujícího resveratrolu se nachází v kořenech křídlatky japonské (*Reynoutria japonica*). Nejdůležitějším zdrojem resveratrolu jsou však pravděpodobně hrozny révy vinné (*Vitis vinifera*), respektive jejich slupky¹³. Malé množství trans-resveratrolu bylo nalezeno také v borůvkách, brusinkách, červeném rybízu a jahodách¹¹.

Resveratrol se stal nejvíce studovanou fenolovou sloučeninou ve víně kvůli svým příznivým vlastnostem na lidský organismus. Chrání neurony a astrocyty u neurologických a neurogenerativních onemocnění, jako je epilepsie a mrtvice, Alzheimerova a Parkinsonova choroba¹⁴. Má také kardioprotektivní, anti-oxidální, antidiabetické, antikancerogenní, a neuroprotektivní účinky.

Dvěma hlavními metabolity resveratrolu jsou resveratrol-4'-sulfát (RES-S) (Obr. 2A) a resveratrol-3-O-β-D-glukuronid (RES-G) (Obr. 2B). Oba mají základní strukturální podobnost s resveratrolem, jejich účinky na proliferaci buněk však nebyly dostatečně prozkoumány¹⁵.



Obrázek 2:

Strukturální vzorce (A) resveratrol-4-sulfátu a (B) resveratrol-3-O-β-D-glukuronidu

Enzym resveratrol syntáza katalyzuje tvorbu resveratrolu z jedné molekuly hydroxycinnamoyl-CoA a třech molekul malonyl CoA. Hrozny obsahují v mezokarpu i exokarpu navíc ještě kyselinu galovou, chlorogenovou, vinnou, kávovou, ferulovou a také estery glukózy kyseliny p-kumarové a ferulové. V rostlinách mohou tyto estery glukózy sloužit jako aktivované meziprodukty při biosyntéze dalších fenolických látek¹⁰.

Závěr

Obecně platí, že množství resveratrolu bývá u červených vín vyšší než u vín bílých. Z toho také usuzujeme, že červené víno je pro zdraví prospěšnější. Zároveň je dokázáno, že resveratrol se vyskytuje mnohem více ve slupkách bobulí než v dužině. Růžová vína se vyrábí z červených odrůd tak, že slupky po drcení odstraníme po několika málo dnech, ještě než začnou kvasit. Z toho tedy můžeme odvodit, že množství resveratrolu u růžové odrůdy je menší, protože mošt poté kvasí již bez slupek a nestihne se z nich tak vyloučit takové množství látek jako u červených vín.

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Sellappan S., Akoh C. C., Krewer G.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432 (2002).
2. Solyom K., Sola R., Cocero M. J., Mato R. B.: *Food Chemistry*, 159, 361 (2014).
3. Denev P., Kratchanova M., Ciz M., Lojek A., Vasicek O., Nedelcheva P., Blazheva D., Toshkova R., Gardeva E., Yossifova L., Hyrsi P., Vojtek L.: *Food Chemistry*, 157, 37 (2014).
4. Baur J. A., Sinclair D. A.: *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493 (2006).
5. El Gharras H., *Dietary Antioxidants: The Health Promoting Compounds in Vegetables and Fruits*, Studium Press Llc, Houston, 2011.
6. Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K. M.: *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494 (2001).
7. Kahkonen M. P., Hopia A. I., Heinonen M.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076 (2001).
8. Goto-Yamamoto N., Wan G. H., Masaki K., Kobayashi S.: *Plant Science*, 162, 867 (2002).
9. Raj P., Louis X. L., Thandapilly S. J., Movahed A., Zieroth S., Netticadan T.: *Life Sciences*, 95, 63 (2014).
10. Hall D., De Luca V.: *Plant Journal*, 49, 579 (2007).
11. Jimenez-Garcia S. N., Guevara-Gonzalez R. G., Miranda-Lopez R., Feregrino-Perez A. A., Torres-Pacheco I., Vazquez-Cruz M. A.: *Food Research International*, 54, 1195 (2013).
12. Lopez-Alfaro I., Gonzalez-Arenzana L., Lopez N., Santamaria P., Lopez R., Garde-Cerdan T.: *Food Chemistry*, 141, 3759 (2013).
13. Giovino G., Ingrosso I., Paradiso A., De Gara L., Santino A.: *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 191 (2012).
14. Bellaver B., Souza D. G., Souza D. O., Quincozes-Santos A.: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 28, 479 (2014).
15. Robb E. L., Stuart J. A.: *Phytochemistry*, 98, 164 (2014).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Optimalizace multiplex PCR

Matěj Pospíš^a, Petr Michálek^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b, Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Optimization of multiplex PCR

Multiplex PCR is one of the many variants routinely performed by polymerase chain reaction (PCR). Its advantage is especially rapid detection of a large number of products in one reaction using multiple primer sets. Optimization of the multiplex PCR protocol is important also for genes of metallothionein isoforms, so that we can carry out the amplification of more than one DNA sequence. Necessary part of this process is the adjustments in temperature during the reaction steps and also intervention with the changes in the concentration of individual reagents and different combinations or the amount of each primer.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: metallothionein, multiplex PCR, protokol multiplex PCR

Úvod

Multiplex PCR je jednou z mnoha variant rutinně prováděné polymerázové řetězové reakce (PCR). Její předností je především rychlá detekce velkého počtu produktů v jedné reakci za použití několika sad primerů. Ačkoliv princip reakce samotné se neliší od standardního protokolu PCR, správné a efektivní použití metody však vyžaduje její důkladné plánování.

Předmětem naší práce byla optimalizace protokolu multiplex PCR pro geny isoforem metallothioneinu, tak abychom mohli provádět amplifikaci více než jedné sekvence DNA.

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vyvinuta v roce 1983 doktorem Kary B. Mullisem, v biotechnologické firmě Cetus Corporation (Emeryville, Kalifornie, USA). V roce 1993 byla Kary B. Mullisovi udělena Nobelova cena za chemii za tento důležitý objev, který způsobil naprostou revoluci na poli molekulární biologie¹. Metoda je díky svému charakteru velmi široce uplatnitelná v mnoha vědeckých disciplínách, např. ve forenzní medicíně, kriminalistice, biotechnologických aplikacích, prenatální diagnostice, a stala se rutinní procedurou i v

mnoha dalších odvětvích. Její využití je možné právě díky citlivosti a přesnosti, kdy dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku².

Základním principem metody je zmožnění nukleových kyselin nebo jejich částí. Celou metodu lze rozdělit do několika dílčích kroků. Prvním z nich je denaturace. V tomto kroku se DNA po dobu 30 sekund zahřívá na teplotu 94-98°C, neboť při této teplotě dochází k rozvolnění DNA dvoušroubovice vlivem porušení vodíkových můstků³. Vzniknou tak dvě samostatná vlákna DNA, zvaná templátová, na která mohou v dalším kroku (annealing) nasednout primery, což jsou krátké úseky DNA o velikosti oligonukleotidů (nejčastěji 18-25 bp), které jsou komplementární k templátové DNA. Teplota je následně snížena na 50-65°C, dle teploty tání konkrétních primerů⁴. Aby PCR správně proběhla, je potřeba pro každou reakci navrhnout specifické primery, neboť tyto primery jsou navrhovány vždy pro určitý úsek v templátové DNA. Kdyby totiž nasedaly i na jiné úseky, nebyla by amplifikace efektivní, jinak řečeno vznikaly by nespecifické produkty. V dalším kroku (elongace, neboli prodlužování) se pak od primeru F (forward) nebo R (reverse) začíná syntetizovat komplementární vlákno

(od 3'-konce primeru). Poté následuje poslední krok – terminace – kdy dochází k případnému dosyntetizování nukleotidů na templátová vlákna. Takto jsme z templátové DNA získali 2 molekuly DNA, které se dají v dalším cyklu rozložit znovu na templátovou DNA a celý cyklus se zopakuje. Tímto nám po opakovaných cyklech vznikají produkty, sloužící zároveň jako templáty pro další cyklus. Teoretický výtěžek se po 30-35 cyklech může pohybovat kolem 1 miliardy molekul DNA⁵.

Kromě standardního protokolu PCR se v průběhu let objevilo množství jeho variant. Jedny z nejvíce používaných metod jsou PCR v reálném čase (real-time PCR, qPCR)⁶, kdy za přítomnosti sondy můžeme sledovat přírůstky požadovaného produktu reakce, reverzní transkripční PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)⁷, sloužící jako velice citlivý a výkonný nástroj pro detekci a kvantifikaci exprese mRNA, Touchdown PCR (TD-PCR)⁸, která díky temperování vede ke snížení nespecifické amplifikace, Nested PCR s využitím dvou sad primerů a mnoho dalších.

Multiplex PCR

Je modifikace PCR, ve které amplifikujeme dvě či více sekvencí DNA. Tato PCR se skládá ze stejných kroků jako konvenční PCR, kromě toho, že je v každé reakci použito několik sad primerů. Mnohočetná PCR vyžaduje méně času a úsilí při amplifikaci několika cílových úseků než při uniplex PCR. Přestože multiplex PCR poskytuje potenciální úsporu času, protože umožňuje současně detekci několika cílů, k získání všech produktů je potřeba významné optimalizace pro dosažení stejné účinnosti a citlivosti. Proto musí být dodržována opatření při navrhování primerů, aby nedocházelo k negativním interakcím, a je třeba pečlivě stanovit nejlepší poměr koncentrací jednotlivých primerů a reagensů⁹. Primery, které jsou použity při multiplex PCR, nesmí být vzájemně komplementární, měly by mít podobnou teplotu hybridizace a délka produktů namnožených vybranými primery by měla být odlišitelná při separaci na elektroforéze. Nicméně velké rozdíly ve velikostech produktů nejsou žádoucí, neboť zapříčiňují přednostní amplifikaci

kratších úseků a delší fragmenty se nemusí amplifikovat vůbec. Poprvé tuto metodu popsal Chamberlain v roce 1988. Poté se metoda úspěšně aplikovala při testování delecí, či jiných různých mutací DNA¹⁰, dále pak u RT-PCR¹¹ a využití našla také při odhalování infekčních nemocí způsobených viry^{12,13}, bakteriemi¹⁴ a parazity¹⁵.

Metalothionein

Metalothioneiny tvoří skupinu intracelulárních proteinů bohatých na cystein o nízké molekulové hmotnosti, objevenou roku 1957 v koňské slezině¹⁶, jejichž exprese a indukce je spojována s ochranou proti poškození DNA, oxidativnímu stresu a apoptóze. Mnoho výzkumů však dokládá výsledky o tom, že můžeme pozorovat zvýšenou expresi MT v mnoha typech tumorů, například prsu, tlustého střeva, ledvin, jater, plic, nosohltanu, vaječníků, prostaty, slinné žlázy, varlat, štítné žlázy a močového měchýře¹⁷. Výskyt byl zaznamenán jak u bakterií, tak u kvasinek, hub, rostlin a zvířat a jedná se o vůbec nejhojnější skupinu zinek vázajících intracelulárních proteinů v eukaryotických buňkách. Skládají se z 61-62 aminokyselin a dvou globulárních domén. 20 cysteinů v každé molekule je schopno vázat sedm zinečnatých nebo kademnatých iontů, případně až 12 iontů mědi. U savců jsou známy 4 izoformy. MT-1 a MT-2 se nachází u savců ve všech tkáních, s nejhojnějším výskytem v játrech a jejich exprese je indukovaná vnějšími faktory, jakými jsou právě těžké kovy a oxidativní stres. Rychlost přepisu těchto genů je velmi zvýšena při oxidativním stresu, zánětu a za přítomnosti zinku nebo kadmia. MT zde pracuje jako velmi výkonný zhášec hydroxylových radikálů a je schopen nahradit funkci superoxididismutázy¹⁸. MT-3 a MT-4 jsou omezeny na určitá místa, kdy MT-3 je exprimován převážně v mozku a nervové tkáni a MT-4 v epitelálních buňkách pokožky^{19,20}.

Závěr

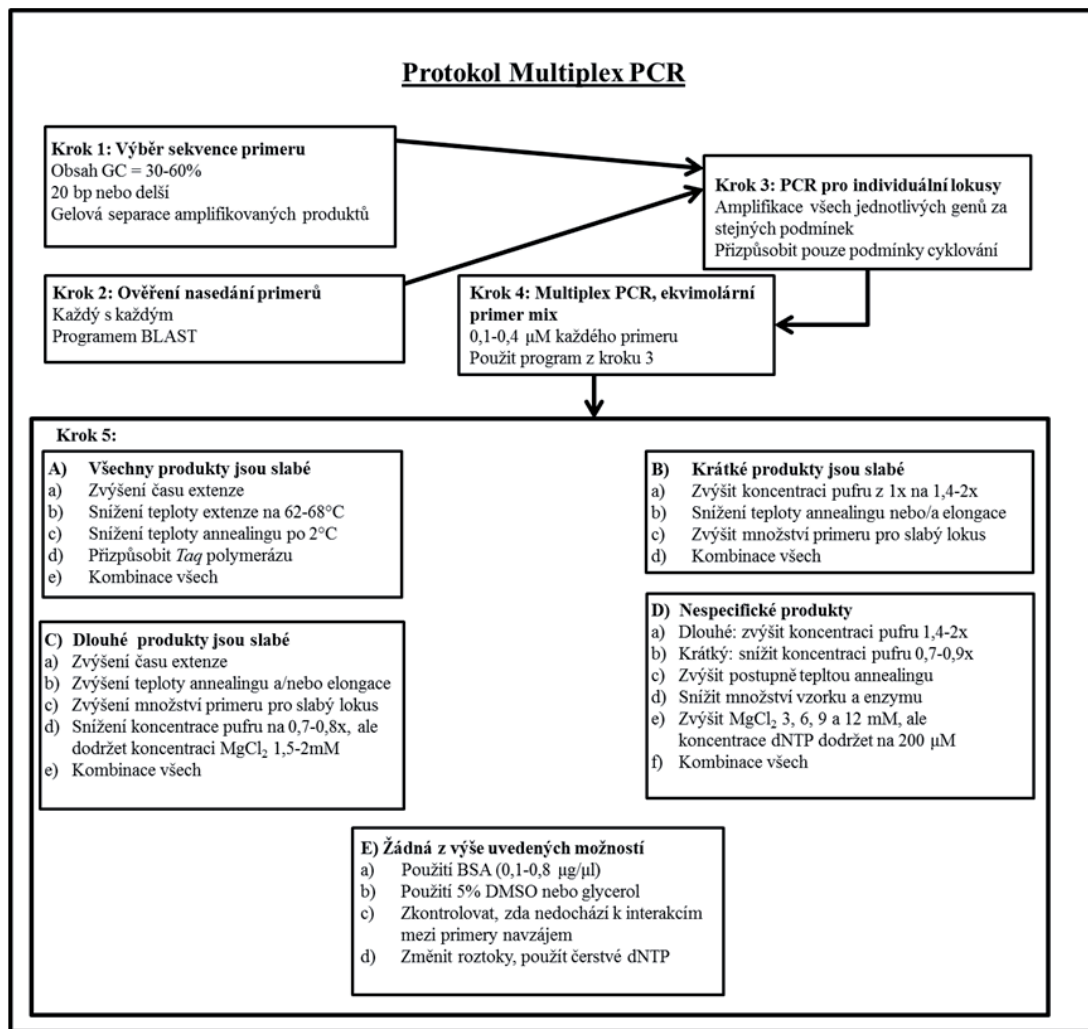
Navržení a optimalizace multiplex PCR protokolu pro geny různých forem metalothioneinu, kdy je vytvořena vhodná kombinace primerů a také změna koncentrací jednotlivých reagensů PCR kitu, je vhodná pro paralelní detekci čtyř

isoforem metalothioneinu. Díky tomu se usnadní práce, ušetří čas (opakování PCR) a finanční prostředky (množství PCR kitu na každou reakci). Zároveň dochází ke zvýšení efektivity procesu, neboť omezíme chybu lidského faktoru z hlediska úspěšné detekce daných genů pro různé isoformy metalothioneinu během jediné reakce.

Optimalizace Multiplex PCR

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.



Obrázek 1: Protokol optimalizace multiplex PCR.
Upraveno podle ⁴

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

Literatura

1. Rabinow P., Making PCR: A Story of Biotechnology, University of Chicago Press, 1996.
2. Livak K. J., Schmittgen T. D.: Methods, 25, 402 (2001).

3. Suchman E.: (2011).
4. Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H.: *Biotechniques*, 23, 504 (1997).
5. Raclavsky V.: (2003).
6. Logan J. M. J., Edwards K. J., *An Overview of PCR Platforms*, Caister Academic Press, 32 Hewitts Lane, Wymondham Nr 18 0ja, Uk, 2009.
7. Bustin S. A.: *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169 (2000).
8. Korbie D. J., Mattick J. S.: *Nature Protocols*, 3, 1452 (2008).
9. Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.: *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16, 47 (2002).
10. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., Caskey C. T.: *Nucleic Acids Research*, 16, 11141 (1988).
11. Crisan D.: *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 24, 355 (1994).
12. Heredia A., Soriano V., Weiss S. H., Bravo R., Vallejo A., Denny T. N., Epstein J. S., Hewlett I. K.: *Clinical and Diagnostic Virology*, 7, 85 (1996).
13. Markoulatos P., Samara V., Siafakas N., Plakocefalos E., Spyrou N., Moncany M. L. J.: *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13, 99 (1999).
14. Hendolin P. H., Markkanen A., Ylikoski J., Wahlfors J. J.: *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2854 (1997).
15. Harris E., Kropp G., Belli A., Rodriguez B., Agabian N.: *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1989 (1998).
16. Simes D. C., Bebianno M. J., Moura J. J. G.: *Aquatic Toxicology*, 63, 307 (2003).
17. Cherian M. G., Jayasurya A., Bay B. H.: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 201 (2003).
18. Andrews G. K.: *Biochemical Pharmacology*, 59, 95 (2000).
19. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J.: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 211 (2003).
20. Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M.: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 627 (2002).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Truong Thanh Huong^a, Markéta Komínková^a, Roman Guráň^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b, Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Identification of microorganisms using MALDI-TOF MS

One of the possible usages of MALDI-TOF MS is identification of microorganisms. It is highly accurate and faster than other methods and suitable for a large area of microorganisms. But unfortunately cannot reliably differentiate some closely related species. Often, it is possible to detect pathogenic organisms and use their accurate determination for monitoring environment, food processing or clinical diagnostics. Data obtained from mass spectra are compared with library of microorganisms and result of this was agreement or disagreement of microorganisms with specific spectrum.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: identifikace bakterií, MALDI-TOF MS, mikroorganismy

Úvod

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) je vysoce přesná, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami¹. Dosavadní znalosti a výsledky pokusů provedených pomocí MALDI-TOF MS dokazují schopnost rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i na kmenové úrovni^{2,3}. Jejich přesné stanovení může sloužit pro monitoring životního prostředí, zpracování potravin, ochranu veřejného zdraví či klinickou diagnostiku, kde je důležité zjištění přítomnosti patogenních organismů⁴⁻⁷.

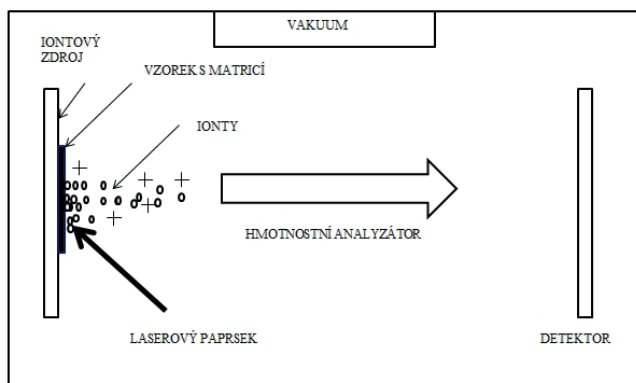
Hmotnostní spektrometrie

Na počátku hmotnostní spektrometrie stál J. J. Thomson, který začal proud částic ionizovaného neonu přes magnetické a elektrické pole, umístěním fotografické desky v proudu iontů neonu změřil jejich odchylku. Pozoroval dvě světelné stopy na fotografické desce, pro které navrhl dvě odlišné odchylky parabol.

Thomson došel k závěru, že neonový plyn byl složen z atomů s různým nukleonovým číslem (²⁰Ne a ²²Ne)⁸. Teoretické základy hmotnostní spektrometrie položil J. J. Thomson roku 1913⁹. O několik let později F. W. Aston sestrojil první moderní hmotnostní spektrometr, který je založen na separaci iontů v silném magnetickém poli permanentního magnetu tzv. magnetického selektoru¹⁰. Pomocí hmotnostního spektrometru identifikoval 212 z 287 přirozeně se vyskytujících izotopů, za což získal v roce 1922 Nobelovu cenu za chemii¹¹.

MALDI TOF-MS

Na Obr. 1 je uvedeno jednoduché schéma MALDI-TOF. Na krystaly matrice se vzorkem je aplikováno laserové záření, které způsobí desorcpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním H⁺ od molekul matrice. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní šterbinu průletového analyzátozu, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polaroty napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátozu. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z .



Obr. 1: Schéma MALDI–TOF hmotnostního spektrometru

TOF analyzátor

Základním principem TOF analyzátoru je extrakce iontů a měření doby jejich letu. Ionty se pomocí vloženého napětí na extrakční mřížku urychlí (extrahují) elektrickým polem a získají rychlost v závislosti na jejich hmotnosti m a velikosti náboje z . Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem m/z , a proto takto urychlené ionty dopadnou na detektor v rozdílném čase, pokud urazí stejnou vzdálenost ^{7,12}.

Ionizace

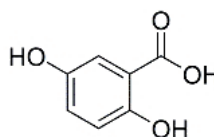
Proces matricí zprostředkované laserové ionizace „matrix assisted laser desorption ionization“ (MALDI) využívá ke své funkci matrici, schopnou transformovat energii laseru na ionizaci a předat ji analytu. V případě MALDI dochází k podobným desorpčním procesům jako v případě LDI (laserem indukovaná ionizace). Energie, která je potřebná pro desorpci, závisí na sublimační energii daného vzorku a chemických reakcích probíhajících v kondenzované fázi těsně před expanzí plazmového obláčku. Při jednom „střelení“ se vytvoří řádově několik tisíc iontů. V průběhu MALDI „mikroexploze“ dochází nejen k desorpčním jevům podobným LDI, ale také k chemickým a fotony indukovaným reakcím. Nejčastěji se využívají dusíkové nebo Nd-YAG lasery emitující UV záření ^{12,13}.

Detektor

Detektor je schopen zachytit dopadající ionty, ze kterých vypočítává hmotnost každého iontu, který na něj dopadne. Velká část detektorů je založena na převodu iontů na elektrický signál pomocí scintilační vrstvy, která při dopadu iontů vydává světelné záření. Tento typ záření je převeden na elektrický proud a dále zesílen. Detektory rozdělujeme na elektronový, fotonásobič a Faradovu klec ¹².

Matrice

Výběr matrice je důležitým faktorem analýzy. Vhodné matrice pro UV lasery jsou aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné nejčastěji ve vodném roztoku acetonitrilu, ethanolu nebo methanolu. Roztok se navíc často okyseluje kyselinou trifluoroctovou. Nejpoužívanější matrice jsou kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Matrice odlišně krystalizují a ionizují látky. DHB (viz Obr. 2) se používá jako univerzální matrice, je vhodná pro stanovení vysokomolekulárních látek, dobře ionizuje peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy ¹².



Obr. 2: Vzorec DHB (2,5 - dihydroxybenzoová kyselina)

Závěr

Hmotnostní spektrometrie je mimo celé řady svého využití velmi často využívána pro identifikaci mikroorganismů ^{12,14}. Tato práce shrnuje vlastní popis analytické metody, a to především v souvislosti s vlastní detekcí mikroorganismů. Vyhodnocená data získaná z hmotnostních spekter a následující porovnání s knihovnou

hmotnostních spekter mikroorganismů v programu MALDI Biotyper slouží k identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu, druhu a často i kmenu¹⁵. Výsledkem porovnání může být shoda nebo neshoda s hmotnostními spektry vzorku¹⁶. Program Biotyper vyhodnocuje výsledky pomocí tzv. skóre (nejvyšší možná hodnota je 3), které je dále barevně označeno červenou (žádná shoda), žlutou (částečná shoda) a zelenou (plná shoda) barvou¹⁷. Příčiny neshody výsledků s knihovnou mohou často souviset například s kontaminací vzorků s jinými mikroorganismy nebo nesprávnou kultivací mikroorganismů¹⁷.

Tato práce byla financována z projektu SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y.: Journal of thoracic disease, 6, 534 (2014).
- Trevino M., Areses P., Penalver M. D., Cortizo S., Pardo F., del Molino M. L. P., Garcia-Riestra C., Hernandez M., Llovo J., Regueiro B. J.: Anaerobe, 18, 37 (2012).
- Pinto L., Poeta P., Vieira S., Caleja C., Radhouani H., Carvalho C., Vieira-Pinto M., Themudo P., Torres C., Vitorino R., Domingues P., Igrejas G.: Journal of Proteomics, 73, 1535 (2010).
- Schafer M. O., Genersch E., Funfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B., Karger A.: Veterinary Microbiology, 170, 291 (2014).
- Wang W., Xi H., Huang M., Wang J., Fan M., Chen Y., Shao H., Li X.: Journal of thoracic disease, 6, 524 (2014).
- Chalupova J., Raus M., Sedlarova M., Sebela M.: Biotechnology Advances, 32, 230 (2014).
- DeMarco M. L., Ford B. A.: Clinics in Laboratory Medicine, 33, 611 (2013).
- Thomson J. J.: Proceedings of the Royal Society, 1, 1 (1913).
- Thomson J. J.: Science (New York, N.Y.), 37, 360 (1913).
- W. A. F.: Phys. Review, 316 (1918).
- Aston F. W.: 152 (1922).
- van den Boom D., Wjst M., Everts R. E.: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1015, 71 (2013).
- Cho Y. T., Su H., Huang T. L., Chen H. C., Wu W. J., Wu P. C., Wu D. C., Shiea J.: Clinica Chimica Acta, 415, 266 (2013).
- Samb-Ba B., Mazenot C., Gassama-Sow A., Dubourg G., Richet H., Hugon P., Lagier J. C., Raoult D., Fenollar F.: Plos One, 9, (2014).
- Braga P. A. C., Tata A., dos Santos V. G., Barreiro J. R., Schwab N. V., dos Santos M. V., Eberlin M. N., Ferreira C. R.: Rsc Advances, 3, 994 (2013).
- Sauer S., Kliem M.: Nature Reviews Microbiology, 8, 74 (2010).
- Machen A., Drake T., Wang Y. F.: Plos One, 9, (2014).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Studium vlivu neplatínových cytostatik na polymerázovou řetězovou reakci

Simona Dostálová^{a,b}, Martin Vetter^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b,
Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Influence study of non-platinum cytotoxic drugs on polymerase chain reaction

The tumor is a cellular process, whose essence is the change of the genetic information and regulatory processes in the cell. Consequently, occurs to the uncontrolled multiplication of cells. Cytostatics, especially anthracycline antibiotics are currently widely used for example in the treatment of breast cancer or prostate cancer, which are nowadays the most frequent cancers. The influence of non-platinum cytotoxic drug doxorubicin on polymerase chain reaction can be studied using fluorescent labelling of amplicons. Due to numerous side-effects of doxorubicin, it is important to know its mechanism of influence on living cells. Polymerase chain reaction can serve as a suitable model of replication in living cells.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: antracykliny, cytostatika, doxorubicin, nádorové bujení, polymerázová řetězová reakce

Úvod

Polymerázová řetězová reakce (PCR), objevená v roce 1983, slouží k amplifikaci specifických částí nukleových kyselin. K jejímu provedení postačuje velmi malé množství vzorku, díky čemuž se používá zejména v lékařské diagnostice nebo kriminalistice¹. Probíhá v opakovaných cyklech, složených z několika částí^{2,3}. První z nich je denaturace, kdy se DNA po dobu 30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozvolnění DNA dvoušroubovice vlivem porušení vodíkových můstků¹. Vzniknou tak dvě samostatná vlákna DNA, zvaná templátová, na která mohou v dalším kroku (annealing) nasednout primery, tj. krátké úseky druhého vlákna. Při annealingu se teplota sníží na 50-65 °C, přesná hodnota určená dle teploty tání konkrétních primerů². Pro každou konkrétní aplikaci PCR je třeba navrhnout dvojici specifických primerů, protože je nutno zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na komplementární sekvenci v templátové DNA. Samotnému prodlužování úseku se říká elongace. Protože však podle jednoho templátového vlákna vznikne jen jedna kopie,

je nutno zajistit řetězové hromadění produktu. To se provádí opakovanými cykly denaturace, nasedání primeru a extenze primeru. Vzniklé produkty slouží zároveň jako templáty pro další reakční cyklus³.

K obdobnému ději, zvanému replikace, dochází v živých buňkách při jejich množení⁴. PCR tak může sloužit jako modelová reakce pro studium vlivu různých látek na replikaci DNA v buňkách. To může být důležité zejména při osvětlení mechanismu účinku protinádorových léčiv.

Nádorové bujení je buněčný proces, jehož podstatou je změna genetické informace a regulačních procesů v buňce, v důsledku čehož dochází k nekontrolovanému zmnožení buněk. Nádor může vzniknout z jakékoliv živé buňky, vyjma těch buněk, které nevratně ztratily schopnost dělit se⁵. Nádorové bujení může postihnout kohokoliv, některé faktory však jeho vznik usnadňují. Říkáme jim faktory rizikové¹¹. Největší podíl na samotném vzniku bujení mají pak faktory vnější, jako například výživový faktor, kouření, alkohol a nízká pohybová aktivita. Pouze 10 % tvoří faktor dědičné

predispozice. Rakovinné buňky oproti normálním mají zvýšenou schopnost proliferace, odolnost a invazivnost⁹. Klasifikace typu rakoviny se za posledních 30 let velmi zlepšila. Nyní se nově objevené druhy klasifikují do nových, či do již existujících tříd¹³.

Rozdíly ve způsobech transkripce tvoří většinu biologické diverzity lidských buněk a nádorů. V každé buňce transdukcí signály a regulační systémy přenášejí informace o identitě jednotlivých buněk v rámci jejich životního poslání. Tím jsou kontrolovány hladiny exprese všech genů v genomu¹². Například postup klasifikace typu leukemie se tvoří na základě sledování genové exprese pomocí DNA mikročipů, které jsou popsány jako vzorový případ při aplikování lidem s akutní leukemií. Touto procedurou se automaticky určí rozdíl mezi akutní myeloidní a akutní lymfoblastickou leukemií, bez předchozích vyšetření. Výsledky podobných výzkumů ukazují možnost použití genové exprese nejen ke klasifikaci leukemie, ale i různých dalších typů rakoviny, nezávisle na předchozích biologických znalostech¹³. Jednou z cest léčby nádorového bujení je léčba pomocí cytostatik.

Protinádorová léčiva neboli cytostatika, jsou látky, které poškozují, zpomalují nebo zastavují růst buněk. Mohou poškozovat DNA, inhibovat syntézu DNA nebo znemožňovat replikaci buněk⁶. Nejvíce působí na rychle se dělící buňky, jako jsou právě nádorové buňky, vlasové folikuly nebo buňky sliznic. Kvůli působení na zdravé buňky má mnoho cytostatik řadu vedlejších účinků⁷. Mezi nejznámější patří poruchy trávicí soustavy, způsobené zastavením růstu buněk sliznice, padání vlasů, poruchy krvetvorby nebo nervové soustavy⁸. Cytostatika lze zařadit do několika skupin, dle složení a mechanismu jejich účinku a řadí se mezi ně například inhibitory topoizomerázy, hormony, radioizotopy nebo interkalační cytostatika.

K nejčastěji používaným cytostatikům patří antracyklinová antibiotika. Využívají se například při léčbě zhoubných nádorů prsu nebo prostaty, které patří mezi nejčastější nádorová onemocnění⁹. Vykazují častou kardiotoxicitu, způsobenou kumulací látky v těle při opakovaném podání. Kardiotoxicita pak

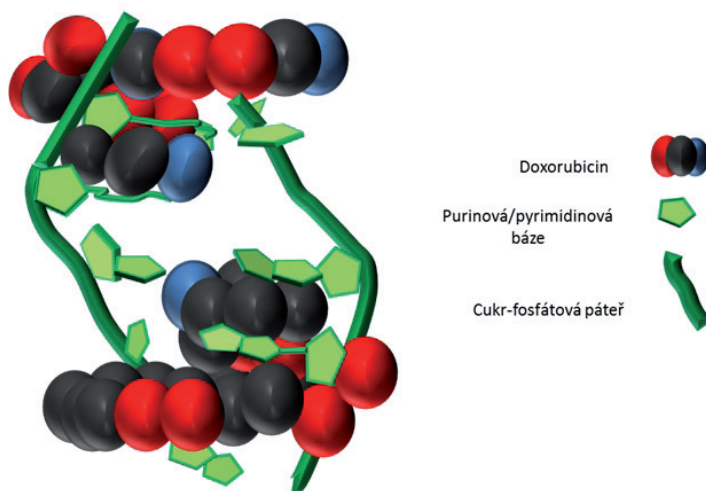
snadno přechází v srdeční selhání s nutností transplantace srdce¹⁰. Stále častější se proto stává využívání liposomálních cytostatik, která díky obalení léčiva liposomální vrstvou disponují sníženou kardiotoxicitou samotného léku a zároveň zvýšením celkového kumulativního množství látky, které je tělo ještě schopno přijmout. Účinek liposomálních a neliposomálních forem je stejný²⁰.

Přestože prvním izolovaným antracyklinovým antibiotikem byl idarubicin, pravděpodobně nejznámějším antracyklinovým antibiotikem z hlediska léčby nádorových onemocnění je doxorubicin (14-hydroxyl-daunorubicin). Doxorubicin vzniká hydroxylací přírodního produktu daunorubicinu izolovaného z bakterie *Streptomyces peucetius*¹¹. Používá se v léčbě karcinomu prsu¹², neuroblastomu¹³, akutní myeloidní leukémie, akutní lymfoidní leukémie¹⁴, Hodgkingského a non-Hodgkingského lymfomu¹⁵, nádorů močového měchýře¹⁶, kůže¹⁷ nebo vaječnicků¹⁸.

Mechanismus účinku doxorubicin je založen na interkalaci mezi páry bází DNA, která tak nemůže být rozpletena a nedochází k replikaci buňky. Struktura DNA je nekovalentně poškozena, interkalované molekuly doxorubicinu odvíjejí dvoušroubovici a prodlužují tak obrysovou délku DNA (**Obr. 1**). Změněná struktura často nemůže být rozpoznána proteiny, které mají s DNA reagovat¹⁹. Může tak docházet také k mutacím, posouvajícím čtecí rámec genetického kódu²⁰. Mezi další mechanismy účinku patří inhibice topoizomerázy²¹, produkce volných radikálů, které poškozují DNA a způsobují lipoperoxidaci membrán²², alkylace²³ a crosslinking DNA²⁴.

Závěr

Nádorové bujení je buněčný proces, jehož podstatou je změna genetické informace a regulačních procesů v buňce, v důsledku čehož dochází k nekontrolovanému zmnožení buněk. Cytostatika, zejména pak antracyklinová antibiotika jsou v současné době široce využívána například při léčbě zhoubných nádorů prsu nebo prostaty, řadících se mezi nejčastější nádorová onemocnění.



Obrázek 1: Interkalace doxorubicinu do dvoušroubovice DNA

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Kennedy S., Oswald N., PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide, Caister Academic Press, 2011.
- Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H.: *Biotechniques*, 23, 504 (1997).
- Raclavsky V.: (2003).
- Sherstyuk V. V., Shevchenko A. I., Zakian S. M.: *Chromosoma*, 123, 183 (2014).
- Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslén L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D.: *Nature*, 406, 747 (2000).
- Kovalova L., McArdell C. S., Hollender J.: *Journal of Chromatography A*, 1216, 1100 (2009).
- Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D.: *The Science of the total environment*, 482-483, 389 (2014).
- Jehn U., Heinemann V.: *Anticancer Research*, 11, 705 (1991).
- Basar E. Z., Corapcioglu F., Babaoglu K., Anik Y., Daglioz G. G., Dedeoglu R.: *Pediatric Hematology and Oncology*, 31, 237 (2014).
- Raj S., Franco V. I., Lipshultz S. E.: *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 16, 315 (2014).
- Bains O. S., Szeitz A., Lubieniecka J. M., Cragg G. E., Grigliatti T. A., Riggs K. W., Reid R. E.: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347, 375 (2013).
- Tang S., Yin Q., Zhang Z., Gu W., Chen L., Yu H., Huang Y., Chen X., Xu M., Li Y.: *Biomaterials*, 35, 6047 (2014).
- Wang G., Edwards H., Caldwell J. T., Buck S. A., Qing W. Y., Taub J. W., Ge Y. B., Wang Z. H.: *Plos One*, 8, (2013).
- Varshosaz J., Hassanzadeh F., Aliabadi H. S., Nayebadian M., Banitalebi M., Rostami M.: *Biomed Research International*, (2014).
- Burley K., Allford S.: *British Journal of Haematology*, 165, 70 (2014).
- Fairey A. S., Daneshmand S., Quinn D., Dorff T., Dorin R., Lieskovsky G., Schuckman A., Cai J., Miranda G., Skinner E. C.: *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 31, 1737 (2013).
- Silverman H. I.: *New England Journal of Medicine*, 333, 257 (1995).
- Shoji T., Takatori E., Kaido Y., Omi H., Yokoyama Y., Mizunuma H., Kaiho M., Otsuki T., Takano T., Yaegashi N., Nishiyama H., Fujimori K., Sugiyama T.: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 73, 895 (2014).
- Box V. G. S.: *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 26, 14 (2007).
- Agudelo D., Bourassa P., Berube G., Tajmir-Riahi H. A.: *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 144 (2014).
- Kato M., Nakayama M., Agata M., Yoshida K.: *Tumor Biology*, 34, 723 (2013).
- Elford H. L., Cardounel A. J., Zweier J., Henry J., Sumpter R., Oakley O., Gallicchio V.: *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*, 47, 502 (2006).
- Taatjes D. J., Fenick D. J., Gaudiano G., Koch T. H.: *Current Pharmaceutical Design*, 4, 203 (1998).
- Post G. C., Barthel B. L., Burkhart D. J., Hagadorn J. R., Koch T. H.: *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 7648 (2005).
- Popenoe E. A., Schmaeler M. A.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 196, 109 (1979).
- Sartiano G. P., Lynch W. E., Bullington W. D.: *Journal of Antibiotics*, 32, 1038 (1979).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Rakovina a možnosti nanotechnologií

Ondřej Zítka, Vojtěch Adam, René Kizek

Rakovina, známá také jako maligní neoplazma, je podle patologie širokou skupinou (až 200 typů) onemocnění. Malignita se v těle může šířit skrz lymfatický oběh nebo skrz krevní řečiště. V takovém případě ale nelze mluvit o benigní neoplazmě nebo nádorech. Ty jsou zpravidla ohraničené a nemají tendenci šířit se do okolí, díky čemuž nejsou tak nebezpečné jako ty maligní. Pro rozvoje onkologického onemocnění působí nejrůznější faktory: chemické (mutageny většinou organického původu), záření (ionizující a neionizující zdroje UV, gamma paprsky), fyzikální částice (vláknité materiály, azbest, práškový Co a Ni), hormonální (obzvláště v hormon dependentních tkáních), infekční (HPV, EBV, herpesviry) dědičnost a řada dalších. Rakovina je podle WHO (World health organization) nejčastější příčina úmrtí a je zodpovědná za více jak 8 milionů úmrtí za rok. Až 30% úmrtí lze zabránit, pokud by se zlepšila například včasná diagnostika.

U rakoviny jsou diskutovány dopady jak sociální tak ekonomické. V rámci výskytu tohoto onemocnění v České republice lze říci, že každý čtvrtý člověk je postižen. To znamená, že výskyt rakoviny zasahuje ze sociálního hlediska každou rodinu. Onkologická onemocnění mají negativní dopad nejen na lidskou psychiku, ale také představují ekonomickou zátěž spojenou s diagnostikou a léčbou onemocnění. Na druhou stranu jsou zde ale i pozitivní ekonomické aspekty jako je vznik nových pracovních míst ve zdravotnictví, ve vědě a zejména stimulace farmaceutického průmyslu. Vývoj nových léčiv pro onkologii patří přitom ve farmacii k oblastem s nejvyšším výskytem finančních investic. Otázkou je, zda mohou nová léčiva vyvinuta na bázi nanotechnologie a bionanotechnologie již nyní konkurovat klasickým léčivům. Ruku v ruce s vývojem léčby musí ale jít i diagnostika, díky které jsou nové případy onemocnění odhalovány.

V rámci konference k příležitosti World Cancer Day (WCD), zaznělo několik prezentací, které byly zaměřeny na podstatu rakoviny a jejího vzniku, a na nové diagnostické metody, které by mohli mít potenciál v personalizované medicíně. Také byla zaměřena pozornost na nové nanotechnologické materiály použitelné pro diagnostiku a také na testování nových nanokonstruktů pro cílenou léčbu.

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981.

Viruses and cancer: papilloma, hepatitis, epstein-barr and rous-sarcoma virus

Branislav Ruttkay-Nedecky^{1,2}, Ana Jimenez^{1,2}, Dagmar Chudobova^{1,2}, Lukas Nejd^{1,2},
Vojtech Adam^{1,2}, Rene Kizek^{1,2}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic, European Union

² Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00 Brno, Czech Republic, European Union

Human papilloma virus (HPV)

Human papillomaviruses (HPVs) are small circular, double-stranded DNA viruses infecting epithelial tissues. HPV is a virus from the papillomavirus family that affects human skin and the moist membranes that line the body, such as the throat, mouth, feet, fingers, nails, anus and cervix. The HPV 16 and 18 strains, which are known to cause nearly all cases of cervical cancer, also raise the risk of developing oropharyngeal (throat) cancer. HPV gains access to basal cells through microabrasions or by infecting the transformation zone, an abrupt transition from a columnar to a squamous epithelium¹. Infected cells actively express the early genes E1, E2, E4 and E5. Viral oncoproteins E6 and E7 are expressed in limited amounts due to transcriptional repression exerted by E2. Infected basal cells migrate to the lumen as they differentiate; differentiated epithelial cells express the late capsid genes L1 and L2. (Fig. 1).

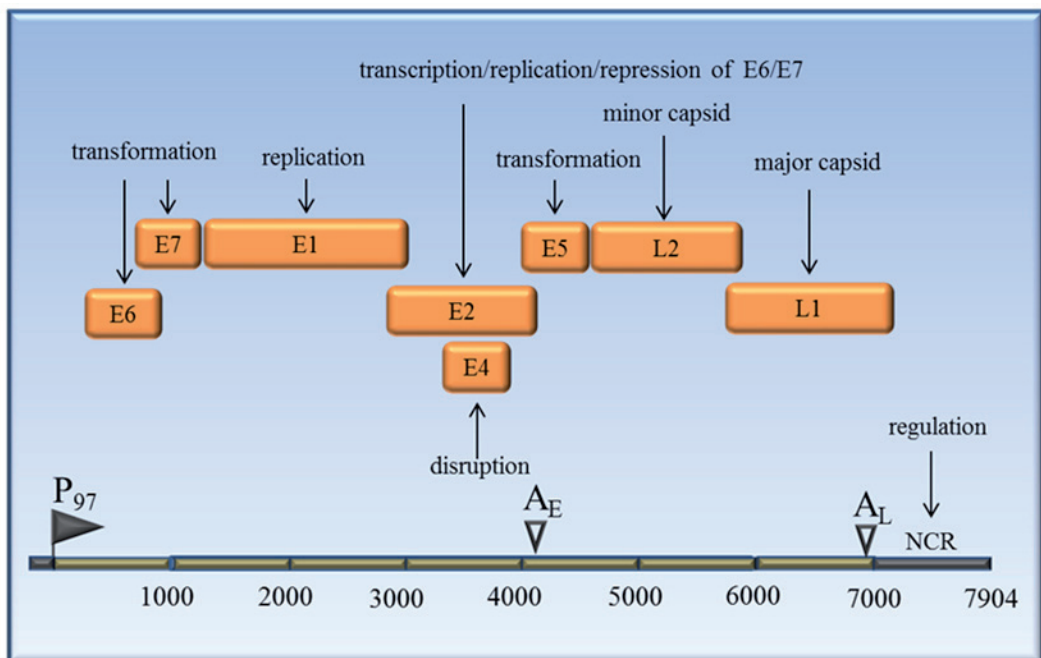


Fig. 1: Genomic organization of the human papillomavirus type 16. ORFs deduced from the DNA sequence are designated E1 to E7, and L1 and L2. The non-coding region (NCR, also known as a long control region) is also shown. A_E and A_L indicate early and late polyadenylation sites²

Hepatitis viruses that cause cancer

Hepatitis B virus (HBV), a member of the hepadnavirus group, double-stranded DNA viruses which replicate, unusually, by reverse transcription. Hepatitis B virus is endemic in the human population and hyperendemic in many parts of the world. A number of variants of this virus have been described. Hepatitis C virus (HCV), is an enveloped single-stranded RNA virus which appears to be distantly related to flaviviruses. Several genotypes have been identified. Infection with this more recently identified virus is common in many countries. Hepatitis C virus is associated with chronic liver disease and also with primary liver cancer in some countries.

Epstein-barr virus (EBV)

The Epstein–Barr virus (EBV), also called human herpesvirus 4 (HHV-4), is a virus of the herpes family, double-stranded DNA virus, and is one of the most common viruses in humans. It is best known as the cause of infectious mononucleosis (glandular fever). It is also associated with particular forms of cancer, such as Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma. Infection with EBV occurs by the oral transfer of saliva and genital secretions. EBV infects B cells of the immune system and epithelial cells. Once the virus's initial lytic infection is brought under control, EBV latently persists in the individual's B cells for the rest of the individual's life.

Rous sarcoma virus (RSV)

The RSV is an avian sarcoma leukosis virus. As soon as RSV infects a cell, its reverse transcriptase synthesizes DNA copies of its genome. These enter the nucleus of the cell and insert themselves randomly throughout the DNA of the host's chromosomes. Normal gene transcription within the nucleus now produces an RSV messenger RNA (mRNA) that reenters the cytoplasm. Some copies of this mRNA are then translated by the normal machinery (e.g., ribosomes) of the host cell into protein products. Other copies of the RNA become incorporated into new virus particles. The Rous sarcoma

virus has only 4 genes : gag, which encodes the capsid protein; pol, which encodes the reverse transcriptase; env, which encodes the envelope protein; src, which encodes a tyrosine kinase, an enzyme that attaches phosphate groups to Tyr residues on a variety of host cell proteins. What makes RSV oncogenic? The answer is *src*. The expression of this gene in some way — still only dimly understood — is able to transform cells in culture.

Acknowledgment

Financial support from the project Liga proti rakovine Praha 16002/2013-981 is highly acknowledged.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

References

1. Chen R. W., Aaltonen L. M., Vaheri A.: Reviews in Medical Virology, 15, 351 (2005).
2. Ruttkay-Nedecky B., Jimenez A. M. J., Nejdil L., Chudobova D., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Kizek R.: International Journal of Oncology, 43, 1754 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Antisens oligonukleotidy jako nástroj pro boj s nádorovými onemocněními

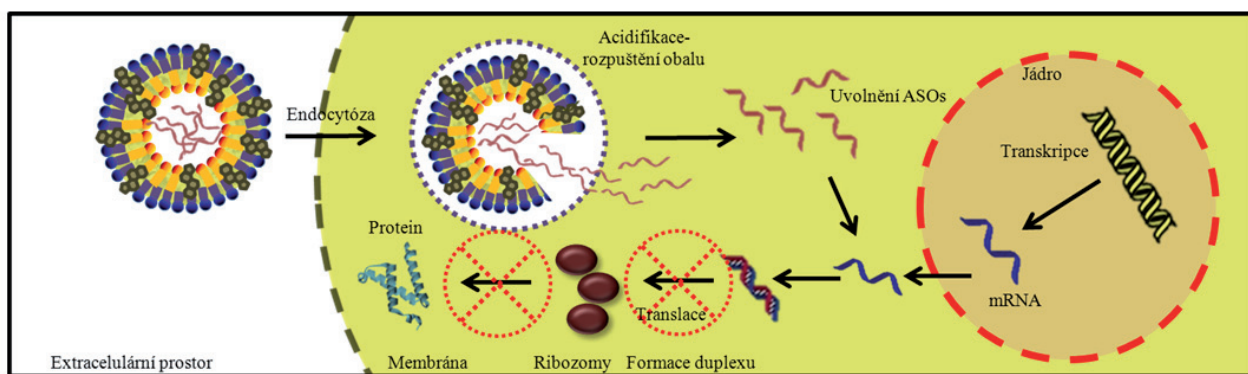
Zbyněk Heger^{1,2}, Ondřej Zítka^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

The main role of antisense oligonucleotides (ASOs) is down-regulation of the expression of target molecule, due to formation of a duplex with its encoding mRNA

(Fig. 1). Although a great potential of ASOs has been already described, there is still big problem with transport into cell¹. Hence, the aim of our study was transfection of MCF-7 cells using cationic liposomes, loaded with ASOs against estrogen receptor alpha (ER α) and determination of disparities in cell proliferation and chemosensitization



Obrázek 1: Obecné schéma efektu antisense oligonukleotidu, blokujícího translaci cílového proteinu

Výsledky a diskuse

Z výsledků vyplývá, že enkapsulace do liposomu zefektivňuje vstup ASOs do MCF-7 buněk. Navíc bylo ukázáno, že ASOs ER α mají velký potenciál působit antiproliferativně, snižovat expresi genů i hladinu oxidačního stresu. Dalším benefitem plynoucím z aplikace ASOs ER α je, že jsou schopny chemosensitivizovat nádor díky snížení hladiny GSH, metalothioneinu a genu *Nf- κ B1*, tvořící resistenci proti běžným cytostatikům.

Závěr

Námi připravené liposomy mohou sloužit jako vhodný transportový systém, využitelný pro antisense aplikace. Z výsledků vyplývá, že transfekce probíhá již u nízkých koncentrací ASOs (1 μ M).

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Skoblov M. Y.: Molecular Biology, 43, 917 (2009).



Článek je volně
širitelný pod licencí
Creative Commons

(BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a
dokument nelze měnit a používat pro komerční
účely.

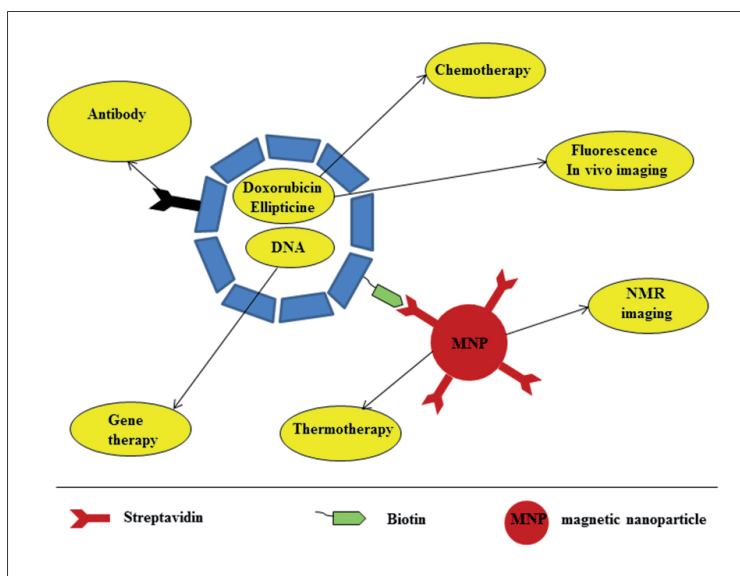
Apoferritinový transportér léčiv

Pavel Kopel^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Apoferritin is protein, which can be prepared by removing of iron oxides and/or hydroxides from ferritin. That leads to formation of cavity that can be employed for encapsulation of various types of compounds. The exist two possible different mechanisms of encapsulation: i) utilization of natural channels in protein structure or ii) disassociation of protein structure through pH changes. Disassociated fragments are than mixed with required cargo and via increased pH, the structure self-assembles. Unencapsulated cargo is mostly removed by using dialysis. Thus prepared complex can be used for target delivery towards a tumor site, where a cargo is released due to decreased pH. Moreover, one large advantage is the possibility of apoferritin surface modification (Fig. 1).



Obrázek 1: Obecné schéma možností využití apoferritinu k cílené léčbě

Výsledky a diskuse

Bylo ukázáno, že povrch apoferritinu lze modifikovat pomocí biotinu a protilátky. Vazba biotinu streptavidinu byla využita pro připojení paramagnetického oxidu železitého. To lze využít pro purifikaci a samozřejmě pro transport

pomocí magnetického pole. Transportér lze takto využít ke kombinované léčbě a termoterapii. Magnetické vlastnosti lze navíc využít i pro zobrazení místa nádoru.

Závěr

Byli jsme úspěšní v přípravě apoferritinu s doxorubicinem a platinovými léčivy. Vytvořili jsme také komplex s navázanou superparamagnetickou látkou pro cílený transport.

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Dospivova D., Hynek D., Kopel P., Bezdekova A., Sochor J., Krizkova S., Adam V., Trnkova L., Hubalek J., Babula P., Provaznik I., Vrba R., Kizek R.: International Journal of Electrochemical Science, 7, 6378 (2012).
2. Blazkova I., Nguyen H. V., Dostalova S., Kopel P., Stanisavljevic M., Vaculovicova M., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R., Adam V.: International Journal of Molecular Sciences, 14, 13391 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Separáční techniky ve výzkumu rakoviny

Markéta Vaculovi ov^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹  stav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brn , Zem d lsk 1, CZ-613 00 Brno,  esk republika ,Evropská unie

² Středoevropsk technologick institut, Vysok  u en technick  v Brn , Technick 3058/10, CZ-616 00 Brno,  esk republika, Evropská unie

Separation techniques are nowadays indispensable tool in cancer research. They can serve for identification of cancer cells, evaluation of novel biomarkers and for development and characterization of new chemotherapeutic.

These techniques are currently often utilized for separation of cancer cells in microfluidic devices, enabling effective separation of healthy and cancerous cells. In field of identification and detection of novel biomarkers plays an emerging role particularly mass detection, hyphenated with liquid chromatography or capillary electrophoresis. There is necessary to emphasize the importance of database systems, which enable management of a large amount of data, provided by using of these approaches. In identification of new potential biomarkers, gel electrophoresis is often employed for separation of proteins in samples before mass spectrometry analyses (2D-PAGE/MS), which enabled identification of nowadays commonly used biomarkers as estrogen receptor in ER+ breast carcinomas or haptoglobin Hp2 in hepatocellular carcinomas. Smaller molecules as amino acids may also provide crucial information about health status. Broadly discussed sarcosine seems to be very promising in field of diagnosis and prognosis of prostate carcinomas. Robust and sensitive analyses for quantification of this molecule may be performed on ion-exchange liquid chromatography with post-column derivatization with ninhydrin and VIS detection. The urinary samples are simply evaporated and resuspended prior to analyses. This makes from sarcosine analysis relatively rapid and moreover, without painful procedures like transrectal sonography or biopsy.

The application of separation methods in the pharmaceutical research is also very important, not only for identification of novel usable pharmaceuticals, but also for monitoring of interactions between drugs and biologically active molecules.

Zv r

Separáčn metody jsou nepostradatelnm nástrojem při onkologick  v zkumu a jejich potenciln praktick  uplatn n ješt  vce vzroste s rozvojem konceptu lab-on-chip.

Pod kovn

Práce byla finan n  podpořena projektem Liga proti rakovin  Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Heger Z., Zitka O., Krizkova S., Beklova M., Kizek R., Adam V.: Neuroendocrinology Letters, 34, 123 (2013).
2. Cernei N., Heger Z., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Babula P., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R., Adam V.: International Journal of Molecular Sciences, 14, 13893 (2013).
3. Heger Z., Cernei N., Gumulec J., Masarik M., Eckschlager T., Hrabec R., Zitka O., Adam V., Kizek R.: Oncology Reports, 31, 1846 (2014).



Článek je volně
širitelný pod licencí
Creative Commons
(BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a
dokument nelze měnit a používat pro komerční
účely.

Carbon nanotubes as etoposide nanocarrier

Amitava Moulick^{1,2}, Hoai Viet Nguyen^{1,2}, Zbyněk Heger^{1,2}, Vedran Milosavljevic², Pavel Kopel^{1,2}, Vojtech Adam^{1,2}, Rene Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Etoposide, etoposide phosphate or VP-16 is a cytotoxic agent (anticancer drug) which acts as a topoisomerase II inhibitor. It can show activity against a wide range of cancers including testicular, small cell lung, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, AIDS-related Kaposi's sarcoma and acute myelogenous leukemia¹. The present work aims to improve a better way of cancer treatment using a complex of etoposide (ETO), multiwall Carbon Nanotube (MWCN), antisense Oligonucleotide and magnetic particle (MAN) (Fig. 1).

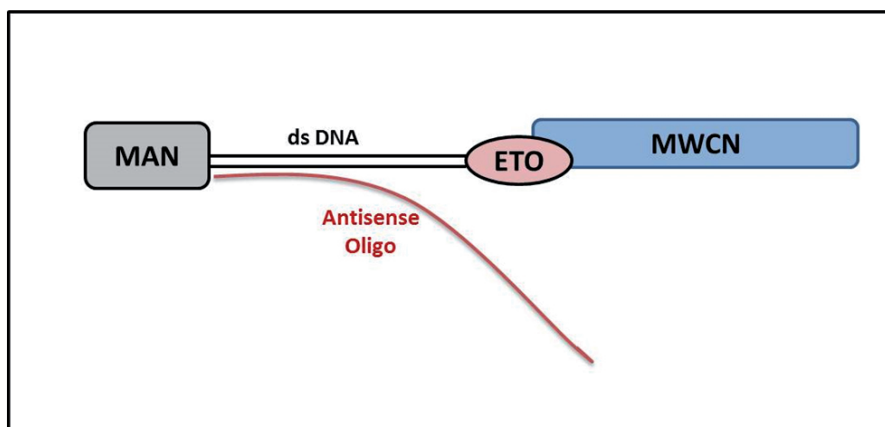


Fig. 1: Expected diagram of the target complex

Results and discussion

Different concentrations (1; 5; 10 and 15 mM) of Etoposide were used to interact with MWCN (1 mg.mL⁻¹). Subsequently, ds DNA and magnetic particle were successfully attached to this complex. The entire complex was further used for triple hybridization with antisense oligonucleotide, complementary to estrogen receptor of estrogen receptor positive breast carcinoma cells that is still one of the leading causes of cancer-related death in woman worldwide. Using electrochemical methods, entire complex was characterized to comprise 15 mM etoposide (in case of 15 mM concent-

ration of etoposide used for conjugation) and it was shown that recovery of conjugation is with no or minimal losses of chemotherapeutics and all etoposide molecules are conjugated to carbon nanotubes inner and outer surface. Entire complex offers simple and reproducible way of binding of etoposide and its simple purification due to presence of paramagnetic nanoparticle. Future aim is application of complex towards MCF-7 (ductal invasive estrogen receptor positive breast carcinoma cell line) and observation of antiproliferative effect, real-time expression of chosen genes, blotting analyses of protein expression and electrochemical microarray.

Conclusion

We proposed the novel complex that can possible attack the cancer cells by two different ways: i) through inhibition of topoisomerase II via etoposide presence that can lead to alteration of DNA synthesis and triggers apoptosis, ii) through presence of antisense oligonucleotide against estrogen receptor alpha. This portion can effectively down-regulate the target ER protein that is responsible for proliferative attributes of MCF-7 cells and often causes chemoresistance of tumorous cells. Carbon nanotubes (MWCN) can help in cell penetration and successful transfection.

Acknowledgement

The work was financially supported by the project Liga proti rakovine Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literature

1. Kobrinsky N., Packer R., Boyett J., Stanley P., Shiminski-Maher T., Allen J., Garvin J., Stewart D., Finlay J.: Journal of Neuro-Oncology, 45, 47 (1999).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Fluorescence imaging of quantum dots

Iva Blazkova^{1,2}, Marketa Vaculovicova^{1,2}, Vojtech Adam^{1,2}, Rene Kizek^{1,2}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic, European Union

² Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00 Brno, Czech Republic, European Union

Quantum dots (QDs) are small semiconductor nanoparticles with excellent optical and electronic properties. QDs exhibit high quantum yield with narrow and size tunable spectra. Quantum dots can be employed in different applications and currently they are often utilized as fluorescence labels in bioassays. Quantum dots can establish a bond with specific biomolecules, like antibodies, enzymes or oligonucleotides. These enable specific targeting with a sensitive optical detection. Quantum dots show also great potential for immunosensing. Since they are more stable than organic fluorophores, their application allows multiplex immunoassays and/or fluorescence resonance energy transfer (FRET). In contrast to functionalization with ligands, bioconjugation of QDs is more complicated, restricted with a size of the molecule used for conjugation [1].

For the targeted therapy to the tumour tissue, the active targeting by receptor-specific ligands (folic acid, carbohydrates, proteins, or peptides) can be the most advantageous. The aim is the maximal cumulation in target location and reduction of the interaction with non-target biomolecules. The fast growing tumour is nourished through pathological angiogenesis. This phenomenon results in enhanced permeability and retention effect (EPR) that enables passive targeting [2]. It can be useful in accumulation of PEGylated Ag₂S quantum dots in tumorous site. PEGylated Ag₂S quantum dots seem to be promising fluorescence nanoprobe for in vivo imaging, due to a high accumulation in mice model. Instead of the tumor, the quantum dots were detected in reticulo-endothelial system especially in liver and spleen. Blood circulation of this complex was 3.66 hours [3]. For the better distribution, the quantum dots were coated by silica and PEGylated. Intriguingly, this coating did not provide quenching of fluorescence. After their application into the tail vein of mouse, it was possible to detect the highest concentration in the liver, low fluorescence of quantum dots was also detected in spleen and lungs [4]. For the targeted delivery of quantum dots, it is also possible to use anaerobic bacteria *Bifidobacterium bifidum*. It was observed, that the bacteria culture accumulate in solid tumours, the reason is probably hypoxic microenvironment of solid tumors. The vascular cut off size is between 1.2 and 2 µm, which is enough for this bacteria. Moreover; the modification with folic acid improved the tumor targeting [5].

Quantum dots are nanoparticles with very good fluorescence properties and could be used in the drug distribution studies and the tumor detection and in vivo imaging.

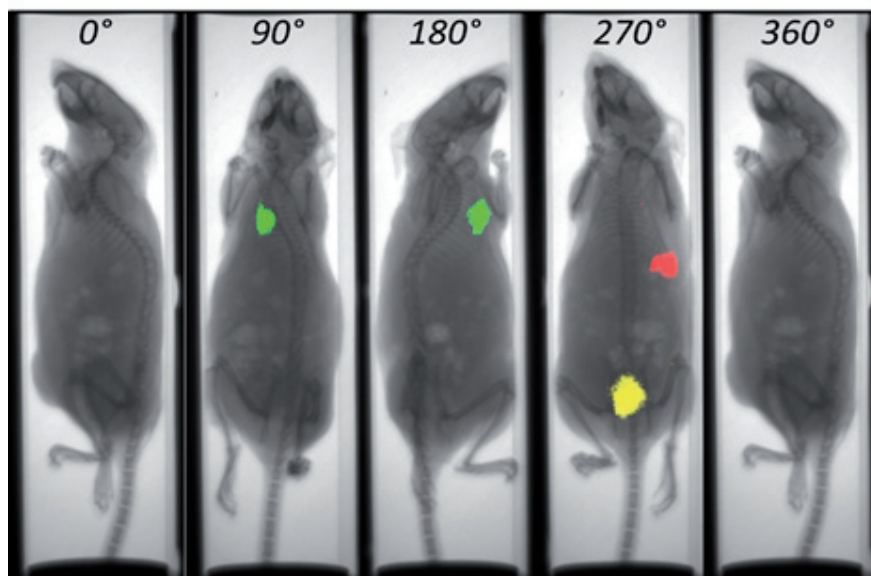


Figure 1: Quantum dots fluorescence (various sizes - various emission maxima) in body of laboratory rat. Scans were obtained in different angles (0° , 90° , 180° , 270° and 360° respectively). For detection was employed Multimodal Animal Rotation System, Rochester, USA).

Acknowledgement

Financial support from the project Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981 is highly acknowledged.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literature

1. Esteve-Turrillas, F.A. and A. Abad-Fuentes, Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. 41: p. 12-29.
2. Li, X.H., et al., „Smart“ nanomaterials for cancer therapy. *Science China-Chemistry*, 2010. 53(11): p. 2241-2249.
3. Zhang, Y., et al., Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice. *Biomaterials*, 2013. 34(14): p. 3639-3646.
4. Kobayashi, Y., et al., In-vivo fluorescence imaging technique using colloid solution of multiple

quantum dots/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticles. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2013. 66(1): p. 31-37.

5. Liu, Y., et al., Bacteria-mediated in vivo delivery of quantum dots into solid tumor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012. 425(4): p. 769-774.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

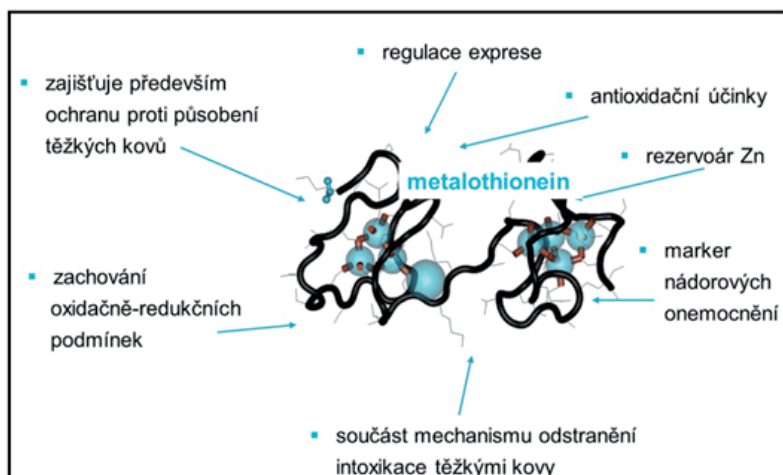
Metallothionein jako prognostický nádorový marker

Kateřina Tmejová^{1,2}, David Hynek^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Metallothionein (MT) is a low mass cysteine-rich protein that occurs in all organisms through evolution. MT fundamentally affects homeostasis of ions of the metals that are bound into its structure. Moreover, its important of maintaining of intracellular redox equilibrium and regulates broad spectrum of highly important genes. Currently, MT is studied as potential biomarker of malignant diseases (mainly prostate cancer, spinocellular carcinomas and other).



Obrázek 1: Obecné schéma funkcí metalothioneinu v organismu

Výsledky a diskuse

MT vyskytující se v organismu je rozdělen do 4 skupin (I. – IV.), přičemž I. třída zahrnuje 10 isoform (u lidí nejčastěji MT-1A, MT-2A). Isoformy MT-1 a MT-2 jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi nízkých koncentracích. Zvýšená exprese MT v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s proliferací nádorových buněk, vyšší intenzitou jejich metabolismu a invazivitou nádoru⁷. Diskutováno je také spojení mezi zvýšenou expresí MT, invazivitou nádoru a funkcí matrixových metalloprotein (MMP), které jsou zinek-dependentní

proteasy schopné degradovat extracelulární matrix v okolí nádoru a tím přispívat k jeho zrychlenému růstu a k tvorbě metastáz. Bylo dokázáno, že MT je schopen aktivovat MMP⁸ a že může potlačovat imunitní odpověď v nádoru⁹. U nádorového bujení má MT pravděpodobně funkci přenašeče a zásobníku zinku, který potřebují rozmnožující se buňky pro nově exprimované enzymy či pro regulační proteiny¹⁰. Při zvýšené koncentraci apo-MT může tento protein vyvázat Zn z tumor-supresorového proteinu p53. Tím se výrazně zhoršuje schopnost navázat se na DNA a spustit signály pro

apoptózu ¹¹. Skutečnost, že MT chrání buňku proti potenciálním škodlivým látkám, může výrazně snížit efektivitu protinádorové léčby cytostatiky ¹².

Závěr

Na základě uveřejněných studií se zdá, že MT je vhodným markerem onkologických onemocnění a proto je vhodné se vlastnostmi, chováním a stanovením tohoto proteinu v souvislosti s rakovinou dále zabývat.

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

LITERATURA

1. Krizkova S., Masarik M., Majzlik P., Kukacka J., Kruseova J., Adam V., Prusa R., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R.: *Acta Biochimica Polonica*, 57, 561 (2010).
2. Masarik M., Gumulec J., Hlavna M., Sztalmachova M., Babula P., Raudenska M., Pavkova-Goldbergova M., Cernei N., Sochor J., Zitka O., Ruttikay-Nedecky B., Krizkova S., Adam V., Kizek R.: *Integrative Biology*, 4, 672 (2012).
3. Krejcova L., Fabrik I., Hynek D., Krizkova S., Gumulec J., Ryvolova M., Adam V., Babula P., Trnkova L., Stiborova M., Hubalek J., Masarik M., Binkova H., Eckschlager T., Kizek R.: *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 1767 (2012).
4. Gumulec J., Balvan J., Sztalmachova M., Raudenska M., Dvorakova V., Knopfova L., Polanska H., Hudcova K., Ruttikay-Nedecky B., Babula P., Adam V., Kizek R., Stiborova M., Masarik M.: *International journal of oncology*, 44, 923 (2014).
5. Gumulec J., Raudenska M., Adam V., Kizek R., Masarik M.: *Plos One*, 9, (2014).
6. Ruttikay-Nedecky B., Jimenez A. M. J., Nejd L., Chudobova D., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Kizek R.: *International journal of oncology*, 43, 1754 (2013).
7. Weinlich G., Eisendle K., Hassler E., Baltaci M., Fritsch P. O., Zelger B.: *British Journal of Cancer*, 94, 835 (2006).
8. Haga A., Nagase H., Kito H., Sato T.: *Cancer Letters*,

105, 175 (1996).

9. Popiela T. J., Rudnicka-Sosin L., Dutsch-Wicherek M., Klimek M., Basta P., Galazka K., Wicherek L.: *Neuroendocrinology Letters*, 27, 786 (2006).
10. Theocharis S. E., Margeli A. P., Kljanienco J. T., Kouraklis G. P.: *Histopathology*, 45, 103 (2004).
11. Meplan C., Richard M. J., Hainaut P.: *Oncogene*, 19, 5227 (2000).
12. Fabrik I., Kakacka, J., Prusa, R., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R. : <http://web2.stapro.cz/bullfons/22008/labo3.pdf> [online], (2008).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Úvod k diagnostickým možnostem nádorových onemocnění

Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Over the life of the organism with continuous regeneration of most cell populations, in which the daughter cells arise from cells of the parent cell division and redundant, damaged or old cells are sequestered by initiating programmed cell death. This process is accompanied by a small, but relative to the total number of cells of the organism numerically significant probability of mutations in DNA (10⁻⁵ to 10⁻¹⁰ per cell per generation). Only in very low percentage occurs in the cell combinations of mutations in critical genes, which causes the failure of control mechanisms of cell proliferation or apoptosis. Subsequent division follows the modified progenitor cells lacking an adequate response to external and internal control mechanisms, causes the development of a clone of cells with malignant potential.

Diagnostika nádorových onemocnění

Jednou z možností, jak snížit počet úmrtí pacientů trpících nádorovým onemocněním, je onemocnění včas diagnostikovat. Pro diagnostické účely je možné využít řadu postupů a technik založených na různých principech.

Zobrazovací rentgenové metody

Rentgenové záření je možné využít pro snímání hrudníku, skeletu, jednotlivých orgánů a také měkkých tkání, kde nachází uplatnění dnes nejpoužívanější zobrazovací rentgenová metoda zvaná výpočtová tomografie (computed tomography) ¹.

Zobrazovací nerentgenové metody

Tyto metody využívají různých fyzikálně-chemických principů pro zobrazení měkkých tkání. Jedním z běžných zástupců technik této oblasti je sonografie, která využívá ultrazvuku odraženého od tkání. Robustnější zobrazovací technikou je magnetická rezonance, která je používána pro zobrazení vnitřních orgánů pomocí silného magnetického pole a elektromagnetického vlnění s vysokou frekvencí.

Positronová emisní tomografie je moderní zobrazovací technikou používanou v lékařské praxi od počátku devadesátých let minulého

století. Pacientovi je před vyšetřením podáno radiofarmakum s velmi krátkým poločasem rozpadu, které je schopno při svém rozpadu produkovat pozitrony. Pozitron se krátce po svém vzniku anihiluje s elektronem. Tato reakce produkuje dva fotony, které jsou snímány pomocí koincidenčního detektoru.

Endoskopie

Je to metoda umožňující prohlédnutí vnitřních tělesných dutin nebo dutých orgánů. V dnešní době se pro tento účel využívá tří typů endoskopů a to endoskopická zrcátka, rigidní endoskopy a flexibilní endoskopy, které již využívají optická vlákna a studené světlo ¹.

Nádorové markery

Biochemické markery v onkologii jsou molekuly, jejichž hladina je v krvi, moči nebo tělesných tkání zvýšena či snížena u pacientů s nádorovým onemocněním oproti obvyklému množství u zdravé populace. Nádorový marker může být produkován nádorem samotným, okolní zdravou tkání v reakci na přítomnost nádoru nebo metastázami ².

Jsou různé typy molekulárních nádorových markerů zahrnující DNA, mRNA, proteiny, antigeny, hormony, které jsme schopni kvantitativně nebo kvalitativně detekovat vhodnými

metodami. Pro detekci nádorových markerů se v dnešní době používá imunohistochemie, kvantitativní imunologické testy, polymerázová řetězová reakce (PCR), western a northern blot, microarrays (genomické a proteomické) a hmotnostní spektrometrie.



autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Závěr

Klinický výzkum se dnes opírá o řadu moderním technologií, postupů a přístupů, které jsou na straně jedné precizní a robustní, na straně druhé vyžadují školenou obsluhu, jejich pořízení i samotný provoz je finančně náročný. Proto je v této oblasti stále značný vývoj, kdy jsou hledány nové postupy a přístupy. V této oblasti se zdají být zajímavé metody zaležené na sledování elektrochemických dějů, které jsou velmi dobře miniaturizovatelné a jejich provoz ani obsluha nevyžaduje velké finanční a časové investice, kde se jeví jako slibná detekce proteinu metalothioneinu ³.

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 16002/2013-981.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Petruzelka L., Konopasek B., Klinická onkologie, Univerzita Karlova, Praha, 2003.
2. Voorzanger-Rousselot N., Garnero P.: Cancer Treatment Reviews, 33, 230 (2007).
3. Adam V., Krizkova S., Zitka O., Trnkova L., Petrlova J., Beklova M., Kizek R.: Electroanalysis, 19, 339 (2007).

Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden

Zapojení Laboratoře metalomiky a nanotechnologií do celonárodní sbírky Ligy proti rakovině Praha

Ondřej Zítka^{1,2}, Branislav Ruttkay-Nedecky^{1,2}, Zbyněk Heger^{1,2}, Pavel Kopel^{1,2}, Amitava Moullick^{1,2}, Markéta Vaculovičová^{1,2}, Iva Blazkova^{1,2}, Kateřina Tmejová^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Laboratory reports

Laboratoř metalomiky a nanotechnologií se již tradičně zapojila do každoroční celonárodní veřejné sbírky „Český den proti rakovině“ organizované Ligou proti rakovině Praha. Abychom zvýšili povědomí o tématu letošní sbírky, proběhla na našem pracovišti dne 14.5.2014 veřejná přednáška s názvem Zhoubné nádory plic – téma „Českého dne proti rakovině“, vedená Ondřejem Zítkou. Tato přednáška byla tematicky zaměřena na základní problematiku zhoubných nádorů průdušnice, průdušek a plic, rizikové faktory, které je vyvolávají, a zejména pak na jejich prevenci. Diskutována byla zejména hlavní příčina nádorů plic v podobě ať už pasivního nebo aktivního kouření cigaretových výrobků. Alarmující je, že vysoký podíl kuřáků se vyskytuje bohužel i u nemocničního personálu a je nutno si přiznat, že i naše řady vědeckých pracovníků nejsou výjimkou.

Naše laboratoř je opakovaně finančně podporována neziskovou organizací Liga proti rakovině Praha pro zabezpečení základního výzkumu v oblasti nádorových onemocnění. To nás zavazuje, abychom kromě odborných výstupů se do činnosti organizace zapojili i formou popularizační a výukovou. A proto se v rámci dobrovolnické činnosti naši pracovníci zapojují i do organizování samotné sbírky.

V tomto roce jsme v areálu nebo těsném okolí Mendelovy univerzity v Brně zřídili čtyři stanoviště, na kterých naši pracovníci prodávali sbírkové kytičky. Na stanovištích nechyběly ani tematické bannery či plakáty s tématy akce roku 2014. Naším pracovníkům se tak nakonec podařilo vybrat skoro 20 tisíc korun českých. Lze tedy konstatovat, že z peněz, které jsme od LPR obdrželi na výzkum, jsme skoro 8% vrátili zpět do fondu. Pracovníkům Laboratoře metalomiky a nanotechnologií, ale také všem, kteří na fond Ligy proti rakovině přispěli anebo do konce září 2014 přispějí formou zaslání DMS, děkujeme.

Poděkování

Pracoviště je spolufinancováno ze zdrojů Ligy proti rakovině Praha

Nové příslušenství:
Eppendorf
ThermoTop®

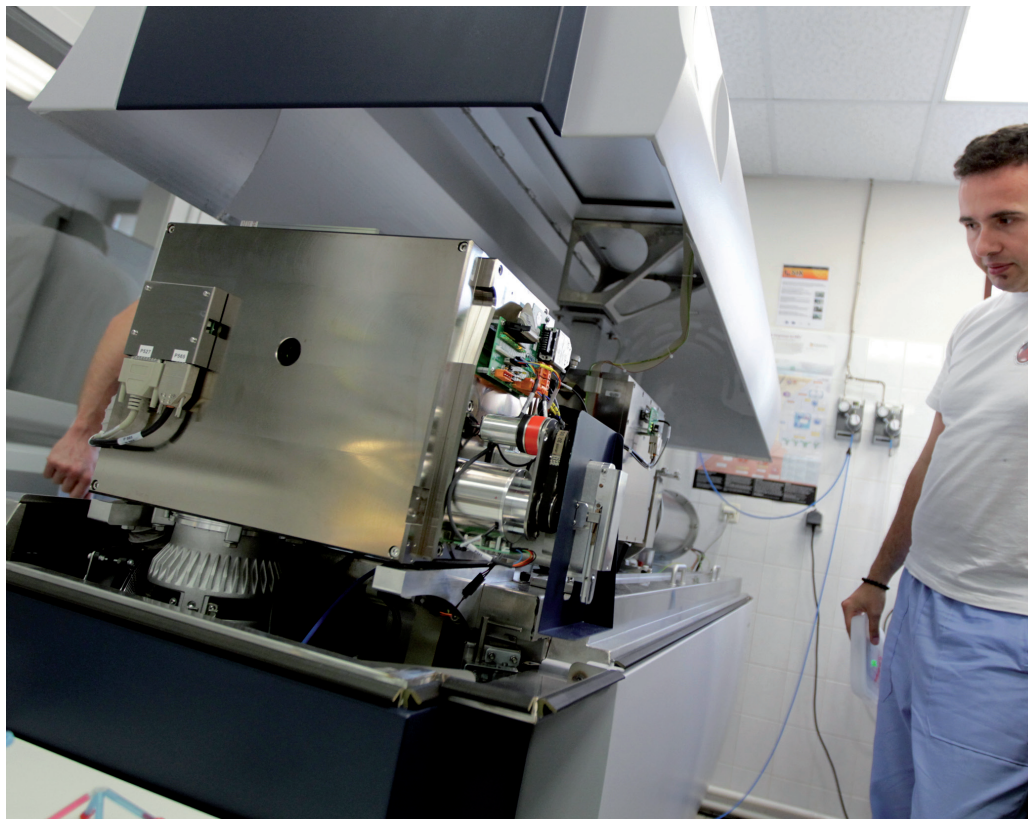


Všestranný talent

Eppendorf ThermoMixer™ a Eppendorf ThermoStat™

- > ^{2D}Kontrola míchání: výborné výsledky míchání ve všech typech zkumavek.
- > Eppendorf QuickRelease™: ergonomická výměna bloků během 2 sekund bez použití nástroje.
- > Intuitivní ovládání: tlačítka s přednastavenými programy a teplotou.
- > Víko Eppendorf ThermoTop: chrání před kondenzací vzorků.

www.eppendorf.com/thermomixer-c



doc. RNDr. Vojtěch ADAM, Ph.D.

Hmotnostní spektrometr MALDI TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker)