

Chemické listy

3



Ženy v české chemii

Sub/superkritická fluidní chromatografie

Vývoj léčiv na bázi thiadiazolů

Hemové senzorní proteiny

Využití 3D lipidových maticí

Multiresponzivní polymerní tracery

Ročník 116

CHLSAC 116 (3) 145 - 200 (2022) ISSN 0009 - 2770 <http://www.chemicke-listy.cz>

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově



Ženy v české chemii



United Nations

International Day of Women and Girls
in Science, 11 February

Myšlenka věnovat březnové číslo našeho časopisu článkům úspěšných žen působících v české chemii vznikla na loňské soutěži „O cenu Karla Štulika“ za nejlepší práci v oboru analytické chemie pro studenty bakalářského a magisterského studia, kde jsme si uvědomili, že v této soutěži, která se konala 11. února, tj. v den, který OSN vyhlásila za **Mezinárodní den žen a dívek ve vědě**¹, se soutěžící studentky umístily na těch nejpřednějších místech a dokázaly, že rozhodně patří mezi vycházející hvězdy naší analytické chemie. Není to s podivem, když si uvědomíme, že na většině českých chemicky orientovaných vysokých škol děvčata představují cca 70 % studentstva (a totéž platí i o většině ostatních států světa). A březnové číslo nám připadlo vhodné vzhledem k tomu, že 8. března slavný **Mezinárodní den žen**, o kterém se u nás příliš nemluví vzhledem k jeho zprofanování za minulého režimu, je stále

Obr. 1. Marie Curie-Skłodowka³

United Nations

International Women's Day
8 March

významným dnem OSN² i UNESCO. Kvalitu vědecké práce českých chemiček prezentujících své výsledky v tomto čísle posoudí jistě naši čtenáři sami. Jejich ochota publikovat v Q4 časopise v dnešní scientometrii posedlé době dokazuje, že si to mohou dovolit vzhledem k dostatku publikací v nejkvalitnějších časopisech. Toto číslo rozhodně nevzniklo, aby usnadnilo publikování žen v našem časopise. To naše ženy díky kvalitě svých výsledků naprosto nepotřebují. Vyšlo spíše jako upozornění na roli žen v české chemii a na to, že celá chemická komunita (a nejen ta) našim ženám cosi dluží. A je dobré si to připomínat a přemýšlet, jak jim jejich nelehkou práci usnadnit ku prospěchu celé naší chemie a její mezinárodní reputace. Jsem si vědom, že příspěvek tohoto čísla k řešení onoho nelehkého úkolu je zanedbatelný ve srovnání např. s příspěvkem Vaška Hořejšího, když založil první mateřskou školu v prostorách akademické instituce, či s příspěvkem mnoha mých slovnitých kolegů, kteří (na rozdíl ode mne, jak sebekriticky přiznávám) pomáhají svým ženám při druhé směně doma, což je možná ženami nejžádanější příspěvek k jejich odbornému rozvoji. A možná by bylo dobře zeptat se žen samotných, co by nejraději viděly. Podle mých zkušeností to nejsou ani kvóty, ani jiné formální výhody po ženy pracující v naší chemii, ale možná prostý respekt k jejich nadlidským výkonům, z nichž muži i při nejlepší vůli dokáží převzít jen nepatrnou a okrajovou část. Ne všechny ženy pracující v české chemii dosáhnou uznání, jakého se dostalo Marii Curie-Skłodowké (viz obr. 1), ale všechny si zaslouží uznání mužské poloviny české chemické komunity.

A rozhodně je namístě našim ženám poděkovat za obrovskou práci, kterou odvádějí a jistě i budou odvádět pro dobré jméno české chemie. A popřát jim k tomu co nejlepší podmínky a snažit se je i vytvářet.

Jiří Barek

LITERATURA

1. <https://www.un.org/en/observances/women-and-girls-in-science-day/>, staženo 3. 2. 2022.
2. <https://www.un.org/en/observances/womens-day/>, staženo 3. 2. 2022.
3. <https://www.laboratorioscienza.it/articoli/vita-da-scienziati-al-castello-san-michele/>, staženo 11. 2. 2022.

- Barek J.: Chem. Listy 116, 145 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220145>

SUB/SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRRAFIE PRO ANALÝZU CHIRÁLNÍCH SLOUČENIN

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

**KVĚTA KALÍKOVÁ, DENISA FOLPRECHTOVÁ
a ZUZANA KADLECOVÁ**

*Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 128 00 Praha 2
kalikova@natur.cuni.cz*

Došlo 30.12.21, přijato 10.1.22.

Klíčová slova: sub/superkritická fluidní chromatografie, enantiomer, chirální stacionární fáze, enantioselektivita, separace

● <https://doi.org/10.54779/chl20220146>

Obsah

1. Úvod
2. Sub/superkritická fluidní chromatografie
 - 2.1. Mobilní fáze pro separace chirálních sloučenin
 - 2.2. Chirální stacionární fáze
 - 2.3. Ovlivnění enantioselektivity kombinací chirálních selektorů
 - 2.4. Metody pro chirální screening
3. Závěr

1. Úvod

Chiralita je přirozenou vlastností živé hmoty, velká část přírodních sloučenin, včetně těch obsažených v živých organismech, je chirálních^{1–4}. Chirální sloučeniny se vyskytují ve formě enantiomerů. Pojmeme enantiomery se označují dvojice molekul, které jsou svými zrcadlovými obrazy^{5,6}. V chirálním prostředí mohou jednotlivé enantiomery dané sloučeniny vykazovat různé chemické nebo fyzikální vlastnosti v důsledku rozdílného prostorového uspořádání, a tím poskytovat odlišné stereoselektivní interakce⁷. Rozdílné účinky enantiomerů biologicky aktivních látek v živých organismech jsou obecně známé⁸. Velká pozornost je věnována zejména odlišnému chování enantiomerů léčiv, pesticidů, nových psychoaktivních sloučenin (NPS) a jejich metabolitů^{9–18}. V literatuře se uvádí, že v současné době je přibližně 60 % syntetických léčiv používaných v klinické praxi chirálních, přičemž 88 % z nich se používá ve formě racemátů¹⁹. V případě pesticidních přípravků je na trhu 43 % chirálních pesticidů, z toho 47 % se aplikuje jako racemát²⁰. Vzhledem k tomu, že se farmakologické a toxické účinky jednotlivých enantiomerů léčiv, NPS a jejich metabolitů mohou výrazně lišit, je nezbytné vyvíjet metody pro jejich separace, které umožní studium účinků jednotlivých forem a kontrolu enantiomerní čistoty^{16,18,21,22}. Rovněž toxicita, bioakumulace a rychlost degradace jednotlivých enantiomerů (např. používaných pesticidů) může být v životním prostředí odlišná^{23,24}.

Chromatografické metody, konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie s chirálními stacionárními fázemi, patří mezi nejčastěji používané metody pro separace



Doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D. absolvovala v roce 2005 magisterské studium oboru Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. V rámci diplomové práce, kterou vypracovala na katedře fyzikální a makromolekulární chemie pod vedením prof. Evy Tesařové se začala podrobně zabývat charakterizací enantioselektivních chromatografických systémů, konkrétně v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V roce 2009 dokončila doktorské studium v oboru fyzikální chemie na PřF UK, Praha. V rámci dizertační práce se, opět pod vedením prof. Evy Tesařové, zabývala podrobnou charakterizací chirálních i achirálních separačních systémů kapalinové chromatografie z teoretického i praktického hlediska. V roce 2014 získala cenu děkana pro mladého vědeckopedagogického pracovníka na PřF UK, Praha. V současné době působí jako docentka fyzikální chemie a vedoucí chromatografické skupiny na katedře fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK, Praha. Je školitelkou a konzultantkou bakalářských, diplomových a dizertačních prací s chromatografickou tematikou. Hlavní oblasti jejího vědeckého zájmu jsou nadále teoretické i aplikační aspekty chirálních i achirálních chromatografických sys-

témů v uspořádání kapalinové a sub/superkritické fluidní chromatografie. Je autorkou/spoluautorkou 70 publikací v mezinárodních impaktovaných odborných časopisech. Inspiraci pro další vědecké směřování získává aktivním odpočinkem se synem a partnerem v přírodě.

a stanovení enantiomerů, a to v analytickém, semipreparativním i preparativním měřítku, v akademickém prostředí i v průmyslu^{9,11}. Nicméně, z důvodu požadavků na vývoj rychlých, účinných a robustních metod s nižší ekologickou zátěží se v tomto směru dostává do popředí sub/superkritická fluidní chromatografie (SFC)^{25–27}.

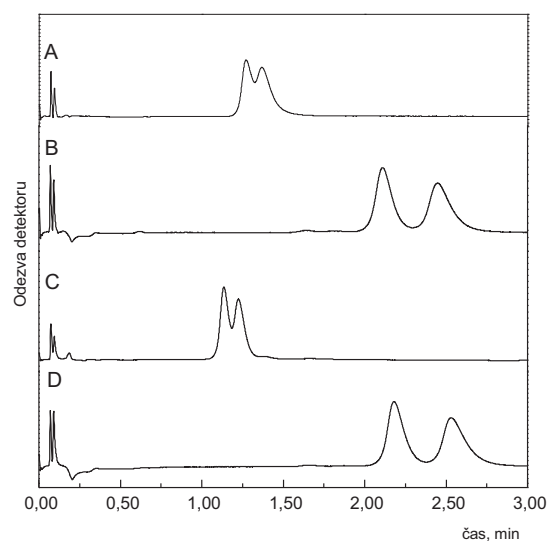
2. Sub/superkritická fluidní chromatografie

V klasické superkritické fluidní chromatografii byla jako mobilní fáze používána tekutina v superkritickém stavu, a to především fluorované uhlovodíky, amoniak a oxid uhličitý²⁸. Dnes se používá výhradně oxid uhličitý, neboť a) kritických hodnot teploty ($T_c=304,12$ K) a tlaku ($p_c=7,38$ MPa)²⁹ CO₂ lze s dnešní instrumentací snadno dosáhnout, b) je relativně levný (vedlejší produkt v mnoha průmyslových odvětvích) a je možné jej recyklovat – zejména při použití v preparativním měřítku, c) je nehořlavý, nekorozivní a vykazuje nízkou toxicitu, d) je mísitelný s řadou organických rozpouštědel^{30–32}. Zatímco v rané fázi vývoje této techniky se jako mobilní fáze používala převážně jedna čistá tekutina v superkritickém stavu, v moderní SFC se většinou používají mobilní fáze složené ze stlačeného oxidu uhličitého a organického modifikátoru, jako je methanol (MeOH), ethanol (EtOH), propan-2-ol (PropOH) apod. Takto tvořené mobilní fáze často nejsou superkritické tekutiny, přestože tlak může být nad kritickým tlakem, teplota je velmi často pod hodnotou kritické teploty³³. Organické modifikátory se do těchto mobilních fází přidávají za účelem zvýšení rozpouštěcí schopnosti mobilní fáze a změny polarit a tím zvýšení eluční síly mobilní fáze. Pokud hlavní složkou mobilní fáze zůstává stlačený oxid uhličitý, označuje se tato metoda jako sub/superkritická fluidní chromatografie^{34,35}. Aplikace subkritických mobilních fází nezpůsobuje žádné významné problémy během chromatografických analýz, protože výhody poskytované superkritickou mobilní fází zůstávají^{36,37}, tj. nižší viskozita a vysoká difuzivita mobilní fáze ve srovnání s viskozitou mobilních fází používaných v kapalinové chromatografii, a z toho plynoucí možnost použití vysokých průtoků mobilní fáze³². Toto uspořádání tudíž poskytuje rychlé a účinné separace.

2.1. Mobilní fáze pro separace chirálních sloučenin

Jak již bylo zmíněno výše, hlavní složkou mobilní fáze v SFC je stlačený oxid uhličitý. Za účelem zvýšení polarit a eluční síly se k oxidu uhličitému přidávají různé organické modifikátory. V SFC se množství organického modifikátoru v mobilní fázi pohybuje mezi 2 a 40 obj.%. Pro počáteční screening mobilních fází se velmi často používá gradientová eluce se zvyšujícím se množstvím organického modifikátoru, zatímco pro následnou optimalizaci a dosažení žádoucího rozlišení enantiomerů je preferována izokratická eluce²⁷. Alifatické alkoholy, jako je MeOH, EtOH a PropOH, patří mezi nejběžnější organické modifikátory v chirální SFC³⁸. MeOH je z těchto modifikátorů používán nejčastěji^{39–42}, protože vykazuje nejvyšší eluční

sílu, s čímž souvisí i vyšší účinnost daná počtem teoretických pater, a zároveň nízkou viskozitu^{43,44}. Také polarita MeOH je výhodou zejména pro analýzy polárnějších sloučenin, kdy MeOH zvyšuje jejich rozpustnost v mobilní fázi. Změna organického modifikátoru v mobilní fázi může vést až ke změně elučního pořadí jednotlivých enantiomerů. Tento jev byl popsán na polysacharidových chirálních stacionárních fázích^{45,46}. Acetonitril, jako aprotické rozpouštědlo, se používá v malém množství pro ovlivnění enantioselektivity, nejčastěji ve směsi s MeOH nebo také s PropOH (cit.^{47,48}). Skupina prof. Armstronga ukázala výhody použití azeotropní směsi EtOH a vody jako organického modifikátoru v porovnání s čistým MeOH a EtOH při použití polárních chirálních stacionárních fází (CSF)⁴⁹. Kromě CO₂ a polárních rozpouštědel se do mobilní fáze přidávají kyselá (např. mravenčí, octová nebo trifluoroctová (TFA) kyselina), bazická (např. triethylamin, diethylamin (DEA), isopropylamin, ethanolamin) nebo směsná (kombinace kyselých a bazických aditiv) aditiva. Tato aditiva ovlivňují nejen polaritu mobilní fáze, ale i disociaci či protonizaci ionizovatelných chirálních analytů a funkčních skupin CSF, a tím výrazně zlepšují separační účinnost, rozlišení enantiomerů a symetrii pík^{21,50}. Vliv typu aditiva a jeho množství v mobilní fázi na separaci enantiomerů β -blokátoru propranololu na NicoShell koloně je ukázán na obr. 1. Směsná aditiva se, v rámci úspory času, velmi často využívají pro screeningové účely^{22,44}. Další



Obr. 1. Znárodnění vlivu typu a množství aditiv v mobilní fázi na separaci enantiomerů propranololu. Chromatografické podmínky: kolona NicoShell s povrchově porézními částicemi (50×2,1 mm, velikost částic 2,7 μ m), mobilní fáze: A: CO₂/MeOH/TFA 90/10/0,1 (v/v/v), B: CO₂/MeOH/DEA 90/10/0,1 (v/v/v), C: CO₂/MeOH/TFA/DEA 90/10/0,05/0,05 (v/v/v/v), D: CO₂/MeOH/TFA/DEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v), průtoková rychlost 2 ml min⁻¹, teplota kolony 40 °C, regulátor zpětného tlaku 2000 psi, UV detekce 254 nm. Kalíková a spol. nepublikovaná data.

možností je využití vody jako aditiva, což se ukázalo výhodné zejména při separaci chirálních polárních analytů na hydrofilních CSF z hlediska zvýšení účinnosti a snížení doby analýzy^{51–53}.

2.2. Chirální stacionární fáze

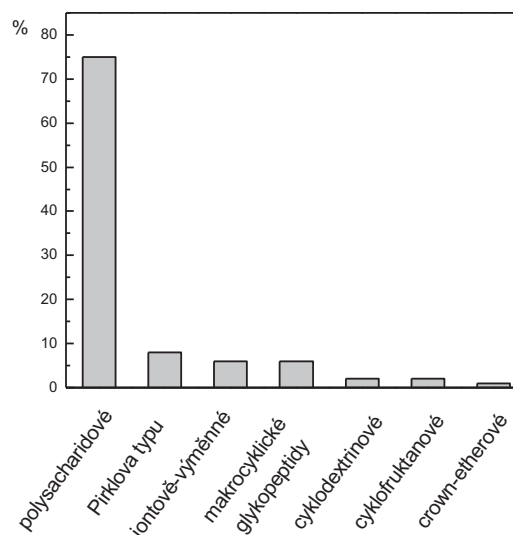
Výběr vhodné CSF je klíčovým parametrem pro úspěšnou separaci enantiomerů nejen v SFC. Většinu chirálních kolon vyvinutých pro kapalinovou chromatografii je možné použít i v SFC. V současné době jsou na trhu dostupné chirální kolony určené pro použití jak v obou chromatografických technikách, tak i přímo určené pro použití v SFC (cit.^{45,54}). Protože neexistuje žádný univerzální chirální selektor, který by byl schopen separovat enantiomery všech chirálních látek, vývoj nových CSF stále probíhá v akademické i komerční sféře. Chirální stacionární fáze na bázi derivatizovaných polysacharidů, konkrétně derivatizované celulosy a amylosy^{25,27,48,50,55}, patří mezi nejčastěji používané pro jejich enantioselektivitu pro široké spektrum strukturálně odlišných chirálních sloučenin⁵⁶. O vývoji, typech, vlastnostech a také mechanismu enantiodiskriminace těchto typů chirálních selektorů pojednává několik přehledových článků^{56–59}. Mezi další chirální fáze, které našly uplatnění v SFC, patří CSF Pirklova typu, iontově-výměnné zahrnující CSF na bázi chininu a dalších chinolinových alkaloidů^{60,61}, a CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů⁴², tj. vankomycinu, teikoplaninu, teikoplanin-aglykonu a derivatizovaného glykopeptidu (chirální kolona NicoShell). První SFC separace enantiomerů, konkrétně pěti chirálních fosfin oxidů, byla úspěšně provedena v roce 1985 na chirální stacionární fázi Pirklova typu^{27,37}. Zřídka používané jsou cykloextrinové, cyklofruktanové a crown-etherové CSF. Tento trend v posledních pěti letech je zdokumentován na obr. 2.

Narůstající požadavky na rutinní využití rychlých a účinných metod nejen pro separace chirálních sloučenin vedly k vývoji vysokotlakých chromatografických systémů a jejich následnému uvedení na trh⁶². S vývojem robustních přístrojů pro ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografii (UHPSFC) úzce souvisí i výzkum v oblasti vhodných CSF, pro zajištění co nejvyšší účinnosti a rychlosti analýz.

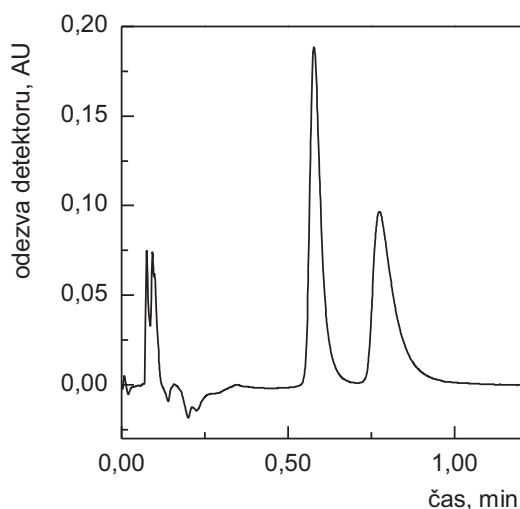
Jednou z možností je využití plně porézních částic o průměru menším než 2 μm (cit.⁶³). Zatímco achirální stacionární fáze s takovými částicemi byly dostupné před více než deseti lety a dnes jsou již dobře zavedené, v případě CSF je vývoj v tomto směru komplikovanější¹. Důležitým posunem v oblasti chirálních kolon byl vývoj (a následné uvedení na trh v roce 2014) CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů s částicemi o průměru 2,5 μm firmou Waters¹. Do té doby nebyly polysacharidové CSF s plně porézními částicemi menšími než 3 μm dostupné^{1,64}. Později byly uvedeny na trh polysacharidové CSF s částicemi o průměru 1,6 μm , jejichž použití v SFC bylo publikováno až v roce 2017 (cit.⁶⁵). Komerčně dostupnou CSF s částicemi o průměru 1,8 μm testovanou v SFC je také fáze Pirklova typu, konkrétně kolona WhelkOI (cit.⁶⁶).

Přestože existují komerční chirální kolony s plně porézními částicemi menšími než 2 μm a vnitřním průměrem 2,1 mm, jejich aktuální využití v SFC, resp. v UHPSFC je podstatně menší než v technice ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Na komerčně dostupných SFC přístrojích zatím není možné plně využít potenciál těchto vysoce účinných kolon s malým vnitřním rozměrem z důvodu významných mimokolonových příspěvků k rozšiřování piků, a tudíž nižší separační účinnosti^{53,65–67}. V literatuře jsou popsány různé laboratorní úpravy komerčních přístrojů (např. použití kratších a užších kapilár, menší celý detektoru apod.), které jsou lépe kompatibilní s částicemi pod 2 μm (cit.⁵³).

Dalším významným směrem v oblasti vývoje CSF je využití povrchově porézních částic (SPP – „superficially porous particles“, označované velmi často také jako „core-shell“ částice, tj. částice s pevným jádrem a pórovitou vnější vrstvou). Výhody těchto částic oproti plně porézním sorbentům jsou diskutovány v mnoha odborných publikacích, např. cit.^{42,68}. Avšak i v případě použití chirálních kolon s povrchově porézními částicemi s malými rozměry dochází k negativnímu vlivu mimokolonových příspěvků na tvar piků, jak již bylo popsáno u CSF s plně porézními částicemi menšími než 2 μm . V současné době jsou komerčně dostupné chirální kolony na bázi makrocyclických glykopeptidů, cyklofruktanu, cykloextrinu a chininu využívající SPP sorbenty o velikosti 2,7 μm . Příklad separace enantiomerů diuretika chlortalidonu během jedné minuty na teikoplaninové CSF s povrchově porézními částicemi o velikosti 2,7 μm (TeicoShell kolona) je ukázán na obr. 3.



Obr. 2. Procentuální zastoupení různých typů chirálních stacionárních fází v SFC v odborných člancích publikovaných v letech 2017–2021. Vyhledávání na Web of Science, v grafu je zahrnuto 189 aplikací zmiňovaných v 164 člancích.



Obr. 3. Chromatogram směsi enantiomerů chlortalidonu na teikoplaninové chirální stacionární fázi. Chromatografické podmínky: kolona TeicoShell s povrchově porézními částicemi (50×2,1 mm, velikost částic 2,7 μm), mobilní fáze: CO₂/MeOH/TFA/DEA 75/25/0,05/0,05 (v/v/v/v), průtoková rychlost 2 ml min⁻¹, teplota kolony 40 °C, regulátor zpětného tlaku 2000 psi, UV detekce 220 nm. Kalíková a spol. nepublikovaná data.

2.3. Ovlivnění enantioselektivity kombinací chirálních selektorů

Jak již bylo zmíněno výše, neexistuje žádný univerzální chirální selektor, který by vykazoval enantioselektivitu pro všechny chirální sloučeniny. Jednou z možností, jak rozšířit enantioselektivitu a ovlivnit separační potenciál v SFC, je sériové zapojení dvou, případně více chirálních kolon^{1,69,70}. Tento postup je možné využít při použití SFC mobilních fází, které vykazují nízkou viskozitu a nedochází tak k vysokému nárůstu tlaku v systému v porovnání s kapalinovou chromatografií⁷¹. V případě UHPLC není takové spojení kolon doporučeno z důvodu nutnosti výrazného snížení průtoku mobilní fáze, které vede ke snížení separační účinnosti a prodloužení doby analýzy. Vhodná kombinace různých typů CSF může zlepšit rozlišení jednotlivých enantiomerů, avšak sériově zapojené kolony musí být vzájemně komplementární, tzn. vykazovat odlišnou, ale komplementární (doplňkovou) enantioselektivitu. V případě, že daná CSF za daných chromatografických podmínek neposkytuje požadované rozlišení enantiomerů, použití komplementární CSF vede k požadovanému rozlišení enantiomerů za stejných chromatografických podmínek. Pokud tuto vlastnost nevykazují, může po zapojení takových kolon docházet k úplné ztrátě rozlišení enantiomerů⁷². Důležitým parametrem pro zvýšení enantioselektivity a rozlišení jednotlivých enantiomerů je také pořadí chirálních kolon zapojených v sérii⁷³. Při sériovém zapojení dvou chirálních kolon s různými chirálními selektory zaujímá hlavní roli pro separaci enantiomerů druhá kolona

zapojená v sérii⁶⁹. První kolona zapojená v sérii pracuje při vyšším tlaku, tedy vyšší hustotě mobilní fáze, a tím tato kolona vykazuje nižší příspěvek k celkové enantioselektivě systému. Využívá se tedy takové zapojení, kdy druhá kolona v sérii poskytuje za daných separačních podmínek vyšší rozlišení enantiomerů. Publikované práce zabývající se touto problematikou jsou zaměřené zejména na sériové zapojení různých CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů^{70–74}, u kterých je známá jejich komplementární enantioselektivita, ale uvedený přístup byl studován i naší skupinou pro CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů⁶⁹.

2.4. Metody pro chirální screening

Za účelem urychlení vývoje nové metody pro separaci chirálních biologicky aktivních látek a chirálních nečistot vzniklých během syntézy bylo navrženo několik postupů pro tzv. chirální screening⁷⁰. V praxi našly své uplatnění pouze některé z nich, což je dáno tím, že žádný z těchto postupů není univerzální. Enantioselektivita SFC separačního systému závisí na mnoha parametrech, tj. typu chirální stacionární fáze, složení mobilní fáze a hustotě mobilní fáze, která úzce souvisí s teplotou a tlakem²⁸. Klíčovými parametry pro separaci chirálních sloučenin jsou výběr vhodné CSF a mobilní fáze, a proto se jejich vhodná kombinace testuje jako první. Případná změna teploty a nastavení regulátoru zpětného tlaku se řeší až při doladění metody. Během chirálního screeningu se systematicky testuje sada stacionárních fází s různými chirálními selektory v několika mobilních fázích²⁸. Někteří autoři používají při vývoji těchto metod pouze CSF na bázi derivatizovaných polysacharidů, což je dáno možností výběru z velkého množství jejich derivátů, a tím zajištění enantioselektivity pro široké spektrum strukturálně odlišných chirálních sloučenin^{22,44,75}. V několika publikovaných postupech jsou zařazeny kromě CSF založených na derivatizovaných polysacharidech také CSF na bázi makrocyclických glykopeptidů a Pirklovy fáze^{76,77}. Navržené postupy pro chirální screening v posledních 20 letech jsou shrnuty a kriticky zhodnoceny v nedávno publikovaném přehledu⁷⁰.

3. Závěr

Sub/superkritická fluidní chromatografie je významným nástrojem pro analýzu chirálních sloučenin v mnoha odvětvích. Tato metoda se dostává do popředí v analýze chirálních sloučenin nejen z důvodu možnosti rychlých a účinných separací enantiomerů, ale také zařazením mezi ekologičtější analytické metody, protože hlavní složku mobilních fází tvoří oxid uhličitý. Při vývoji chirálních metod ve farmaceutickém průmyslu se SFC stává nejpoužívanější metodou, před kapalinovou chromatografií. Zajímavou možností pro rozšíření enantioselektivity a ovlivnění separačního potenciálu v SFC je sériové zapojení chirálních kolon s různými chirálními selektory, které vykazují komplementární enantioselektivitu. Přestože jsou k dispozici chirální kolony pro ultra rychlé analýzy s částí-

cemi menšími než 2 μm , nelze zatím na komerčních SFC přístrojích plně využít jejich potenciál z důvodu značných mimokolonových příspěvků k rozšiřování piků. Vhodným kompromisem, při současném využití výhod SFC pro rychlé a vysoce účinné separace chirálních analytů, je použití chirálních kolon vhodných rozměrů, ideálně s vnitřním průměrem 3 mm (pro analytické aplikace) naplněných plně porézními částicemi o velikosti 2,5 μm .

Tuto práci bychom rády věnovaly prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc., která nás zavedla do tajů chirální chromatografie.

Seznam zkratk

CSF	chirální stacionární fáze
DEA	diethylamin
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
NPS	nové psychoaktivní sloučeniny
PropOH	propan-2-ol
SFC	sub/superkritická fluidní chromatografie
SPP	povrchově porézní částice
TFA	trifluoroctová kyselina
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie

LITERATURA

- West C.: TrAC, Trends Anal. Chem. 120, 115648 (2019).
- Maier N. M., Franco P., Lindner W.: J. Chromatogr. A 906, 3, (2001).
- Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: Chem. Listy 102, 480 (2008).
- West C., Konjaria M.-L., Shashviashvili N., Lemasson E., Bonnet P., Kakava R., Volonterio A., Chankvetadze B.: J. Chromatogr. A 1499, 174 (2017).
- Yu R. B., Quirino J. P.: TrAC, Trends Anal. Chem. 118, 779 (2019).
- Červinka O.: Chem. Listy 93, 294 (1999).
- Šlechtová T., Kalíková K., Tesařová E.: Chem. Listy 107, 228 (2013).
- Holaň J., Štěpánek F., Ridvan L.: Chem. Listy 108, 46 (2014).
- Chankvetadze B.: TrAC, Trends Anal. Chem. 143, 116332 (2021).
- Švecová P., Petr J.: Talanta 198, 154 (2019).
- Grybinik S., Bosakova Z.: Monatsh. Chem. 152, 1033 (2021).
- García-Cansino L., García M. Á., Marina M. L.: Molecules 26, 5350 (2021).
- Gao Y., Zhao X., Sun X., Wang Z., Zhang J., Li L., Shi H., Wang M.: J. Agric. Food Chem. 69, 3289 (2021).
- Sanganyado E., Lu Z., Fu Q., Schlenk D., Gan J.: Water Res. 124, 527 (2017).
- Barhate C. L., Lopez D. A., Makarov A. A., Bu X., Morris W. J., Lekhal A., Hartman R., Armstrong D. W., Regalado E. L.: J. Chromatogr. A 1539, 87 (2018).
- Schmid M. G., Hägele J. S.: J. Chromatogr. A 1624, 461256 (2020).
- Folprechtová D., Kalíková K., Kadkhodaei K., Reiterer C., Armstrong D. W., Tesařová E., Schmid M. G.: J. Chromatogr. A 1637, 461846 (2021).
- Kolderová N., Jurásek B., Kuchař M., Lindner W., Kohout M.: J. Chromatogr. A 1625, 461286 (2020).
- Luo L., Wen X., Du Y., Jiang Z., Guo X.: Biomed. Chromatogr. 32, e4345 (2018).
- Jeschke P.: Pest. Manage. Sci. 74, 2389 (2018).
- Geryk R., Kalíková K., Schmid M. G., Tesařová E.: Anal. Chim. Acta 932, 98 (2016).
- Nováková L., Douša M.: Anal. Chim. Acta 950, 199 (2017).
- Jing X., Yao G., Liu D., Qu H., Zhou Q., Zhou Z., Wang P.: Ecol. Indic. 75, 126 (2017).
- Wang F., Yi X., Qu H., Chen L., Liu D., Wang P., Zhou Z.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 143, 186 (2017).
- Lemasson E., Bertin S., West C.: J. Sep. Sci. 39, 212 (2016).
- Khater S., Lozac'h M.-A., Adam I., Francotte E., West C.: J. Chromatogr. A 1467, 463 (2016).
- Desfontaine V., Guillarme D., Francotte E., Nováková L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 113, 56 (2015).
- Lesellier E., West C.: J. Chromatogr. A 1382, 2 (2015).
- Guiochon G., Tarafder A.: J. Chromatogr. A 1218, 1037 (2011).
- Kalíková K., Šlechtová T., Vozka J., Tesařová E.: Anal. Chim. Acta 821, 1 (2014).
- Nováková L., Perrenoud A. G.-G., Francois I., West C., Lesellier E., Guillarme D.: Anal. Chim. Acta 824, 18 (2014).
- West C.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 6441 (2018).
- Tarafder A.: TrAC, Trends Anal. Chem. 81, 3 (2016).
- Wolrab D., Frühauf P., Gerner C., Kohout M., Lindner W.: J. Chromatogr. A 1517, 165 (2017).
- Molineau J., Hideux M., West C.: J. Pharm. Biomed. Anal. 193, 113736 (2021).
- Maftouh M., Granier-Loyaux C., Chavana E., Marini J., Pradines A., Heyden Y. V., Picard C.: J. Chromatogr. A 1088, 67 (2005).
- Mourier P. A., Eliot E., Caude M. H., Rosset R. J.: Anal. Chem. 57, 2819 (1985).
- Vaňkátová P., Folprechtová D., Kalíková K., Kubíčková A., Armstrong D. W., Tesařová E.: J. Chromatogr. A 1622, 461138 (2020).
- Felix G., Berthod A., Piras P., Roussel C.: Sep. Purif. Rev. 37, 229 (2008).
- Khater S., West C.: J. Chromatogr. A 1373, 197 (2014).
- Patel D. C., Wahab M. F., Armstrong D. W., Breitbach Z. S.: J. Chromatogr. A 1467, 2 (2016).
- Folprechtová D., Kalíková K.: Anal. Sci. Adv. 2, 15 (2021).

43. Brunelli C., Zhao Y., Brown M.-H., Sandra P.: *J. Chromatogr. A* 1185, 263 (2008).
44. De Klerck K., Heyden Y. V., Mangelings D.: *J. Chromatogr. A* 1363, 311 (2014).
45. Vaňkátová P., Kubičková A., Cigl M., Kalíková K.: *J. Supercrit. Fluids* 146, 217 (2019).
46. Jakubec P., Douša M., Nováková L.: *J. Sep. Sci.* 43, 2675 (2020).
47. Folprechtová D., Kozlov O., Armstrong D. W., Schmid M. G., Kalíková K., Tesařová E.: *J. Chromatogr. A* 1612, 460687 (2020).
48. Harps L. C., Joseph J. F., Parr M. K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 162, 47 (2019).
49. Roy D., Wahab M. F., Talebi M., Armstrong D. W.: *Green Chem.* 22, 1249 (2020).
50. Felletti S., Ismail O. H., De Luca C., Costa V., Gasparrini F., Pasti L., Marchetti N., Cavazzini A., Catani M.: *Chromatographia* 82, 65 (2019).
51. Roy D., Wahab M. F., Berger T. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 91, 14672 (2019).
52. Khvalbota L., Roy D., Wahab M. F., Firooz S. K., Machyňáková A., Špánik I., Armstrong D. W.: *Anal. Chim. Acta* 1120, 75 (2020).
53. Broeckhoven K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 146, 116489 (2022).
54. Kozlov O., Kalíková K., Gondová T., Budovská M., Salayová A., Tesařová E.: *J. Chromatogr. A* 1596, 209 (2019).
55. Kučerová G., Kalíková K., Tesařová E.: *Chirality* 29, 239 (2017).
56. Scriba G. K. E.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 120, 115639 (2019).
57. Francotte E. R.: *Chim. Int. J. Chem.* 71, 430 (2017).
58. Padró J. M., Keunchkarin S.: *Microchem. J.* 140, 142 (2018).
59. Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 1269, 26 (2012).
60. Patel D. C., Breitbach Z. S., Yu J., Nguyen K. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chim. Acta* 963, 164 (2017).
61. Ilisz I., Bajtai A., Szatmári I., Fülöp F., Lindner W., Péter A.: *J. Chromatogr. A* 1615, 460771 (2020).
62. Borovcová L., Havlíček V., Lemr K.: *Chem. Listy* 113, 407 (2019).
63. Mazzocanti G., Manetto S., Ciogli A., Villani C., Gasparrini F.: *TrAC, Trends Anal. Chem.*, v tisku. doi: 10.1016/j.trac.2021.116511.
64. Kalíková K., Martínková M., Schmid M. G., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 41, 1471 (2018).
65. Berger T. A.: *J. Chromatogr. A* 1510, 82 (2017).
66. Ismail O. H., Losacco G. L., Mazzocanti G., Ciogli A., Villani C., Catani M., Pasti L., Anderson S., Cavazzini A., Gasparrini F.: *Anal. Chem.* 90, 10828 (2018).
67. Barhate C. L., Wahab M. F., Tognarelli D. J., Berger T. A., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 88, 8664 (2016).
68. Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H.: *J. Chromatogr. A* 1357, 36 (2014).
69. Folprechtová D., Tesařová E., Kalíková K.: *J. Sep. Sci.* 44, 4048 (2021).
70. Tarafder A., Miller L.: *J. Chromatogr. A* 1638, 461878 (2021).
71. La Z., Charton J., Etienne L., Bourey J., Lipka E.: *J. Chromatogr. A* 1651, 462270 (2021).
72. Akchich A., Charton J., Lipka E.: *J. Chromatogr. A* 1588, 115 (2019).
73. Wang C., Tymiak A. A., Zhang Y.: *Anal. Chem.* 86, 4033 (2014).
74. Welch C. J., Biba M., Gouker J. R., Kath G., Augustine P., Hosek P.: *Chirality* 19, 184 (2007).
75. Lin J., Tsang C., Lieu R., Zhang K.: *J. Chromatogr. A* 1624, 461244 (2020).
76. Barhate C. L., Joyce L. A., Makarov A. A., Zawatzky K., Bernardoni F., Schafer W. A., Armstrong D. W., Welch C. J., Regalado E. L.: *Chem. Commun.* 53, 509 (2017).
77. Michaels P., Neef J., Galyan K., Ginsburg-Moraff C., Zhou X., Dunstan D., Poirier J., Reilly J.: *Chirality* 31, 575 (2019).

K. Kalíková, D. Folprechtová, and Z. Kadlecová
(Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): Sub/supercritical Fluid Chromatography for Chiral Compounds Analysis

Chirality is an essential feature of nature as it is common for many biologically active compounds. The different biological effects of individual enantiomers in a chiral environment are generally known. Therefore, there is a need for fast, efficient, and robust methods for their separation, quantification, and purification, too. The easiest way is to use chromatographic methods utilizing chiral stationary phases. Sub/supercritical fluid chromatography has become popular in the field of enantioselective separations in various scopes and, in some cases, has become a method of the first choice.

Therefore, this review article covers actual trends and possibilities of sub/supercritical fluid chromatography in enantioseparations. Ways to influence enantioselectivity of the separation system by column coupling, screening approaches, and processes of methodical development for fast and efficient analyses are discussed.

Sub/supercritical fluid chromatography under suitable experimental conditions provides fast and highly efficient separation of chiral compounds.

Keywords: sub/supercritical fluid chromatography, enantiomer, chiral stationary phase, enantioselectivity, separation

- Kalíková K., Folprechtová D., Kadlecová Z.: *Chem. Listy* 116, 146–151 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220146>

OD 5-AZAPYRIMIDINOVÉ CHEMIE K THIADIAZOLŮM

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

MARCELA KREČMEROVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
marcela.krecmerova@uochb.cas.cz

Došlo 22.12.21, přijato 17.1.22.

Klíčová slova: 5-azacytidin, decitabin, acyklické nukleosidfosfonáty, antivirotika, thiadiazoly, katepsin K, kinasa glykogensyntasy 3 β , cystein-dependentní enzymy

• <https://doi.org/10.54779/chl20220152>

Obsah

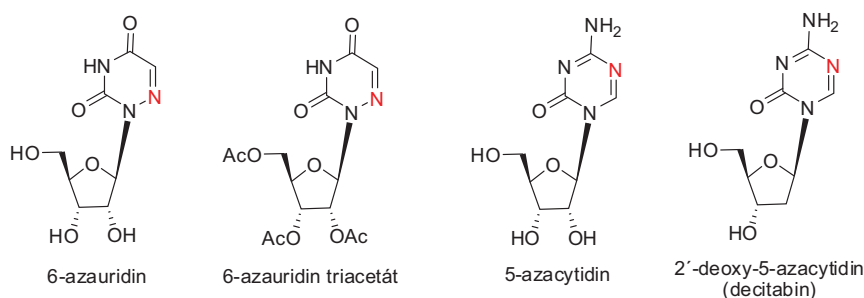
1. Úvod
2. Princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů
3. Současné trendy ve výzkumu 5-azacytosinových nukleosidů
4. 5-Azacytosinové acyklické nukleosidfosfonáty
5. Od 5-azacytosinu k thiadiazolům
6. Závěr

1. Úvod

Chemie strukturně modifikovaných nukleosidů je nedílnou součástí vědecké historie Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Její prvopočátky spadají do konce 50. a začátku 60. let minulého století, a to především díky iniciativě tehdejšího ředitele ÚOCHB Františka Šorma a jeho intuici rozpoznat v nukleosidových antimetabolitech jejich budoucí terapeutický potenciál. Dalším impulsem pak byl nárůst poptávky farmaceutického průmyslu po nových biologicky aktivních látkách, především protinádorových. K prvním výsledkům patří syntézy triazinových analogů pyrimidinových nukleosidů, jako byl např. 6-azauridin¹ (Riboazauracil, obr. 1), látka s cytostatickou aktivitou, která byla v Československu krátce vyvíjena firmou Spofa jako možný lék na leukémii (ale jejíž vývoj byl nakonec zastaven z důvodu nedostatečné účinnosti) nebo 6-azauridin triacetát^{2,3}, látka účinná k léčbě lupénky. Tato látka se v USA prodávala až do roku 1976 pod názvem Azaribine, posléze však byl její prodej zastaven díky vedlejším účinkům tromboembolického charakteru u velmi malé skupiny pacientů. Příprava pyrimidinových nukleosidů s 5-aza- a 6-azamodifikací se stala tématem pro tehdejšího aspiranta a později vědeckého pracovníka Aloise Pískalu. Jeho průlomovým objevem byly syntézy cytidinových analogů 5-azacytidinu (AC)⁴ a 2'-deoxy-5-azacytidinu (decitabinu, DAC)⁵ (obr. 1). Nové vzorky byly nejprve testovány na antibakteriální aktivitu; tu se skutečně podařilo prokázat u 5-azacytidinu. Mnohem důležitější však byl objev jeho cytostatických účinků, speciálně anti-



RNDr. Marcela Krečmerová, CSc. absolvovala v letech 1978–1982 Střední průmyslovou školu chemickou v Praze v Křemencově ulici a v letech 1982–1987 Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, obor organická chemie. Zde se v rámci diplomové práce specializovala na chemii cukrů v laboratoři prof. Miloslava Černého. V roce 1987 obhájila diplomovou práci zaměřenou na využití 1,6-anhydrohexos v syntéze nových nukleosidových analogů pod společným vedením prof. Černého a prof. Holého. Po obhajobě absolvovala roční postdoktorskou stáž na univerzitě v Osnabrücku, kde se pod vedením profesora Franka Seely věnovala přípravám 2'-deoxy- β -D-xylofuranosových nukleosidů a jejich využitím v oligonukleotidové syntéze. Od návratu do ČR až do současnosti pracuje jako vědecký pracovník v ÚOCHB, nejprve jako člen týmu nukleotidových analogů profesora Holého, v letech 2010–2015 vedla juniorskou vědeckou skupinu Nukleosidové a nukleotidové analogy pro biomedicínské aplikace. Jejím největším úspěchem byl vývoj nové třídy mimořádně účinných antivirotik proti DNA virům na bázi 5-azacytosinových acyklických nukleosidfosfonátů. V současné době pracuje v ÚOCHB jako člen týmu „Drug Discovery“ dr. Pavla Majera; hlavní oblastí jejího vědeckého zájmu jsou nukleosidy a nukleotidy, chemie organofosforečných sloučenin a vývoj prolékových forem biologicky aktivních látek nejrůznějších struktur za účelem zlepšení jejich farmakokinetických vlastností a umožnění jejich dalšího vývoje jako klinicky použitelných léčiv. Je autorkou 65 publikací v mezinárodních časopisech, dvou udělených patentů a několika podaných patentových přihlášek dosud nezveřejněných. Kromě značného pracovního nasazení úspěšně stihá i péči o rodinu včetně čtyřmohého mazlíčka Rockyho.



Obr. 1. Struktury biologicky aktivních 6-aza- a 5-azapyrimidinových nukleosidů

leukemických. Tím začalo období nejen intenzivních biochemických výzkumů, ale také velmi náročných optimalizací syntetických postupů z důvodu nestability triazinového kruhu.

Na obě molekuly byly ihned podány patentové přihlášky a patenty dokonce licencovaly velké farmaceutické firmy (Bayer a Upjohn, později Bristol-Myers). Komplikace nastaly poté, co byl objeven 5-azacytidin jako přírodní antibiotikum produkované bakterií *Streptovorticillium ladacanus*; jeho možnost patentové ochrany se tak zásadně ztížila (patentovat nelze přírodní látku, tam je možné patentovat pouze způsob syntézy).

Vzhledem ke komplikovanému způsobu přípravy byl prakticky veškerý materiál obou nukleosidů na preklinické a klinické testy (mnohačetgramové až kilogramové šarže) po dlouhá léta syntetizován v ÚOCHB vlastníma rukama Dr. Pískaly a jeho spolupracovníků. Bohužel jeho objevy byly učiněny v nepříteliš vhodné době, a přestože obě látky po 40 letech výzkumu nakonec dospěly až ke klinickému schválení, jejich autor ani ústav z nich neměl nikdy žádný zisk. Na tom se podepsaly jak nevýhodné smlouvy s firmami nebo jejich nedodržení, tak především neznalost patentového práva a všeobecně špatná patentová politika tehdejší Československé akademie věd, která nijak nepřispívala k praktickému využití objevů učiněných na ústavech, a ústavy samotné do licenčních jednání nemohly zasahovat. Pohnutá historie vývoje obou léčiv v podmínkách socialistického Československa byla nedávno podrobně vylíčena v časopise *Vesmír*⁶.

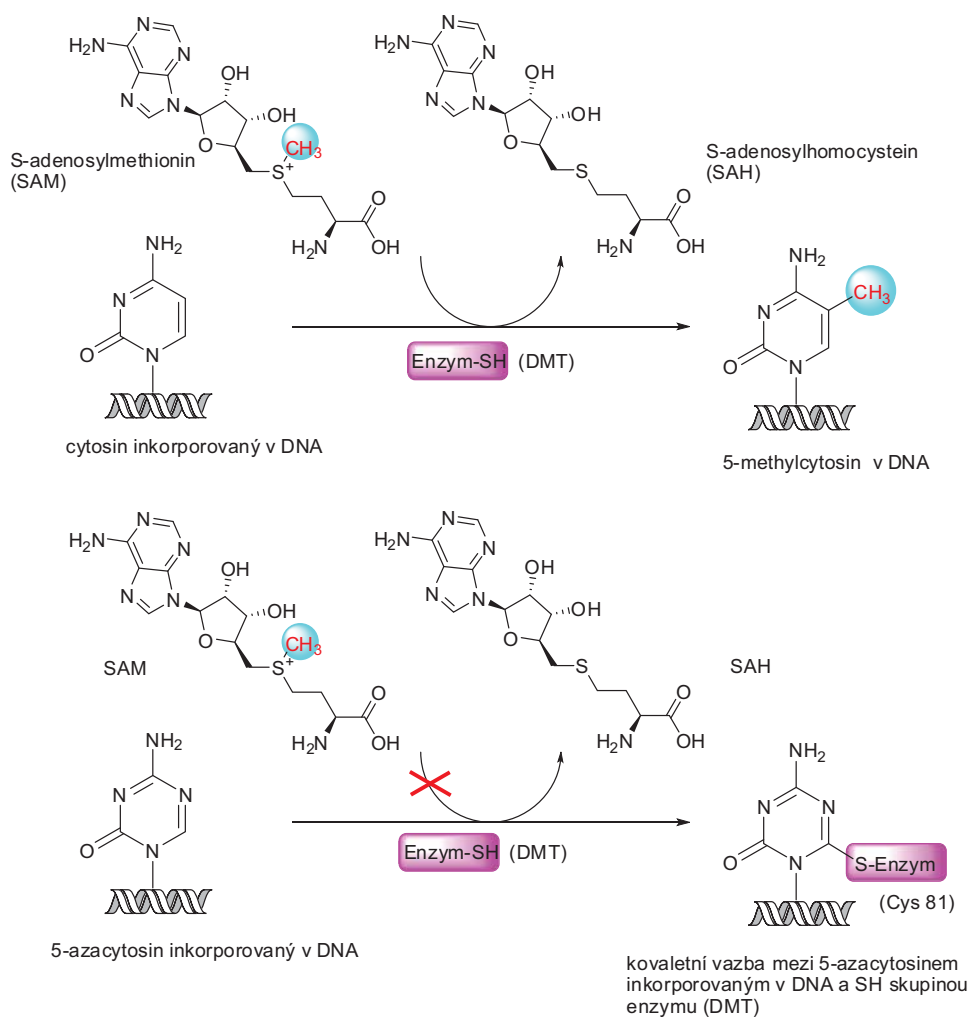
2. Princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů

5-Azacytidin a decitabin jsou v buňce fosforylovány buněčnými kinasami na příslušné 5'-nukleosidtrifosfáty a inkorporovány do nukleových kyselin: 5-azacytidin do různých typů RNA a v menší míře také do DNA (cit.⁷), decitabin pouze do DNA (cit.⁸). Výsledkem je narušení kopírování nukleových kyselin, nefunkční ribozomy a omezená tvorba proteinů. V tomto smyslu se obě látky chovají jako klasická cytostatika. V klinických zkouškách se však ukázala řada nežádoucích vedlejších účinků spojených s nutností podávat obě léčiva ve vysokých dávkách.

Kromě toho u azacytidinu (ale ne u decitabinu) se vývoj dále zkomplikoval objevením karcinogenity u některých druhů hlodavců; ta se však u lidí nikdy neprokázala^{9,10}. Průlom ve vývoji nastal poté, co profesor Peter Jones se svou doktorandkou Shirley Taylor z Univerzity Jižní Kalifornie (USC, Los Angeles) objevili zcela nový mechanismus účinku, který je při nízkých koncentracích odlišný od běžných cytostatik. 5-Azacytidin a decitabin totiž fungují na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací¹¹.

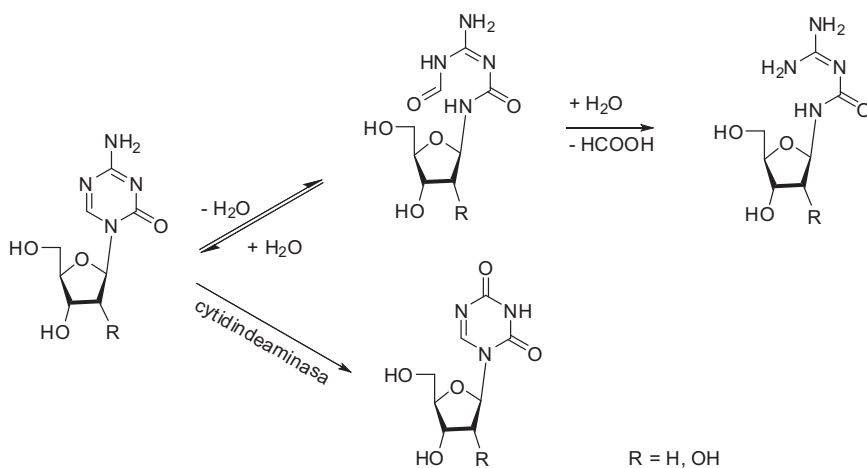
DNA je methylována enzymem DNA methyltransferasou v poloze 5 cytosinu; donorem methylu je *S*-adenosylmethionin. Inhibice těchto methylací spočívá v tom, že 5-azacytidin nebo decitabin inkorporované v DNA mají schopnost vytvořit kovalentní komplex protein-DNA díky interakci SH skupiny cysteinu v aktivním místě enzymu s 5,6-dvojnou vazbou azacytosinového kruhu (obr. 2). K DNA methylacím dochází téměř výhradně v oblasti zvýšeného výskytu CpG dinukleotidů, tzv. CpG ostrůvků, které jsou přítomny v promotorové oblasti přibližně 50 % genů. Právě abnormální hypermethylace promotorových regionů v CpG ostrůvcích byla u mnoha druhů malignit prokázána jako příčina utlumení funkce tumorsupresorových genů a rozvoje rakovinného bujení. Enzym DNA methyltransferasa a její inhibice se tak staly důležitým targetem ve vývoji nových antitumorových léčiv, která necílí na rakovinné buňky za účelem jejich zničení, jako je tomu u ostatních chemoterapeutik, ale místo toho umožňují zpětnou přeměnu maligní buněčné populace do stavu více méně normálních zdravých buněk¹². Po čtyřiceti letech od publikace prvních syntéz a mnoho let po expiraci původních patentů byly nakonec oba 5-azacytosinové nukleosidy schváleny FDA jako léčiva k terapii myelodysplastických syndromů pod názvy Vidaza[®] (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen[®] (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Dalšími indikacemi pro jejich aplikaci jsou akutní myeloidní leukémie (Vidaza[®], Dacogen[®]) a chronická myelomonocytová leukémie (Vidaza[®]).

Obě léčiva se aplikují ve formě infúzí, kdy infúzní roztok musí být připraven rozpuštěním pevné substance vždy bezprostředně před použitím. Důvodem je jejich chemická (hydrolytická) nestabilita, způsobená elektronovou deficiencí v poloze 6 triazinového kruhu, kdy snadno do-



Obr. 2. Methylace cytosinu v CpG ostrůvčích a její inhibice 5-azacytosinovými nukleosidy

jde k nukleofilnímu ataku, např. hydroxylovým iontem za současného otevření kruhu – nejprve na nestabilní formylkarbamoylguanidin, který pak následně odštěpí molekulu kyseliny mravenčí za vzniku příslušného karbamoylguanidinu (obr. 3). U decitabinu navíc kromě samotného štěpení kruhu dochází ještě k procesům anomerizace a byly pozorovány též rovnováhy mezi pyranosovou a furanosovou formou cukerné části¹³. Dalším významným prvkem nestability 5-azacytosinových léčiv je také enzymatická deaminace na 5-azauridin a 2'-deoxy-5-azauridin působením enzymu cytidindeaminasy. Díky enzymatické nestabilitě je počas rozpadu AC a DAC v lidské



Obr. 3. Chemická a enzymatická degradace 5-azacytosinových nukleosidů

plasmě cca 20 min, zatímco v *in vitro* podmínkách v různých pufrech jsou to řádově hodiny¹⁴.

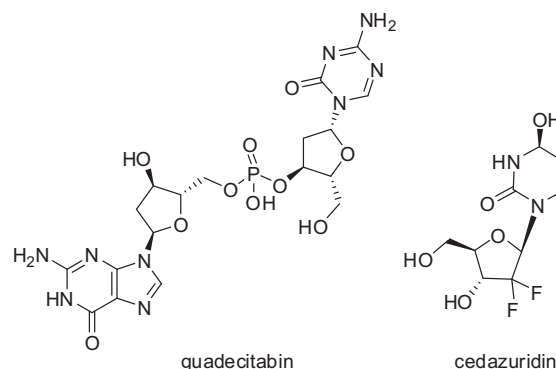
3. Současné trendy ve výzkumu 5-azacytosinových nukleosidů

Vzhledem k nestabilitě obou léčiv a s tím spojenými komplikacemi s aplikací pacientům a veškerou manipulací s nimi je hlavní snahou zvýšení jejich stability. Toho lze dosáhnout buď přípravou vhodných prolékových forem, které by uvolňovaly aktivní léčivo postupně a pokud možno až v místě působení, nebo omezením nežádoucí deaminace kombinací s inhibitory cytidindeaminasy. Vývojem stabilizovaných proléčiv decitabinu se v současné době intenzivně zabýváme i v našem týmu; připravené struktury a výsledky jsou však zatím předmětem patentové ochrany.

Nadějným klinickým kandidátem se jeví guadecitabin, dinukleotid decitabinu s 2'-deoxyguanosinem (obr. 4)¹⁵. Látka je rezistentní vůči cytidindeaminase a díky postupnému enzymatickému štěpení fosfodiesterové vazby je umožněno intracelulárně i extracelulárně postupně uvolňování decitabinu; výsledkem je tedy jeho prodloužené působení v organismu. Guadecitabin je v současné době ve fázi 3 klinických zkoušek zaměřených na myelodysplastický syndrom a akutní myeloidní leukémii. Kromě toho probíhají i klinické zkoušky jeho použití k léčbě pevných nádorů, většinou v kombinaci s imunoterapií¹⁶.

V oblasti syntézy inhibitorů cytidindeaminasy, které by mohly být aplikovány společně v kombinaci s 5-azacytidinem nebo decitabinem, je zatím nejúspěšnější látkou cedazuridin, 2',2'-difluor-3,4,5,6-tetrahydrouridin (obr. 4)¹⁷. Jeho kombinace s decitabinem již prošla všemi fázemi klinických zkoušek a v červenci 2020 byla schválena FDA k léčbě myelodysplastických syndromů¹⁸. Léčivo se prodává pod názvem Inqovi® a jeho největším benefitem je tabletová léková forma a tudíž orální aplikace.

Poznání principů methylace a demethylace DNA v procesech vypínání a zpětné reaktivace genů vedlo k myšlence, zda by takto mohly být ovlivňovány i jiné než tumorsupresorové geny, což by rozšířilo použití demethylačních léčiv do dalších oblastí medicíny. Nedávné výzkumy na Univerzitě Johnse Hopkinse v Baltimoru prokázaly úlohu DNA methyloci v procesu utlumení genů zapojených do fungování imunitního systému, konkrétně do funkce regulačních T-buněk. To otevírá cestu k terapii některých obtížně léčitelných nebo dosud neléčitelných akutních zánětlivých procesů, jako je např. syndrom akutní dechové tísně (ARDS, acute respiratory distress syndrome). V *in vivo* experimentech s decitabinem bylo prokázáno, že tento inhibitor DNA methyltransferasy posiluje funkci regulačních T-buněk a zvyšuje jejich počet, což vede následně až k regeneraci zánětem poškozené plicní tkáně¹⁹. Souvislost mezi DNA methyloci a progresí ARDS byla prokázána i studii na dalších pracovištích a terapeuticky podobně jako decitabin zde fungoval i 5-azacytidin^{20,21}. ARDS se nejčastěji vyskytuje buď jako následek aspirace žaludečního obsahu či těžkého traumatu, nebo je vyvolán plicní infekcí, např. koronavirem SARS-



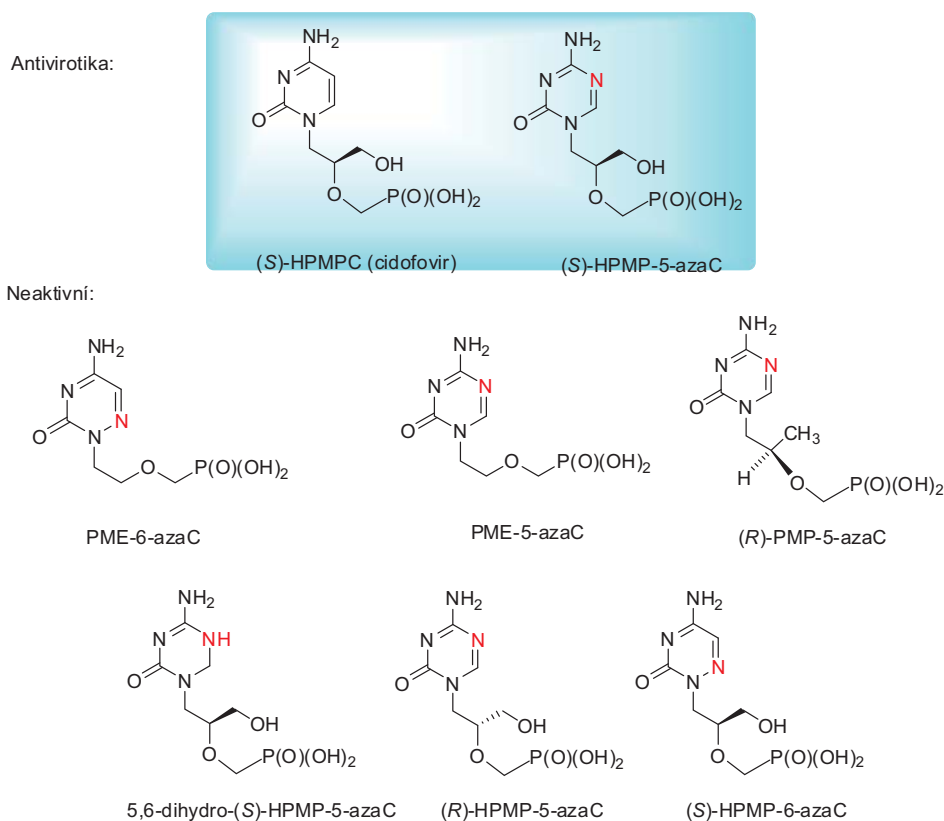
Obr. 4. Struktury guadecitabinu a cedazuridinu

CoV-2. Progrese choroby covid-19 do stadia ARDS patří k jejím nejtěžším komplikacím. V souvislosti s touto diagnózou probíhá v současné době klinický výzkum terapeutického využití demethylačních léčiv, konkrétně decitabinu²².

4. 5-Azacytosinové acyklické nukleosidfosfonáty

Nezbytnou podmínkou k tomu, aby se látka jako anti-metabolit mohla účastnit enzymových reakcí, je její fosforylace. Přímá aplikace fosfátů však není možná díky jejich nestabilitě. S řešením tohoto problému přišel v 80. letech 20. století Antonín Holý, když mezi molekulu nukleosidového analogu a fosfátovou skupinu vložil methylenový můstek. Tím byla započata etapa syntéz nové třídy nukleotidových analogů, tzv. acyklických nukleosidfosfonátů (ANP), látek s mimořádným spektrem biologických aktivit – převážně protivirových, ale také cytostatických, antiparazitálních nebo imunomodulačních. Některé z nich se již řadu let používají jako účinná virostatika: cidofovir (schválen k léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, ale off-label používán k léčbě mnoha dalších těžkých DNA virových infekcí), adefovir (k léčbě hepatitidy B) a především tenofovir, látka schválená k léčbě HIV a hepatitidy B. Právě tenofovir a jeho kombinované preparáty s dalšími anti-HIV látkami mají největší podíl na tom, že se původní smrtelná hrozba nemocí AIDS postupem let stala běžně řešitelným chronickým problémem, s kterým lze při dodržení léčby vést více méně normální život. Tématice ANP, jejich účinkům a budoucím perspektivám se věnuje celá řada přehledných článků, např.^{23–25}. Co se týče struktury alifatického řetězce těchto antivirálních ANP, jedná se o tři základní typy: HPMP deriváty, tj. (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]deriváty (např. HPMP, cidofovir), PME deriváty, tj. 2-(fosfonomethoxy)ethylderiváty (např. PME, adefovir) a PMP deriváty, tj. (R)-2-(fosfonomethoxy)propylderiváty (např. PMP, tenofovir) (obr. 5).

V průběhu více než tří dekad byly syntetizovány stovky nejrůznějších struktur ANP s modifikacemi jak v alifatické, tak v heterocyklické části. Jednou z takových modi-



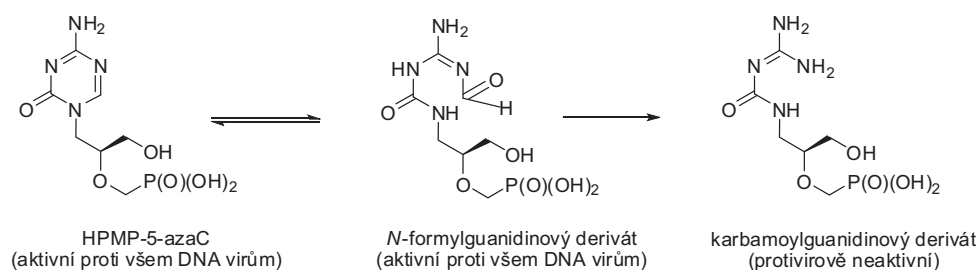
Obr. 5. Struktury antivirotik cidofoviru a jeho 5-azacytosinového analogu (S)-HPMP-5-azaC a dalších acyklických nukleosidfosfátů s 5-aza- a 6-azacytosinovou bází

fikací byly syntézy ANP s triazinovými bázemi, tj. 5-aza- a 6-azacytosinem. Zatímco u 6-azacytosinových derivátů biologická aktivita nebyla nalezena, u 5-azacytosinových derivátů bylo možno očekávat jak účinky demethylační, podobně jako u nukleosidů, tak protivirové, v analogii s ANP s cytosinovou bází. Demethylační účinky se nakonec neprokázaly, ale u 5-azacytosinového analogu cidofoviru, (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosinu (HPMP-5-azaC), byla pozorována velmi vysoká aktivita a selektivita vůči širokému spektru DNA virů, včetně různých typů herpesvirů (HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV a HHV-6), adenoviru (Ad2) a poxvirů (virus vakcinie). V porovnání s cidofovirem byla protivirová aktivita HPMP-5-azaC buď srovnatelná (HSV-1, HSV-2 a virus vakcinie), nebo až několikanásobně vyšší (VZV, HCMV, HHV-6 a Ad2). Vedle toho však HPMP-5-azaC vykazoval na buněčných kulturách výrazně nižší cytotoxicitu, takže jeho index selektivity (poměr CC_{50} k EC_{50}) byl vůči těmto virům ve výsledku 2–15krát vyšší než klinicky používaný cidofovir ((S)-HPMPC)^{26,27}.

Na rozdíl od cidofoviru má HPMP-5-azaC komplikovanější metabolický profil a podobně jako ostatní *N*-1 substituované 5-azacytosinové deriváty (ribosid, 2'-deoxyribosid, arabinosid) podléhá v alkalickém prostředí štěpení triazinového kruhu (obr. 6)²⁸. Prvním krokem je reverzibilní otevření kruhu na *N*-formylguanidinový derivát, který je

však ještě schopen zpětné cyklizace na původní formu. Tato hydrolytická reakce je pomalá a dosahuje rovnováhy v rámci několika dní. *N*-formylguanidinový derivát vykazoval aktivity proti DNA virům s hodnotami EC_{50} podobnými jako u původní sloučeniny, HPMP-5-azaC. Nicméně, reverzibilní otevření kruhu je doprovázeno následnou ireverzibilní deformylací intermediárního formylderivátu za vzniku 2-[[*(2S)*-3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-karbamoylguanidinu, který je konečným produktem tohoto hydrolytického rozkladu a je protivirově neaktivní^{26–28}.

Co se týče metabolického profilu, HPMP-5-azaC je v buňce fosforylován na monofosfát a difosfát, a to s 60krát vyšší rychlostí ve srovnání s cidofovirem, zatímco jeho senzitivita ke katabolické deaminaci je (oproti nukleosidům decitabinu a 5-azacytidinu) jen velmi nízká. HPMP-5-azaC difosfát se účinně inkorporuje do buněčné DNA, přičemž rychlost této inkorporace je 45krát vyšší oproti cidofoviru. Celkově lze konstatovat, že i přes nevýhodu chemické nestability triazinového kruhu má HPMP-5-azaC dostatečně přijatelný metabolický profil pro další preklinický, případně klinický vývoj²⁹. Vyšší protivirová účinnost spolu s rychlým rozkladem na netoxický karbamoylguanidinový derivát může dokonce představovat oproti cidofoviru i jistou výhodu z hlediska nižší nefrotoxicity (nefrotoxicita cidofoviru stále zůstává u řady indikací limitujícím faktorem).

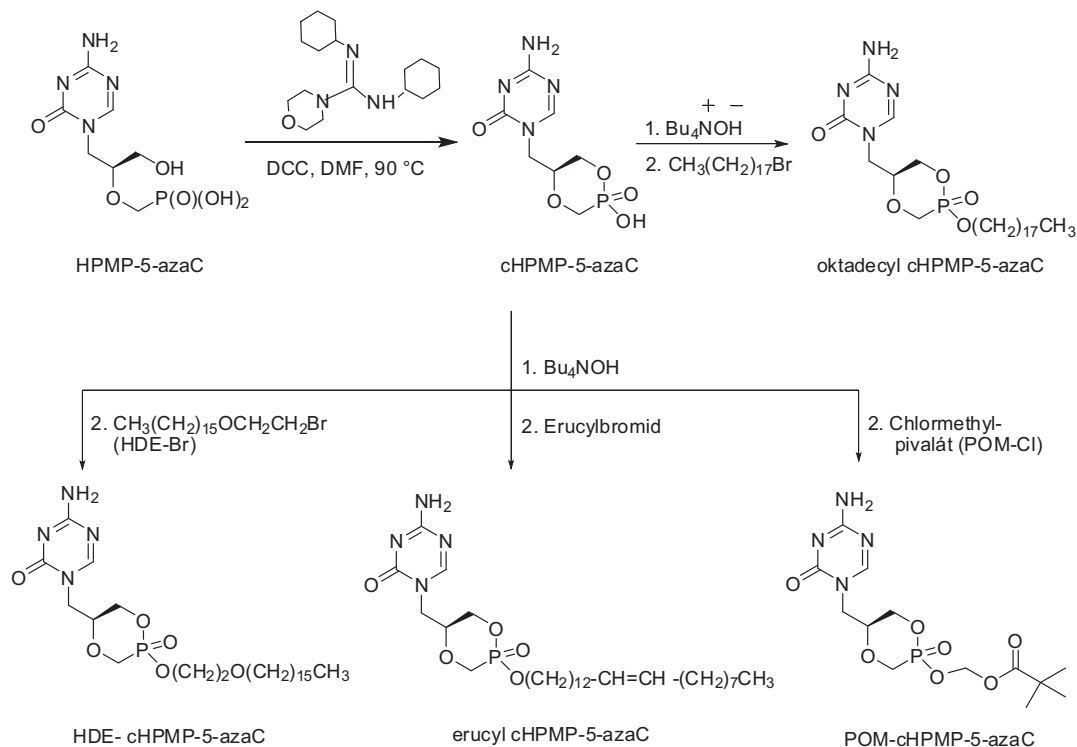


Obr. 6. Průběh hydrolytického rozkladu HPMP-5-azaC v alkalickém prostředí

HPMP-5-azaC, podobně jako ostatní acyklické nukleosidfosfonáty, je polární sloučenina s omezenou propustností do buňky a minimální orální biodostupností. To bylo důvodem k jeho transformaci na různé typy méně polárních proléčiv, konkrétně cyklického 1-(*S*)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosinu (cHPMP-5-azaC) a jeho esterů: hexadecyloxyethyl- (HDE), erucyl- pivaloyloxymethyl- (POM) a oktadecylesteru³⁰. Cyklizace HPMP-5-azaC reakcí s dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) v přítomnosti *N,N*-dicyklohexyl-4-morfolinokarboxamidinu a následná esterifikace příslušnými alkylhalogenidy je znázorněna na obr. 7.

Nejllepší terapeutický potenciál vykazoval HDE ester (*S*)-cHPMP-5-azaC se zcela mimořádnými hodnotami

aktivit proti veškerým DNA virům, avšak s minimální toxicitou (terapeutický index v hodnotách řádově od několika set až po několik desítek tisíc). Aktivita hodné dalšího výzkumu se týká především lidského cytomegaloviru (HCMV), poxvirů, papilomavirů (HPV), adenovirů a polyomavirů. U polyomavirových infekcí např. dosud neexistuje žádný FDA schválený léčebný preparát. HPMP-5-azaC a jeho profarmaka již prošly rozsáhlým výzkumem v *in vivo* podmínkách, a to s velmi pozitivními výsledky. K dalším fázím vývoje, především klinickým zkouškám, by bylo potřeba najít vhodného partnera z farmaceutického průmyslu, což se však dosud nepodařilo.

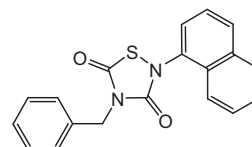


Obr. 7. Cyklizace HPMP-5-azaC a syntéza esterů cyklického HPMP-5-azaC jako proléčiv

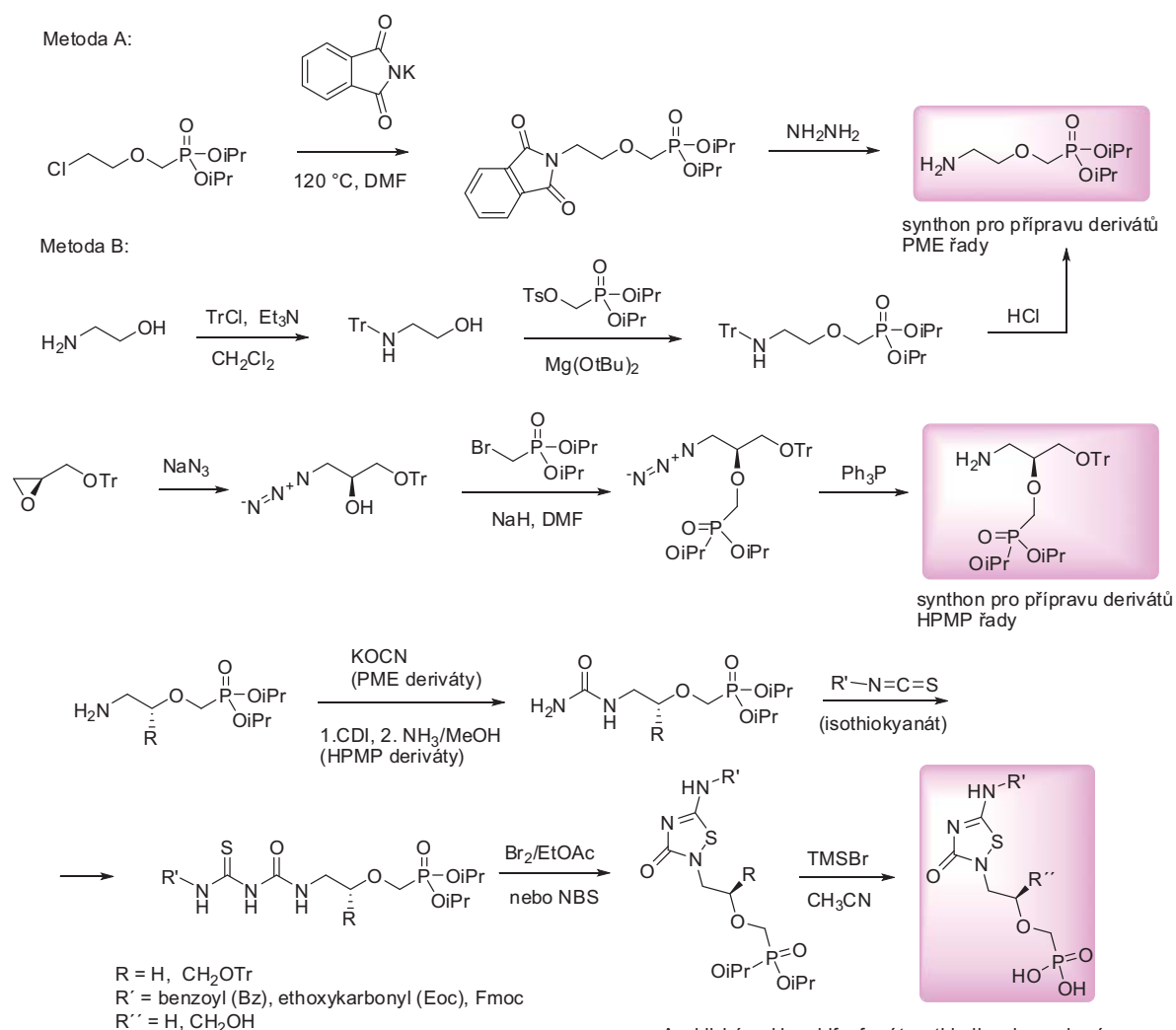
5. Od 5-azacytosinu k thiadiazolům

Jak již bylo vysvětleno, princip funkce 5-azacytosinových nukleosidů spočívá v interakci 5-azacytosinové báze s SH skupinou cysteinu v aktivním místě enzymu, v tomto konkrétním případě DNA methyltransferasy. Cystein dependentních enzymů obecně existuje celá řada a hrají významné role v řadě patogenních procesů. Jako příklad lze uvést proteasy typu katepsinů nebo kinasu glykogensynthasy 3 β (GSK-3 β), což je klíčový enzym metabolismu glykogenu^{31,32}. Cílená inhibice těchto enzymů může být terapeutickým řešením mnoha zdravotních problémů. Významnými inhibitory jsou thiadiazolové sloučeniny, především deriváty 1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dionu (TDZD), přičemž jako kandidát na léčivo byl identifikován 4-benzyl-2-(1-naftyl)-1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dion (tideglusib), který je inhibitorem enzymu GSK-3 β (obr. 8). Akumulace GSK-3 β v rakovinových buňkách aktivuje na-

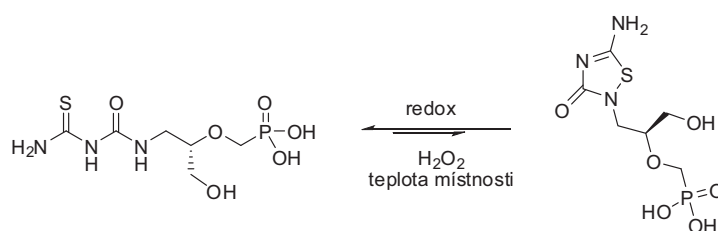
vázání transkripčního faktoru NF-kB na cílové genové promotory a stimuluje jejich další transkripční aktivitu, což vede k progresi rakovinného bujení a vytváření rezistence k chemoterapeutickým léčivům^{31,32}. Vzhledem ke schopnosti regulovat genovou expresi je pravděpodobné, že tideglusib může fungovat epigeneticky. Enzym GSK-3 β hraje také klíčovou roli v procesech spojených s Alzheimerovou chorobou a dalšími neurodegenerativními problémy. V současnosti probíhají klinické studie tideglusibu ve fázi II pro léčbu Alzheimerovy choroby³³ a myotonické



Obr. 8. Tideglusib – inhibitor kinasy glykogensynthasy 3 β



Obr. 9. Ukázka syntéz acyklických nukleosidfosfonátů s thiadiazolovou bází



Obr. 10. Rovnováha mezi lineární a cyklickou formou volných ANP s 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onovouází

muskulární dystrofie³⁴.

U cysteinových katepsinů a možnosti jejich inhibice thiadiazolovými deriváty jsme se v našem týmu zaměřili na katepsin K. Ten je exprimován převážně v osteoklastech a působí degradaci proteinových složek kostní hmoty včetně kolagenu, což hraje kritickou roli v procesu kostní resorpce a vzniku osteoporózy³⁵. Některé z inhibitorů CatK jsou již studovány v klinických zkouškách^{36,37}. Jejich interakce s cysteinovou SH skupinou v aktivním centru je zprostředkována přítomnou keto skupinou nebo nitrilem; inhibitory CatK na bázi 1,2,4-thiadiazolů byly poprvé popsány až v naší skupině³⁸.

Je evidentní, že 1,2,4-thiadiazolový skelet nese značný terapeutický potenciál a syntéza a screening nových struktur je nanejvýš žádoucí. V našem týmu nukleosidové chemie jsme se zaměřili na deriváty 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onu, což je struktura, na kterou lze pohlížet dle některých studií také jako na sírnou imitaci cytosinu, v níž je $-\text{CH}=\text{CH}-$ skupina mezi pozicemi 5 a 6 pyrimidinového kruhu nahrazena bivalentní sírou^{39,40}. 5-Amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-on je považován za bioisosterní s cytosinem vzhledem k podobným elektronickým a prostorovým vlastnostem $-\text{CH}=\text{CH}-$ skupiny cytosinu a bivalentní síry^{39,40}. Možnost této bioisosterie nás inspirovala k syntézám nukleotidových analogů, v nichž by byla cytosinová složka nahrazena 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onem. Jedná se o sloučeniny, v nichž by tato báze byla připojena např. k 2-(fosfonomethoxy)ethylóvému (PME) nebo 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propylóvému (HPMP) řetězci, analogicky jako je tomu u acyklických nukleosidfosfonátů (ANP). Přípravy takovýchto látek byly poměrně komplikované (některé „papírově“ naplánované deriváty se nepodařilo vůbec připravit); na druhou stranu přinesly do thiadiazolové chemie množství nových poznatků. Ukázkou takovýchto syntéz představuje obr. 9. V obou případech, jak u PME, tak u HPMP řady byl nejprve syntetizován acyklický synthon s fosfonátovou částí a koncovou aminoskupinou, na níž byl poté vystavěn thiadiazolový cyklus³⁸.

Překvapivě se ukázalo, že pouze N^5 -substituované 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onové analogy ANP jsou dostatečně stabilní a schopné izolace ve formě volných fosfonových kyselin; deriváty s volnou thiadiazolovouází mohly být izolovány pouze ve formě fosfonátových esterů. Pokusy o deprotektaci báze u volných fosfonátů skončily vždy otevřením thiadiazolového kruhu, přičemž zpětná oxidační cyklizace na thiadiazolový derivát už nebyla možná.

Redox charakter S-N vazby jsme studovali pomocí ³¹P NMR spektroskopie, kdy se ukázalo, že mezi lineární a cyklickou formou se vždy vytvoří rovnováha, kterou už nelze dále ovlivnit množstvím oxidačního činidla (obr. 10). Pokud je aminoskupina v poloze 5 1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onového kruhu chráněná, není zřejmě možná tautomerie S-N vazby a stabilita thiadiazolového kruhu je proto mnohem vyšší³⁸.

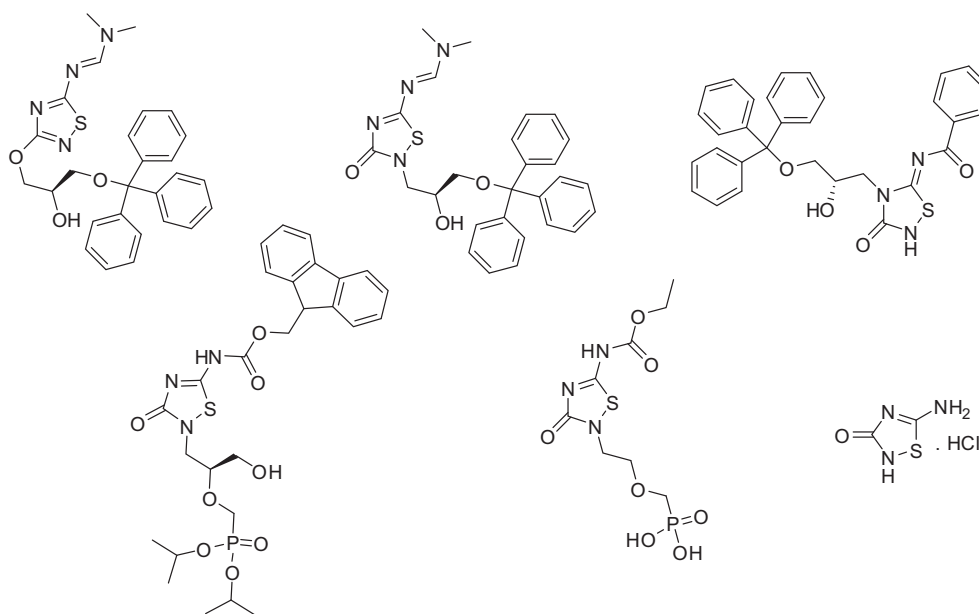
V připravené sérii 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-onových derivátů se podařilo identifikovat několik struktur s inhibiční aktivitou vůči lidskému CatK s hodnotami IC_{50} v nízkomikromolárním rozsahu³⁸. Mezi tyto aktivní látky patří: volná báze 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3(2H)-on, acyklické deriváty chráněné v poloze N^5 a nesoucí 2-hydroxy-3-trityloxypropylové uskupení a deriváty s HPMP a PME uspořádáním substituované v poloze N^5 (obr. 11). Ze strukturně aktivních studií je zřejmé, že ke zvýšení inhibiční aktivity přispívá esterifikace fosfonátové funkce (na rozdíl od volných fosfonových kyselin), absence polární OH skupiny v řetězci (PME deriváty jsou účinnější inhibitory než HPMP) a substituce N^5 polohy, nejlépe objemnou Fmoc skupinou.

Některé nově připravené thiadiazolové deriváty vykazovaly též inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β s hodnotami IC_{50} řádově podobnými tideglusibu, avšak s nižší cytotoxicitou včetně cytotoxicity vůči zdravým buňkám (studováno na lidských kožních fibroblastech). Ve většině případů se jedná o stejnou skupinu látek, která vykazovala i inhibiční aktivitu vůči CatK (obr. 12).

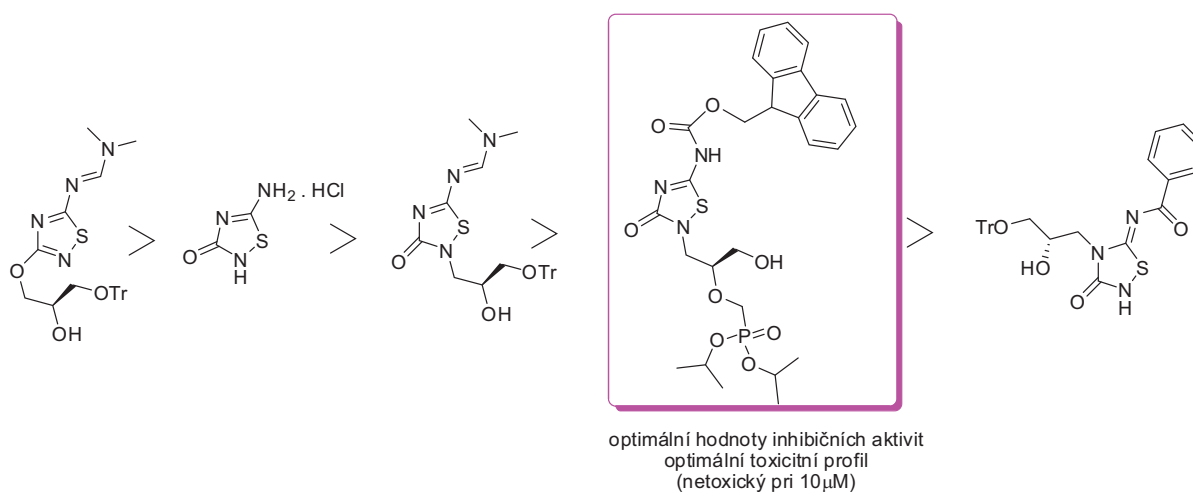
Žádný z připravených derivátů nevykazoval protivirovou aktivitu v analogii s acyklickými nukleosidfosfonáty ani inhibiční aktivitu vůči DNA methyltransferase v analogii s 5-azacytosinovými nukleosidy.

6. Závěr

Cílem této práce bylo vyzdvihnout význam 5-azacytosinových sloučenin v medicíně i klinické praxi a ukázat nové trendy v této oblasti, zejména co se týče stabilizovaných analogů 5-azacytidinu a decitabinu a vývoje 5-azacytosinových virostatik typu acyklických nukleosidfosfonátů. Pochopení mechanismu účinku látek na strukturní úrovni, v našem případě princip interakce cysteinové SH skupiny s nukleofilní složkou molekuly nukleosidového analogu (5-azacytosinu nebo thiadiazolové báze) je cestou k racionálnímu designu a cílené syntéze nových biologicky aktivních látek. Nově připravené thi-



Obr. 11. Struktury s inhibiční aktivitou vůči katepsinu K

Obr. 12. Struktury s inhibiční aktivitou vůči oběma enzymům, katepsinu K a GSK-3 β , seřazené podle hodnot inhibiční aktivity vůči katepsinu K

adiazolové acyklické analogy nukleosidů vykazují významné hodnoty inhibičních aktivit vůči dvěma studovaným cystein-dependentním enzymům katepsinu K a kinase glykogen synthasy 3 β .

Vypracováno s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu Český národní uzel Evropské infrastruktury pro translační medicínu EATRIS-CZ, grant č. LM2018133.

Seznam zkratk

AC	5-azacytidin (5-azacytidine)
ANP	acyklické nukleosidfosfonáty (acyclic nucleoside phosphonates)
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (acute respiratory distress syndrom)
CatK	katepsin K (Cathepsin K)
DAC	decitabin (decitabine)
DMT	DNA methyltransferasa (DNA methyl transferase)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

GSK-3 β	kinasa glykogensynthasy 3 β (glycogen synthase kinase 3 β),
HCMV	lidský cytomegalovirus (human cytomegalovirus)
HHV-6	lidský herpesvirus typu 6 (human herpes virus type 6)
HDE	2-(hexadecyloxy)ethyl
HPMP	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]
HPMP-5-azaC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosin (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-5-azacytosine
HPMPC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin (S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosine
HSV-1	herpes simplex virus typu 1 (herpes simplex virus type 1)
HSV-2	herpes simplex virus typu 2 (herpes simplex virus type 2)
PME	(fosfonomethoxy)ethyl (phosphonomethoxy)ethyl
PMP	(fosfonomethoxy)propyl (phosphonomethoxy)propyl
TDZD	1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dion (1,2,4-thiadiazolidin-3,5-dione)
VZV	Varicella zoster virus

LITERATURA

- Šorm F., Keilová H.: *Experientia* 14, 215 (1958).
- Šorm F., Škoda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun. Engl. Edn.* 21, 487 (1956).
- Deneau D. G., Farber E. M.: *Dermatologica* 151, 158 (1975).
- Pískala A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 29, 2060 (1964).
- Pliml J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 29, 2576 (1964).
- Vrtiška O.: *Vesmír* 97, 598 (2018).
- Veselý J., Čihák A.: *Pharm. Ther.* 2, 813 (1978).
- Veselý J., Čihák A.: *Cancer Res.* 37, 3684 (1977).
- Carr B. I., Reilly J. G., Smith S. S.: *Carcinogenesis* 5, 1583 (1984).
- Carr B. I., Rahbar S., Asmeron Y., Riggs A., Winberg C. D.: *Br. J. Cancer* 57, 395 (1988).
- Jones P. A., Taylor S. M.: *Nucleic Acids Res.* 9, 2933 (1981).
- Yang X., Lay F., Han H., Jones P. A.: *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 536 (2010).
- Krečmerová M., Otmar M.: *Future Med. Chem.* 4, 991 (2012).
- Mahfouz R. Z. a 15 spoluautorů: *Clin. Cancer Res.* 19, 938 (2013).
- Daher-Reyes G. S., Merchan B. M., Yee K. W. L.: *Expert Opin. Investig. Drugs* 28, 835 (2019).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=guadecitabine>, staženo 15. 12. 2021.
- Ferraris D. a 12 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 57, 2582 (2014).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=cedazuridine>, staženo 15. 12. 2021.
- Singer B. D. a 12 spoluautorů: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 641 (2015).
- Huang X. a 11 spoluautorů: *Biomed. Pharmacother.* 84, 447 (2016).
- Zhang S., Wu Z., Xie J., Yang Y., Wang L., Qiu H.: *J. Transl. Med.* 17, 345 (2019).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04482621>, staženo 15. 12. 2021.
- De Clercq E.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 99 (2011).
- De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 33, 1278 (2013).
- De Clercq E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 829 (2011).
- Krečmerová M., Holý A., Pískala A., Masojídková M., Andrei G., Naesens L., Neyts J., Balzarini J., De Clercq E., Snoeck R.: *J. Med. Chem.* 50, 1069 (2007).
- Krečmerová M., Otmar M.: *Future Med. Chem.* 4, 991 (2012).
- Dračinský M., Krečmerová M., Holý A.: *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6778 (2008).
- Naesens L., Andrei G., Votruba I., Krečmerová M., Holý A., Neyts J., DeClercq E., Snoeck R.: *Biochem. Pharmacol.* 76, 997 (2008).
- Krečmerová M., Holý A., Pohl R., Masojídková M., Andrei G., Naesens L., Neyts J., Balzarini J., De Clercq E., Snoeck R.: *J. Med. Chem.* 50, 5765 (2007).
- Walz A., Ugolkov A., Chandra S., Kozikowski A., Carneiro B. A., O'Halloran T. V., Giles F. J., Billadeau D. D., Mazar A.P.: *Clin. Cancer Res.* 23, 1891 (2017).
- Aguilar-Morante D., Morales-Garcia J. A., Sanz-SanCristobal M., Garcia-Cabezas M. A., Santos A., Perez-Castillo A.: *PLoS One* 5, e13879 (2010).
- Lovestone S. a 10 spoluautorů: *J. Alzheimers Dis.* 45, 75 (2015).
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03692312>, staženo 15. 12. 2021.
- Lu J., Wang M., Wang Z., Fu Z., Lu A., Zhang G.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33, 890 (2018).
- Drake M. T., Clarke B. L., Oursler M. J., Khosla S.: *Endocr. Rev.* 38, 325 (2017).
- Mukherje K., Chattopadhyay N.: *Biochem. Pharmacol.* 117, 10 (2016).
- Pomeislová A., Otmar M., Rubešová P., Benýšek J., Matoušová M., Mertlíková-Kaiserová H., Pohl R., Poštová Slavětínská L., Pomeisl K., Krečmerová M.: *Bioorg. Med. Chem.* 32, e115998 (2021).
- Párkányi C., Yuan H. L., Cho N. S., Jaw J.-H. J., Woodhouse T. E., Aung T. L.: *J. Heterocycl. Chem.* 26, 1331 (1989).
- Li Y., Geng J., Liu Y., Yu S., Zhao G.: *ChemMedChem* 8, 27 (2013).

M. Krečmerová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague*): **From 5-Azapyrimidine Chemistry to Thiadiazoles**

The review is devoted to 5-aza- and 6-azapyrimidine nucleosides with emphasis on antileukemic agents 5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine), mechanism of their action as inhibitors of DNA methylations in tumour suppressor genes and current trends in the search for their stabilized analogues. A significant contribution to 5-azacytosine chemistry is synthesis of 5-azacytosine acyclic nucleosides phosphonates and their prodrugs, identified as potent and selective anti-DNA viral agents. Application of 5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-(2H)-one moiety to acyclic nucleoside analogues was inspired by hypothesis that this heterocyclic base could work as a cytosine mimic and, moreover, the reactive N-S bond could be able to attack strong nucleophiles such as the cysteine thiol group of enzymes (similarly as 5-azacytosine). A series of prepared 1,2,4-thiadiazole derivatives provided several inhibitors of Cathepsin K and glycogen synthase kinase 3 β effective in the low micromolar range.

Keywords: 5-azacytidine, decitabine, acyclic nucleoside phosphonates, antivirals, thiadiazoles, cathepsin K, glycogen synthase kinase 3 β , cystein-dependent enzymes

- Krečmerová M.: Chem. Listy 116, 152–162 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220152>

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the program the Czech National Node to the European Infrastructure for Translational Medicine EATRIS-CZ, grant No. LM2018133.

NOVÁ ROLE HEMU VE ZDRAVÍ A NEMOCI – HEMOVÉ SENZOROVÉ PROTEINY

Tento článek je součástí seriálu *Ženy v české chemii*

MARKÉTA MARTÍNKOVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2
marketa.martinkova@natur.cuni.cz

Klíčová slova: hem, hemoproteiny, hemové sensorové proteiny, přenos signálu

• <https://doi.org/10.54779/chl20220163>

Došlo 31.12.21, přijato 5.2.22.

Obsah

1. Úvod
2. Hem
3. Hemoproteiny
4. Hemové sensorové proteiny, které detegují přítomnost signální molekuly hemu
5. Hemové sensorové proteiny, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem
6. Závěr

1. Úvod

Zapojení železa do životně důležitých procesů na Zemi bylo pravděpodobně ranou událostí evoluce¹. Zpo-

čátku byly ionty železa využity jako jednoduché a hojně zastoupené donory elektronů a poté se tento prvek rozšířil jako esenciální součást řady proteinů. S rostoucí koncentrací kyslíku a současným snížením dostupnosti vodorozpustných sloučenin železa² si organismy musely vyvinout mechanismy pro velmi efektivní aerobní respiraci, ale zároveň zavést účinné strategie pro získávání, přepravu a skladování iontů železa³. Problematická je hlavně biologická dostupnost železitých iontů. Dosažitelná koncentrace Fe^{2+} iontů je cca $10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ a Fe^{3+} $10^{-18} \text{ mol l}^{-1}$ při pH 7. Železité ionty mají ve vodném prostředí tendenci hydrolyzovat na hydroxid železitý a následně tvořit agregáty, čímž se ještě dále snižuje jejich dostupnost. Vzhledem k tomu, že za aerobních podmínek převládají Fe^{3+} ionty, je jejich špatná dostupnost často velkým problémem pro organismy závislé na tomto prvku. Dalším problémem spojeným s využitím iontů železa živými organismy je fakt, že tyto ionty mají tendenci zvyšovat oxidativní stres. Superoxidový anion radikál a peroxid vodíku jsou vedlejšími produkty normální aerobní respirace a jsou pouze mírně reaktivní ve vodných roztocích. Peroxid vodíku však v přítomnosti volných železnatých iontů vytváří vysoce škodlivé a reaktivní hydroxylové radikály tzv. Fentonovou reakcí. Hydroxylové radikály pak poškozují buněčné struktury, což může vést až k buněčné smrti⁴. V důsledku tohoto jevu si většina aerobních organismů vyvinula speciální proteiny k bezpečné přepravě iontů železa⁵ a také k účinné obraně před reaktivními formami kyslíku⁶.

Během evoluce se železo rozšířilo napříč všemi biologickými systémy. Mezi proteiny s obsahem tohoto prvku mají zvláštní postavení tzv. Fe-S proteiny (např. rubre-



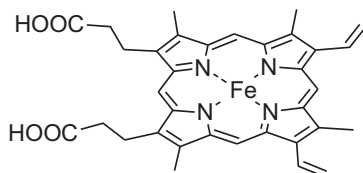
Doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D. se narodila v roce 1976 v Opavě. Vystudovala obor biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy (PřF UK); v roce 2003 zde obhájila disertační práci. Několik let (2004–2006) pak působila na Tohoku Univerzitě v japonském městě Sendai a s japonskými kolegy – a nejen s nimi – intenzivně stále spolupracuje v rámci mezinárodních projektů. Od roku 2020 například vede české zastoupení mezinárodního projektu s názvem „Prevence antibiotikové rezistence cílenou terapií pneumonií u dětí“ (TARGET). V současné době také vyučuje klinickou biochemii a biochemické aspekty biomedicíny na katedře biochemie, PřF UK. Garantuje bakalářský a navazující magisterský studijní program Biochemie a je členkou oborové rady doktorského studijního programu Biochemie PřF UK a doktorského studijního programu Biochemie a bioorganická chemie VŠCHT. Předmětem jejího vědeckého zájmu jsou především hemoproteiny a jejich vliv na zdraví a nemoci. Výzkum své vědecké skupiny specializuje na hemové sensorové proteiny, v nichž hem může působit jako vlastní signál anebo jako detekční místo pro molekuly plynů (například kyslík, oxid uhelnatý atd.). Je autorkou 48 publikací v mezinárodních vědeckých časopisech s více než 700 citacemi a h-indexem 13. Od roku 2013 byla studijní proděkanou PřF UK a od února 2022 zastává funkci studijní prorektorky Univerzity Karlovy. Kromě hemoproteinů a Univerzity Karlovy ji velkou radost dělají její dvě děti.

doxiny a feredoxiny) a hemoproteiny (např. hemoglobin a cytochromy), které tvoří samostatné vnitřně relativně jednotné skupiny. Další proteiny s obsahem železa nepatří do žádné z těchto skupin: jde o proteiny zajišťující jeho transport nebo ukládání (transferiny, feritin), ale i enzymy (např. některé dioxygenasy), nebo proteiny přenášející kyslík (hemerythrin)⁷. Tento přehledný referát se bude dále věnovat pouze hemoproteinům s tím, že v následující kapitole se nejprve zaměříme na výjimečné vlastnosti hemu a následně se soustředíme na novou, unikátní skupinu hemoproteinů s názvem hemové senzorní proteiny.

2. Hem

V hemu je atom železa koordinačně-kovalentně vázán ke čtyřem atomům dusíku tetrapyrrolového jádra, které je součástí struktury s názvem protoporfyrin IX (obr. 1). Porphyriny jsou obecně heterocyklické makrocyclické sloučeniny složené ze čtyř pyrrolových podjednotek propojených methinovými můstky a jednotlivé pyrrolové podjednotky nesou různé substituenty. Na osmi substituovatelných pozicích se vyskytují tři různé druhy substituentů, konkrétně dva vinylové zbytky, dvě propionové kyseliny a čtyři methylové skupiny (obr. 1). Porphyrin obsahuje 26 p-elektronů, z nichž 18 tvoří planární, kruhový konjugovaný systém⁸. V důsledku toho vykazují roztoky porfyrinů charakteristickou červenou barvu, protože silně absorbují záření ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra. Závěrečnou a klíčovou reakcí biosyntézy hemu je právě vestavba Fe²⁺ do struktury protoporfyrinu IX. Průběh je katalyzován ferrochelatásou (hemsynthasou), jejímž kofaktorem jsou Fe-S klastry⁹. Zdá se tedy, že Fe-S proteiny jsou evolučně starší formou inkorporace iontů železa do proteinů než hemoproteiny.

V hemoproteinech se nejčastěji vyskytuje hem typu *b* (obr. 1). V odborné literatuře se označením „hem“ nazývá většinou právě hem typu *b*, tj. komplex protoporfyrinu IX s atomem železa¹⁰. V daleko menší míře se v hemoproteinech mohou vyskytnout další typy hemů (např. hem *a* nebo hem *c*), které se zpravidla liší od hemu *b* v substituentech porfyrinového skeletu. Hem typu *a* obsahuje dlouhý hydrofobní izoprenoidní řetězec a formylovou skupinu místo jednoho z methylových substituentů. Vinylové skupiny hemu typu *c* tvoří kovalentní thioetherové vazby s cysteinovými zbytky proteinu¹⁰.



Obr. 1. **Struktura hemu.** Na obrázku je konkrétně znázorněna struktura hemu typu *b*

Pro funkci hemu je zásadní, že kromě vazeb vzniklých se čtyřmi atomy dusíku porfyrinu se centrální atom železa může vázat i na jeden nebo dva další ligandy, které nazýváme axiální ligandy. Typickými axiálními ligandy jsou některé aminokyselinové postranní řetězce daného hemoproteinu; často se jedná o histidin, cystein, dále pak například o methionin, asparagin, tyrosin a lysin. Kromě toho může být jedna z axiálních pozic hemu přechodně prázdná nebo obsazená malými ligandy (molekulou diatomových plynů – O₂, CO a NO a dále pak např. CN⁻, OH⁻ a H₂O)¹¹. V neposlední řadě modulují vlastnosti hemu také celé distální, resp. proximální oblasti hemoproteinů, které jsou vyplněné aminokyselinovými zbytky proteinu bez přímé interakce s hemem (na rozdíl od axiálních ligandů), nicméně vytvářející vhodné prostředí pro funkci daného systému (například síť vodíkových vazeb apod.).

Pět 3d orbitalů volného železa je energeticky rovnocenných a obsazují se podle Hundova pravidla maximální multiplicity spinu¹². Tato energetická degenerace ovšem mizí, pokud je železo umístěno v elektromagnetickém poli určité symetrie. Když je centrální železo hemu – v prvním přiblížení – umístěno v poli s oktaedrickou symetrií; jeho d orbitály se tedy podle teorie ligandového pole štěpí podle rozdílné symetrie do dvou skupin: dva orbitály e_g (d_{x²-y²} a d_{z²}) a tři orbitály t_{2g} (d_{xy}, d_{xz} a d_{yz}). V závislosti na intenzitě štěpení ligandovým polem se mění velikost energetického rozdílu mezi oběma skupinami orbitalů (spektrochemické štěpení ΔE) a to umožňuje spárování elektronů, přechod z tzv. vysokospinového stavu do nízkospinového¹². Dalším faktorem, který má vliv na elektronovou strukturu hemového komplexu, je interakce mezi centrálním atomem železa a p-orbitaly axiálních ligandů, tzv. zpětná donace, „p-backbonding“. Uplatňuje se zejména u šestých (druhých axiálních) ligandů, jakými jsou malé diatomové molekuly (NO, CO, O₂ a CN⁻) a umožňuje vysvětlit i funkci hemových enzymů (cytochromů P450 a peroxidas)^{13,14}. Různorodá povaha axiálních ligandů centrálního atomu železa hemu má zásadní vliv nejen na spinový stav, ale také na redoxní potenciál studovaných hemoproteinů¹⁵. Redoxní potenciál iontu železa v různých hemoproteinech se tak pohybuje od –460 mV až do 400 mV (cit.^{16,17}). Jedinečná koordinační chemie železa umožnila evoluci hemoproteinů takovým způsobem, že vlastnosti železa hemu mohou být modulovány selektivními změnami v sekvenci proteinového řetězce. Výměnou axiálních ligandů je tak dosaženo optimálního přízpůsobení k funkci daného hemoproteinu.

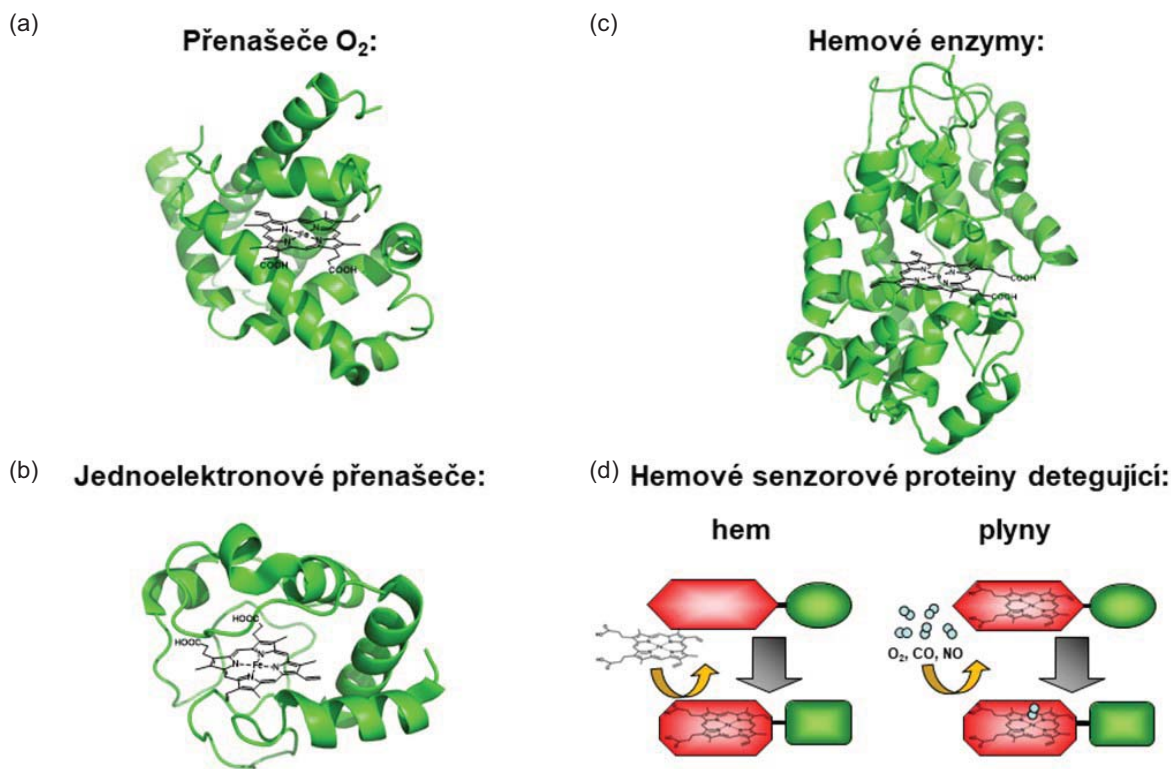
Volné molekuly hemu (někdy také nazývané labilní hem nebo ještě lépe směnitelný hem)¹⁸ jsou ve vodném roztoku prakticky nerozpustné a navíc jsou toxické¹⁹. Tato toxicita se projevuje tvorbou reaktivních forem kyslíku, analogicky jako je tomu v případě volného iontu železa (viz předchozí kapitola). Z obou těchto důvodů je koncentrace volného hemu v cytosolu buněk objektivně velmi nízká (v rozsahu cca 100 nmol l⁻¹)^{18,20,21}. Navíc se zdá, že v buňkách existují chaperony resp. transportní proteiny, které přenášejí hem z místa jeho syntézy do cílových hemoproteinů (např. glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa)^{22–25}.

3. Hemoproteiny

Rozlišujeme následující čtyři základní skupiny hemoproteinů (obr. 2): (a) hemoproteiny zapojené do transportu a uskladnění kyslíku (např. hemoglobin, myoglobin); (b) hemoproteiny zodpovědné za transport elektronů (např. cytochrom c); (c) hemové enzymy schopné katalyzovat oxygenační, hydroxylační a/nebo peroxidasové reakce (např. cytochrom P450, peroxidasy). Zástupci všech těchto tří prototypových skupin hemoproteinů obsahují molekulu hemu, který tvoří samotné katalytické nebo funkční centrum. Výše uvedené proteiny jsou obvykle složeny z jedné kompaktní struktury (jedné domény)²⁶ (obr. 2). (d) V poslední době byla překvapivě objevena ještě čtvrtá skupina proteinů, která byla nazvána jako hemové sensorové proteiny^{27–31}. Zatímco hemoproteiny zapojené do uskladnění a transportu kyslíku jsou studovány posledních 150 let, hemoproteiny transportující elektrony známe více než století a hemové enzymy skoro sedmdesát let, historie objevů spojených s hemovými senzory je velmi krátká. Tato čtvrtá skupina hemoproteinů byla objevena teprve před asi dvaceti lety a významně změnila pohled vědecké

komunity na hemoproteiny a jejich vlastnosti. Jedná se totiž o zcela novou roli hemoproteinů v živých organismech. Tento referát se dále zaměří pouze na tuto čtvrtou a nejméně prozkoumanou skupinu hemoproteinů.

Nedávné studie odhalily, že hem jako takový může kontrolovat mnoho různorodých procesů v řadě organismů včetně člověka. Role hemu v takové regulaci je zprostředkována právě zcela novou skupinou hemoproteinů. Obecně je známo, že hem může působit jako vlastní signál sensorových proteinů, které detegují koncentraci volného (labilního) hemu (viz poslední odstavec předchozí části). Tuto podskupinu hemových sensorů nazýváme hemové sensorové proteiny, které detegují hem³². Molekula hemu také může vytvářet vazebné místo pro detekci plynných molekul v případě druhé podskupiny hemových sensorových proteinů, které detegují signální plynné molekuly jejich interakcí s hemem^{33,34}. Konkrétně ligace a/nebo naopak disociace molekuly hemu na/z první podskupiny hemových sensorových proteinů reguluje různé pochody v buňce, jako je interakce s nukleovými kyselinami (např. transkripce, translace, vazba DNA, zpracování mikroRNA), činnost iontových kanálů nebo aktivita klíčových enzymů



Obr. 2. Schématické znázornění struktur čtyř základních skupin hemoproteinů. (a) Přenašeče kyslíku – jako příklad je uvedena struktura myoglobinu; (b) Přenašeče elektronů – jako příklad struktury proteinu z této skupiny je uvedena struktura cytochromu c; (c) Hemové enzymy s ilustrační ukázkou struktury peroxidasy; (d) Hemové sensorové proteiny, které buď detegují hem nebo detegují plyny. Struktury přirozených forem hemových sensorových proteinů s kompletním proteinovým řetězcem nejsou zpravidla k dispozici, proto jsou zde struktury naznačeny jen schématicky. Koncepčně jsou obě podskupiny hemových sensorových proteinů vždy složeny alespoň ze dvou domén: sensorové domény (deteguje hem nebo plynnou molekulu interakcí s hemem – zde označena červenou barvou) a funkční (označena zelenou barvou). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

(např. proteinkinasy) a degradace proteinů, v reakci na dostupnost hemu³². Alternativně v hemových sensorových proteinech, které detegují plyny, působí hem jako interakční místo pro vazbu plyných molekul, hlavně O₂, NO a CO, a nepřímo tak reguluje mnoho fyziologických funkcí, včetně aktivit proteinkinasy, guanylátcyklas, fosfodiesteras a transkripčních faktorů v reakci na dostupnost plynu^{33,34} (obr. 2, část d).

Molekula všech dosud známých zástupců z obou podskupin hemových sensorových proteinů je vždy složena alespoň ze dvou domén: sensorové domény (deteguje hem nebo plynou molekulu interakcí s hemem) a funkční domény^{32–34} (obr. 2, část d). Vztahy mezi strukturou a funkcí, mechanismy komunikace mezi těmito doménami a přenos signálu však dosud nebyly plně pochopeny. Obecně je důležité vysvětlit základní mechanismus detekce primárního signálu zaznamenaného sensorovou doménou, přenos signálu ze sensorové domény do domény funkční a následně pravděpodobně konformační změny funkční domény, které bezprostředně ovlivňují funkci daného proteinu. Je potřeba těmto mechanismům rozumět na molekulární úrovni, abychom byli později schopni ovlivnit procesy regulované těmito hemovými sensorovými proteiny a tím i všechny procesy kontrolované hemem. Je také nutné odhalit vliv jednotlivých konkrétních hemových sensorových proteinů na lidské zdraví a nemoci. Některé informace jsou již známy, ale jsou spíše neúplné a někdy až kontroverzní^{32,33}. Systematické sekvenování DNA odhalilo v genomech různých organismů (včetně savců) tisíce domén, potenciálně schopných interakce s hemem^{26,35}. Je tedy možno předpokládat, že mnoho klíčových procesů spojených s molekulou hemu, jak ve zdraví, tak v nemoci, bude teprve objeveno.

Hemové sensorové proteiny potřebují pružně reagovat v případě, že detegují signál (hem nebo plyn) a to je umožněno jejich velmi flexibilní strukturou, na rozdíl od struktury klasických hemoproteinů z prvních tří skupin (např. myoglobin), které jsou strukturálně relativně rigidní^{32,33,36} (obr. 2). Strukturu hemových sensorových proteinů a jejich velkou konformační změnu způsobenou vazbou signální molekuly (hemu nebo plynu) na sensorovou doménu a přenos tohoto prvotního signálu do změny struktury funkční domény však lze odvodit pouze z nepřímých experimentálních přístupů. V případě některých hemových sensorových proteinů jsou již známy struktury izolovaných sensorových a/nebo funkčních domén^{37–39}. Dosud nebyla popsána žádná trojrozměrná struktura kompletního (nezkráceného) hemového sensorového proteinu, který deteguje hem, na základě analýzy odpovídajících proteinových krystalů, zatímco byla publikována (zatím však pouze jediná) struktura kompletního hemového senzoru, který deteguje plyny – konkrétně transkripčního aktivátoru, který deteguje CO (CooA)⁴⁰. Obecně jsou experimenty s hemovými sensorovými proteiny s kompletním proteinovým řetězcem (tj. s jejich přirozenými variantami) velmi náročné^{36,38}. Důvodů je několik. Může to být způsobeno nestabilitou proteinů, které mají tendenci vytvářet nerozpustné agregáty^{41,42}. Hemové sensorové proteiny také často interagují s různými proteiny tepelného šoku⁴³ a/nebo

jsou směsí různých (auto)fosforylovaných variant⁴⁴. Proto je obtížné získat velká množství vysoce purifikovaných proteinů nezbytných pro spolehlivé strukturální studie. To vysvětluje, proč se většina dosavadních studií zaměřila na izolované sensorové domény a funkční domény a tyto části proteinů studuje odděleně. Takový přístup je však velmi riskantní a přináší potenciálně zavádějící interpretace výsledků. Například byla popsána nepřirozená koordinační struktura centrálního atomu železa hemu v izolované sensorové doméně kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α , která je regulována hemem (HRI, z angl. heme regulated inhibitor)⁴⁵. Žádná taková (arteficiální) koordinace nebyla pozorována u přirozeně se vyskytujícího proteinu HRI, který obsahuje sensorovou i funkční doménu^{36,41}. Podrobně o tomto konkrétním hemovém sensorovém proteinu pojednává následující kapitola.

Obecně je ještě potřeba zdůraznit, že dělicí čára mezi oběma podskupinami hemových sensorových proteinů, tedy těmi, které detegují hem a těmi, které detegují signální molekuly plynů prostřednictvím hemu, není tak ostrá, jak by se na první pohled mohlo jevit^{32,33}. Některé hemové sensorové proteiny, které detegují hem, mohou být ještě dále regulovány molekulou plynu^{36,46,47}. Interakce molekuly plynu s hemem v sensorové doméně je tedy společná jak pro některé senzory hemu, tak pro všechny hemové sensorové proteiny, které detegují plyny.

4. Hemové sensorové proteiny, které detegují přítomnost signální molekuly hemu

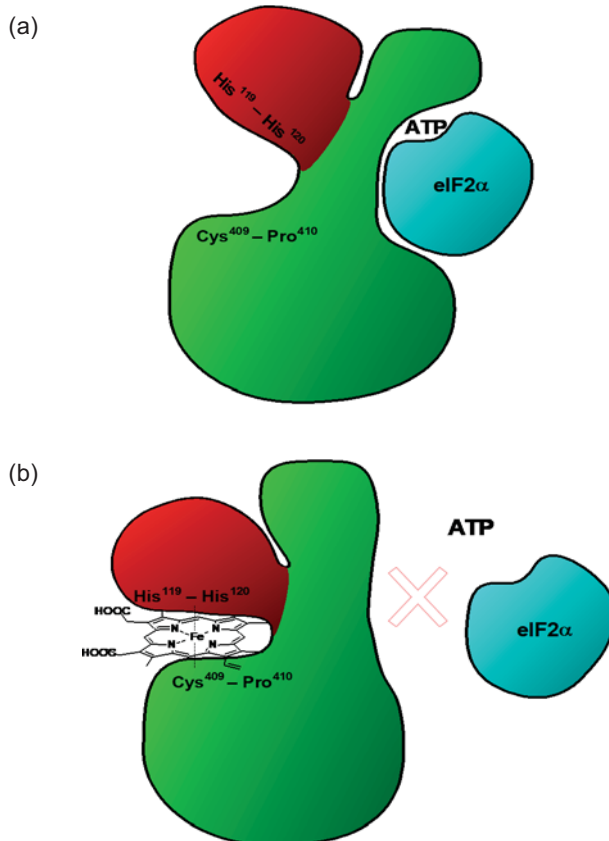
V současné chvíli je popsáno několik desítek zástupců hemových sensorových proteinů, které detegují přítomnost signální molekuly hemu. Jednotliví zástupci, jejich struktury a mechanismy detekce molekuly hemu (pokud jsou vůbec známy) jsou přehledně shrnuty a diskutovány v naší aktuální publikaci³²; naše výzkumná skupina se dlouhodobě věnuje výzkumu mechanismu působení několika zástupců těchto sensorů. Na příkladu jednoho z nich, konkrétně HRI, lze ukázat typické vlastnosti této podskupiny hemových sensorových proteinů.

HRI se jeví být jedním z nejdůležitějších hemových sensorových proteinů pro přežití eukaryot v reakci na stresové stavy buněk, které bezprostředně souvisí s lidským zdravím. Tento systém je důležitý pro regulaci eukaryotické proteosyntézy. Eukaryotické buňky snižují svou celkovou rychlost syntézy proteinů za účelem přežití v reakci na takové stresové podmínky, jako je nedostatek aminokyselin, osvětlení UV světlem, virová infekce, akumulace denaturovaných proteinů, a právě nedostatek hemu. Pokles (inhibice) syntézy proteinů je způsoben fosforylací eukaryotického iniciačního faktoru 2 α (eIF2 α) na serinu v pozici 51 (cit.⁴⁸) kinasami eIF2 α , které specificky reagují na jeden z výše uvedených stresových podnětů⁴⁹. Funkční doména HRI tedy analogicky jako další známé „stresové“ kinasy vykazuje kinasovou aktivitu vůči svému substrátu – eIF2 α , v našem případě v závislosti na dostupnosti hemu. Enzym je aktivní v nepřítomnosti hemu. Vazba hemu na protein HRI indukuje globální strukturální (konformační)

změnu, ta vede ke katalytické inhibici, která je indukovaná hemem^{36,41,46,50}.

Úloha HRI byla nejprve odhalena v retikulocytech, kde tento protein řídí syntézu globinu v reakci na koncentraci hemu s cílem vyrovnávat molární poměr hemu a globinu³⁰. Nedostatek hemu způsobí prostřednictvím HRI inhibici proteosyntézy nových globinových molekul, které by se jinak akumulovaly, precipitovaly a postupně zničily daný retikulocyt³⁰. Kromě proteosyntézy globinu v retikulocytech řídí HRI syntézu tryptofan-2,3-dioxygenasy a cytochromu P4502B v játrech při akutní porfyrii^{51,52}. Navíc se ukazuje, že také úloha HRI v neerytroidních buňkách je pro přežití organismu zcela zásadní. Systematické sekvenování genomů maligně transformovaných (nádorových) buněk poukázalo na geny, jejichž časté mutace bezprostředně souvisí s rozvojem nádorového onemocnění (rakoviny)⁵³. Bylo zjištěno, že u lidských pacientů s rakovinou plic je glycin v pozici 202 v HRI zpravidla mutován na serin⁵³. Tato mutace se tedy může podílet na rozvoji rakoviny. Abychom ale plně pochopili roli HRI ve zdraví a nemoci, je nejprve důležité porozumět mechanismu působení tohoto senzoru.

Na základě výsledků našich studií funkce a mechanismu působení HRI byly navrženy následující tři závěry. Za prvé, molekula HRI interaguje pouze s jednou molekulou hemu a to tak, že jeden axiální ligand centrálního atomu železa hemu tvoří histidinový zbytek umístěný v senzoro-ové doméně a druhým ligandem je pak thiolátová síra cysteinu lokalizovaného ve funkční doméně^{36,41,50} (obr. 3). Pro hemové senzoro-ové proteiny je obecně hem-thiolátová koordinace velmi častá, a navíc bývá vedle axiálního cysteinu lokalizován prolin, stejně jako v HRI. Tento tzv. CP motiv tvoří typické detekční místo hemových senzorů³². Význam prolinu vedle cysteinu spočívá pravděpodobně v jeho sterické regulaci proteinové struktury v těsném sousedství detekčního místa pro hem a tím je modulována interakce hemu s cysteinem. Afinita HRI k hemu odpovídá koncentraci volného hemu v retikulocytech a je poměrně nízká, K_d je 10^{-5} mol l^{-1} (cit.⁴¹). Je potřeba, aby HRI zaznamenala přítomnost hemu až při významném nárůstu jeho koncentrace nad rámec přirozené nízké hladiny volného hemu. Obecně se afinita různých hemových senzoro-ových proteinů k hemu výrazně liší³². Za druhé, katalýza HRI je silně potlačena nejen hemem ($IC_{50} = 9,5$ μ mol l^{-1}), ale ještě více Hg^{2+} ($IC_{50} = 0,6$ μ mol l^{-1}) a tato suprese je odstraněna NO, což podporuje hypotézu, že thiolát cysteinu se účastní katalytické regulace⁴⁶. Již výše bylo zmíněno, že dělící čára mezi hemovými senzoro-ovými proteiny, které detegují hem a těmi, které detegují molekuly plynu, není ostrá. A je to případ i HRI. Primárně je tento senzor regulován koncentrací hemu, ale dále může být inhibiční vliv hemu (nebo jiného inhibitoru) zvrácen signální molekulou plynu (v tomto případě NO)⁴⁶. Za třetí, interakce mezi senzoro-ovou a funkční doménou zprostředkovaná signální molekulou hemu způsobuje globální strukturální změny (obr. 3), které hrají klíčovou roli v mechanismu působení a funkci HRI^{36,41,50}. Jak již bylo zmíněno výše, strukturální flexibilita je společným znakem všech hemových senzoro-



Obr. 3. Schématické znázornění mechanismu detekce a přenosu signálu v případě HRI. Pokud HRI nedeteguje přítomnost molekuly hemu (a), je enzymová aktivita funkční domény zachována a dochází k fosforylaci substrátu tj. eukaryotického iniciačního faktoru 2α . V případě, že se zvýší koncentrace hemu v prostředí, je toto detegováno HRI (b) a její enzymová aktivita vůči eukaryotickému iniciačnímu faktoru 2α je zastavena. HRI – kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2α , která je regulována hemem; eIF 2α – eukaryotický iniciační faktor 2α . (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

vých proteinů a je pro funkci těchto proteinů důležitá, ale zároveň značně komplikuje studium těchto systémů³².

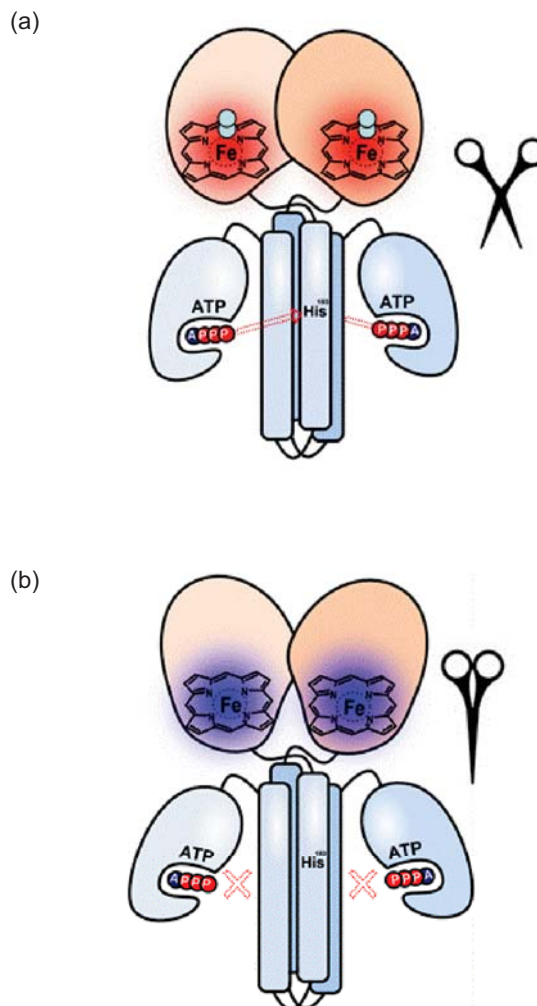
5. Hemové senzoro-ové proteiny, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem

Podskupina hemových senzoro-ových proteinů, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem je již poměrně bohatě zastoupena několika desítkami členů. Převážně, ale ne výlučně, se jedná o proteiny bakteriální, které pomáhají jednobuněčným organismům reagovat na měnící se atmosféru, detegovat její složení s cílem přizpůsobit svůj metabolismus okolním podmínkám. Tuto problematiku jsme nedávno shrnuli ve dvou přehledných

referátech, na něž čtenáře s hlubším zájmem o hemové sensorové proteiny, které detegují plyny, odkazujeme^{33,34}. Během posledních osmi let jsme charakterizovali a vysvětlili vztahy mezi strukturou a funkcí a zaměřili se na přenos signálu v případě tří základních modelových prokaryotických hemových sensorových proteinů, které detegují plyny. Jedná se o přímý kyslíkový senzor z *Escherichia coli*, který vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu (EcDOS)^{54–56}, diguanylátcyklastu s globinovou strukturou sensorové domény z *Escherichia coli* (YddV)^{42,55,57–59} a histidinkinasu s globinovou strukturou sensorové domény z půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. kmen Fw109-5 (AfGcHK)^{38,39,60–63}. Ve všech třech případech se jedná o hemové senzory kyslíku³⁴. Bakteriální hemové senzory se mnohem snadněji studují, protože se s nimi daleko efektivněji experimentuje – jsou výrazně stabilnější, lépe a ve větším množství se produkují a během jejich izolace dosahujeme výrazně vyšší čistoty než v případě eukaryotických hemových sensorových proteinů, které detegují hem (viz předchozí kapitola). Tyto proteiny tedy představují jednak cenný a relativně dobře dostupný modelový systém pro pozdější aplikace na systémy eukaryotické. Navíc v sobě zahrnují jedinečný cíl pro vývoj nových léků s antibakteriálním účinkem, které by vyřadily schopnost bakterií detegovat změny okolního prostředí a tím jejich možnost se měnícím podmínkám přizpůsobit. Proto jsou informace o mechanismu působení těchto proteinů tak důležité ve vztahu k lidskému zdraví.

Dvosložkový bakteriální systém, který obsahuje AfGcHK a jeho regulátor odpovědi (RR), představuje v současné chvíli asi nejdetailněji popsáný příklad pro ilustraci mechanismu detekce a přenosu signálu, a to primárně díky studiu jednotlivých složek tohoto systému v jejich přirozených, nezkrácených formách^{38,39,60–62}. V případě, že centrální atom železa hemu v sensorové doméně AfGcHK interaguje s O₂ nebo CO (jedná se o formy Fe^{II}-O₂ a Fe^{II}-CO) nebo je dokonce oxidován a interaguje s OH⁻, nebo CN⁻ (formy Fe^{III}-OH⁻ a Fe^{III}-CN⁻), struktura sensorové domény se změní tak, že se tento signál přenesou do funkční domény, ta se aktivuje a zahájí autokinasovou aktivitu, tj. fosfátová skupina ze substrátu enzymu, ATP, se přenesou na histidin v pozici 183 ve funkční doméně^{60,63}. Naopak, pokud je železo hemu bez interakce s molekulou plynu, tj. zůstává ve formě Fe^{II} bez interakce s šestým ligandem v distální oblasti hemu, nebo pokud molekula hemu v sensorové doméně úplně chybí, struktura sensorové domény zaujme takovou konformaci, která není produktivní, tj. nezpůsobí aktivaci funkční domény a v důsledku tohoto procesu enzym nevykazuje autokinasovou aktivitu^{60,63}. Protein AfGcHK se přirozeně vyskytuje jako dimer⁶¹ (obr. 4). Nejflexibilnější částí celého proteinu AfGcHK je smyčka, která spojuje sensorovou a funkční doménu a proteinová kavita distální vůči rovině hemu sensorové domény AfGcHK, která je zodpovědná za vazbu kyslíku, navíc tato oblast je jedinou flexibilní částí sensorové domény⁶¹. Mechanismus přenosu signálu mezi oběma doménami (tzv. intra-proteinový přenos signálu) byl objasněn kombinací několika experimentálních přístupů – vyřešením krystalové struktury izolované sensorové

domény asociované s aktivní formou Fe^{III}-CN⁻ a asociované s neaktivní Fe^{II} formou a srovnáním odhalených změn s výsledky metody, která studuje přirozenou, nezkrácenou variantu AfGcHK v různých stavech (vodík-deuteriová výměna kombinovaná s hmotnostně spektrometrickou detekcí)³⁸. Hlavní rozdíl mezi aktivní a neaktivní formou



Obr. 4. Schématické znázornění mechanismu detekce a přenosu signálu v případě AfGcHK. Pokud je ion železa hemu v sensorové doméně redukován a v prostředí není molekula kyslíku (a), zaujímá sensorová doména takovou konformaci, která je spojená s neaktivní konformací také funkční domény a nepozorujeme enzymovou aktivitu (autofosforylaci) funkční domény. Pokud ale dojde k detekci kyslíku (b) a tím k jeho vazbě do sensorové domény, změní se konformace této domény a daná změna je přenesena do domény funkční. Následně probíhá autofosforylační reakce. Neaktivní a aktivní stav AfGcHK lze schématicky připodobnit k pohybu nůžek. Přepřacováno podle cit³⁸. AfGcHK – histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z *Anaeromyxobacter* sp. kmen Fw10, která deteguje kyslík jeho interakcí s hemem. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

AfGcHK byly pozorovány v rámci proteinové kavity proximální vůči rovině hemu sensorové domény AfGcHK, na dimerizačním rozhraní sensorové (globinové) domény a ve vazebném místě pro substrát, tj. ATP ve funkční (kinasové) doméně³⁸. Data naznačují, že zásadní pro přenos signálu ze sensorové domény do domény funkční je dimerizační rozhraní sensorové domény³⁹ (obr. 4). Navíc se ukazuje, že tyrosin v pozici 15 hraje klíčovou roli v dimerizaci sensorové (globinové) domény AfGcHK a dimerizace této domény je nezbytná pro vnitřní přenos signálu a následnou autofosforylaci proteinu³⁹. Aktivní a neaktivní stav AfGcHK si můžeme představit jako uzavřené nebo otevřené nůžky (obr. 4). Signál pro aktivaci AfGcHK, vazba kyslíku k iontu železa hemu v sensorové doméně, vyvolá změnu v nejbližším okolí hemu, což způsobí změnu („uzavření“) dimerizačního rozhraní sensorové domény a tato změna je přenesena do domény funkční s následným přiblížením vazebního místa pro ATP blíže k histidinu v pozici 183, který se snadněji autofosforyluje („nůžky se uzavřou“). Při disociaci kyslíku z hemu sensorové domény se AfGcHK deaktivuje a opačný sled kroků si lze představit jako „otevření nůžek“ (obr. 4).

V tomto modelovém dvousložkovém systému se podařilo také vysvětlit mechanismus mezi-proteinového přenosu signálu. Pokud je protein AfGcHK autofosforylován, přeneše se fosfát z histidinu v pozici 183 na asparagin v pozici 52 první domény RR. Tato doména má k AfGcHK výrazně vyšší afinitu než doména druhá, na jejíž asparagin v pozici 169 je fosfát přenesen až poté, co proběhne interakce s první doménou^{61,63}. Předpokládáme, že fosforylace asparaginu v první RR doméně mění celkovou strukturu RR tak, že teprve po této změně může druhá doména RR interagovat s AfGcHK. Proteiny AfGcHK a RR tvoří komplex v poměru 2:1, tedy dimer AfGcHK interaguje s jedinou molekulou RR (cit.⁶¹).

6. Závěr

Přestože se hemové sensorové proteiny podílejí na řadě důležitých fyziologických procesů, přesný mechanismus jejich fungování a přenosu signálu ze sensorové domény do domény funkční zatím ještě nebyl uspokojivě popsán a pochopen. Vyřešení tohoto problému bude mít nezpochybnitelný praktický význam. Například role HRI v procesu rozvoje nádorů plic u lidí činí z tohoto hemového sensorového proteinu jedinečný cíl umožňující kontrolu takovýchto patologických procesů. Podobně hemové sensorové proteiny, které detegují kyslík, konkrétně YddV, EcDOS a AfGcHK, se podílejí na schopnosti bakterií reagovat na změnu vnějšího prostředí například iniciací tvorby biofilmu, sporulací nebo modulací virulence patogenických bakterií. Proto představují zajímavý terapeutický cíl při vývoji antibiotik nové generace. Abychom však mohli ovlivňovat funkce těchto sensorů, ať již detegují samotný hem nebo prostřednictvím vazby na hem detegují molekuly plynů, musíme nejprve pochopit molekulární mechanismy jejich působení. Jakmile pochopíme tento mechanis-

mus, můžeme navrhnout sloučeniny, které vyřadí z funkce schopnost těchto proteinů přenášet signál a tím reagovat na původní podněty. V konečném důsledku pak budeme schopni ovlivnit mnoho důležitých procesů, jak bylo diskutováno výše. Kromě toho je více než pravděpodobné, že mnohé z klíčových funkcí spojených s hemem, jak ve zdraví, tak v nemoci, budou teprve objeveny.

Seznam zkratk

HRI	kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2 α , která je regulována hemem (heme regulated inhibitor)
CooA	transkripční aktivátor, který deteguje CO
eIF2 α	eukaryotický iniciační faktor 2 α
EcDOS	přímý kyslíkový senzor z <i>Escherichia coli</i> , který vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény z <i>Escherichia coli</i>
AfGcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z <i>Anaeromyxobacter</i> sp. kmen Fw10
RR	regulátor odpovědi v dvousložkovém systému bakterie <i>Anaeromyxobacter</i>

LITERATURA

- Williams R. J.: *Nature* 343, 213 (1990).
- Holland H. D.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 361, 903 (2006).
- Andrews S. C.: *Adv. Microb. Physiol.* 40, 281 (1998).
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: *Chem.-Biol. Interact.* 160, 1 (2006).
- Iuchi S., Weiner L.: *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 1055 (1996).
- Imlay J. A.: *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755 (2008).
- Sánchez M., Sabio L., Gálvez N., Capdevila M., Dominguez-Vera J. M.: *IUBMB Life* 69, 382 (2017).
- Pino-Rios R., Cárdenas-Jirón G., Tiznado W.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 21267 (2020).
- Weerth R. S., Medlock A. E., Dailey H. A.: *J. Biol. Chem.* 297, 101017 (2021).
- Caughey W. S., Smythe G. A., O'Keefe D. H., Maskasky J. E., Smith M. I.: *J. Biol. Chem.* 250, 7602 (1975).
- Smith L. J., Kahraman A., Thornton J. M.: *Proteins* 78, 2349 (2010).
- van Vleck J. H.: *Phys. Rev.* 41, 208 (1932).
- Neidig M. L., Solomon E. I.: *Chem. Commun. (Camb. Engl.)* 5843 (2005). DOI:10.1039/b510233m
- Morita Y., Mason H. S.: *J. Biol. Chem.* 240, 2654 (1965).
- Liu G., Shao W., Zhu S., Tang W.: *J. Inorg. Biochem.* 60, 123 (1995).
- Capeillere-Blandin C., Mathieu D., Mansuy D.: *Biochem. J.* 392, 583 (2005).

17. Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu Y.: *Chem. Rev.* 114, 4366 (2014).
18. Gallio A. E., Fung S. S.-P., Cammack-Najera A., Hudson A. J., Raven E. L.: *JACS Au* 1, 1541 (2021).
19. Roumenina L. T., Rayes J., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J. D.: *Trends Mol. Med.* 22, 200 (2016).
20. Hanna D. A., Hu R., Kim H., Martinez-Guzman O., Torres M. P., Reddi A. R.: *J. Biol. Chem.* 293, 12378 (2018).
21. Donegan R. K., Moore C. M., Hanna D. A., Reddi A. R.: *Free Radical Biol. Med.* 133, 88 (2019).
22. Haskamp V. a 13 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 293, 2558 (2018).
23. Sweeny E. A. a 10 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 293, 14557 (2018).
24. Fleischhacker A. S., Ragsdale S. W.: *J. Biol. Chem.* 293, 14569 (2018).
25. Ponka P., Sheftel A. D., English A. M., Scott Bohle D., Garcia-Santos D.: *Trends Biochem. Sci.* 42, 395 (2017).
26. Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R.: *Handbook of Porphyrin Science*, World Scientific Publishing, Hackensack 2010.
27. Rodgers K. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 158 (1999).
28. Stone J. R., Marletta M. A.: *Biochemistry* 35, 1093 (1996).
29. Aono S., Nakajima H., Saito K., Okada M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 752 (1996).
30. Chen J. J., London I. M.: *Trends Biochem. Sci.* 20, 105 (1995).
31. Fagard R., London I. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 866 (1981).
32. Shimizu T., Lengalova A., Martínek V., Martínková M.: *Chem. Soc. Rev.* 48, 5624 (2019).
33. Shimizu T., Huang D., Yan F., Stranava M., Bartosova M., Fojtiková V., Martínková M.: *Chem. Rev.* 115, 6491 (2015).
34. Martínková M., Kitanishi K., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 288, 27702 (2013).
35. Igarashi J., Kitanishi K., Martinkova M., Murase M., Iizuka A., Shimizu T.: *Acta Chim. Slov.* 55, 67 (2008).
36. Igarashi J., Murase M., Iizuka A., Pichierri F., Martinkova M., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 283, 18782 (2008).
37. Zhang W., Phillips G. N.: *Structure* 11, 1097 (2003).
38. Stranava M. a 11 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 292, 20921 (2017).
39. Skalova T. a 9 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 295, 1587 (2020).
40. Lanzilotta W. N., Schuller D. J., Thorsteinsson M. V., Kerby R. L., Roberts G. P., Poulos T. L.: *Nat. Struct. Biol.* 7, 876 (2000).
41. Miksanova M., Igarashi J., Minami M., Sagami I., Yamauchi S., Kurokawa H., Shimizu T.: *Biochemistry* 45, 9894 (2006).
42. Lengalova A., Fojtikova-Proskova V., Vavra J., Martínek V., Stranava M., Shimizu T., Martinkova M.: *J. Inorg. Biochem.* 201, 110833 (2019).
43. Mukai K., Shimizu T., Igarashi J.: *Protein Pept. Lett.* 18, 1251 (2011).
44. Igarashi J., Sasaki T., Kobayashi N., Yoshioka S., Matsushita M., Shimizu T.: *FEBS J.* 278, 918 (2011).
45. Inuzuka T., Yun B.-G., Ishikawa H., Takahashi S., Hori H., Matts R. L., Ishimori K., Morishima I.: *J. Biol. Chem.* 279, 6778 (2004).
46. Martinkova M., Igarashi J., Shimizu T.: *FEBS Lett.* 581, 4109 (2007).
47. Uma S., Yun B. G., Matts R. L.: *J. Biol. Chem.* 276, 14875 (2001).
48. Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W. B. (ed.): *Translational Control in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 2007.
49. Wek R. C., Jiang H.-Y., Anthony T. G.: *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7 (2006).
50. Hirai K., Martinkova M., Igarashi J., Saiful I., Yamauchi S., El-Mashtoly S., Kitagawa T., Shimizu T.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 1172 (2007).
51. Liao M. a 9 spoluautorů: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 979 (2007).
52. Han X.-M., Lee G., Hefner C., Maher J. J., Correia M. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 128 (2005).
53. Greenman C. a 65 spoluautorů: *Nature* 446, 153 (2007).
54. Du Y., Liu G., Yan Y., Huang D., Luo W., Martinkova M., Man P., Shimizu T.: *Biometals* 26, 839 (2013).
55. Anzenbacher P. a 10 spoluautorů: *FEBS J.* 281, 5208 (2014).
56. Yan F., Fojtikova V., Man P., Stranava M., Martínková M., Du Y., Huang D., Shimizu T.: *Biometals* 28, 637 (2015).
57. Stranava M., Martínková M., Stiborová M., Man P., Kitanishi K., Muchová L., Vitek L., Martínek V., Shimizu T.: *J. Inorg. Biochem.* 140, 29 (2014).
58. Pavlou A., Martínková M., Shimizu T., Kitanishi K., Stranava M., Loullis A., Pinakoulaki E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 17007 (2015).
59. Lambry J.-C., Stranava M., Lobato L., Martinkova M., Shimizu T., Liebl U., Vos M. H.: *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 69 (2016).
60. Fojtikova V., Stranava M., Vos M. H., Liebl U., Hranicek J., Kitanishi K., Shimizu T., Martinkova M.: *Biochemistry* 54, 5017 (2015).
61. Stranava M., Martínek V., Man P., Fojtikova V., Kavan D., Vaněk O., Shimizu T., Martinkova M.: *Proteins* 84, 1375 (2016).
62. Fojtikova V., Bartosova M., Man P., Stranava M., Shimizu T., Martinkova M.: *Biometals* 29, 715 (2016).
63. Kitanishi K., Kobayashi K., Uchida T., Ishimori K., Igarashi J., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 286, 35522 (2011).

M. Martínková (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University*): **The Novel Role of Heme in Health and Diseases - Heme-Containing Sensor Proteins**

The iron atom possesses unique properties, being manifested in the heme molecule. In addition to the involvement of heme in many processes (such as oxygen or electron transport and catalysis of enzyme reaction), it can also regulate key pathways critical for health. Heme-containing sensor proteins mediate the heme regulation role. The review aims to underline the main characteristics of the heme-containing sensor proteins group, either sensing heme or sensing a gas molecule through a heme-binding site, on the example of specific representatives from each sensor subgroup.

Keywords: heme, hemoproteins, heme-containing sensor proteins, signal transduction

- Martínková M.: Chem. Listy 116, 163–171 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220163>

VYUŽITÍ 3D LIPIDOVÝCH MATRIC PRO ZAČLENĚNÍ A STABILIZACI BIOLOGICKY AKTIVNÍCH MOLEKUL

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

MARTINA ZATLOUKALOVÁ

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Martina.zatloukalova@seznam.cz

Došlo 30.12.21, přijato 26.1.22.

Klíčová slova: lipidové nanočástice, lipidová kubická fáze, kubozom, hexozom, biologicky aktivní látka

• <https://doi.org/10.54779/chl20220172>

Obsah

1. Úvod
2. Lipidové mezofáze
3. Začlenění proteinů do lipidových kubických fází
4. Začlenění elektroaktivních značek do lipidových kubických fází
5. 3D lipidové nanočástice
6. Závěr

1. Úvod

Povrchově aktivní lipidy (dále jen lipidy) jsou nejen základními biomolekulami lidského těla, ale také jednou z hlavních složek produktů farmaceutického, kosmetického nebo potravinářského průmyslu. Kromě toho, že jsou

zdrojem energie, plní řadu životně důležitých funkcí, podílí se na diferenciaci buněk, přenosu signálu, ochraně a izolaci orgánů a syntéze esenciálních biomolekul, jako jsou hormony nebo žlučové kyseliny¹. Lipidy jsou amfifilní látky obsahující ve své struktuře hydrofilní a hydrofobní část. Nepolární vazby hydrofobní části molekuly způsobují jejich omezenou rozpustnost ve vodném prostředí. Rozpustnost lipidů a jiných amfifilních molekul je charakterizována kritickou micelární koncentrací² (KMK). Po překročení KMK jednotlivých monomerů dochází ve vodném prostředí k tvorbě vyšších lipidových struktur, jako jsou např. micely, lipozomy, lipidové nanočástice nebo lipidové lyotropní tekuté krystaly³.

Na přelomu 19. a 20. století česko-rakouský biolog Reinitzer⁴ zjistil, že cholesteryl-benzoát přechází do kapalného stavu při teplotě 145 °C, do 179 °C má mléčné zbarvení a od 179 °C se jedná o čirou kapalinu. Stav, ve kterém má látka dva body tání, nazval „třetí fází“. Na jeho pilotní studie navázal fyzik Lehmannov⁴, který tyto látky nazval „mezofáze“ (později kapalné krystaly, tekuté krystaly). Tekuté krystaly jsou přechodem mezi kapalným a pevným krystalickým skupenstvím, mají tedy vlastnosti jak pevné substance (uspořádané a orientované molekuly), tak i kapaliny (pohyblivost, tekutost). Tekuté krystaly lze získat rozpouštěním pevné substance v rozpouštědle (lyotropní tekuté krystaly), nebo roztavením (termotropní tekuté krystaly). Tekuté krystaly mohou vznikat ve vodném prostředí i z některých lipidů⁴.

Lyotropní tekutá fáze na bázi lipidů je materiál napodobující biologické membrány a představuje vhodnou matici pro stabilizaci hydrofilních, hydrofobních i amfifilních látek. Biologicky aktivní sloučeniny jsou často relativně málo stabilní látky, které mohou být málo rozpustné, nebo dokonce nerozpustné ve vodném prostředí. Začlenění



Mgr. Martina Zatloukalová, Ph.D. studovala v letech 1997–2005 Gymnázium Jakuba Škody v Přerově, dále pak v letech 2005–2010 Chemicko-technologickou fakultu v Pardubicích, obor Klinická biochemie. Od roku 2010 působí na Ústavu lékařské chemie a biochemie Palackého Univerzity v Olomouci. Zde se v rámci disertační práce věnovala studiu flavonolignanů a flavonolů pod vedením prof. Jana Vacka. Během doktorského studia strávila roční zahraniční stáž v laboratoři prof. Any Brett v Portugalsku. Po obhajobě absolvovala roční postdoktorskou stáž na univerzitě ve Varšavě, kde se pod vedením prof. Renaty Bilewicz věnovala inkorporaci membránových proteinů do 3D-lipidových kubických fází. Od návratu do ČR až do současnosti pracuje jako odborný asistent na Ústavu lékařské chemie a biochemie v Olomouci. Hlavní oblastí jejího vědeckého zájmu je vývoj elektrochemických biosenzorů pro studium interakcí s proteiny, lipidy a DNA, studium oxidačně-redukčních vlastností, biotransformačních produktů a příprava lipidových stabilizačních matic pro biologicky aktivní látky. Je spoluautorkou 40 publikací v mezinárodních časopisech.

těchto relativně nestabilních molekul do nosných médií nabízí nové možnosti jejich transportu, řízeného a cíleného uvolňování, ale také jejich stabilizaci. Metodologie nanoenkapsulace se neustále vyvíjí a poskytuje tak nové možnosti přípravy a aplikace cílených formulací⁵.

V posledních několika desetiletích se pozornost zaměřuje na vývoj nových způsobů cíleného podávání léčiv. Transportní a aplikační soustava by v ideálním případě měla splňovat několik předpokladů. Měla by mít vysokou kapacitu pro inkorporaci látek, být stabilní a biokompatibilní, měla by umožnit řízené uvolňování látek a cíleně směřovat na místo působení⁶.

Dnešní konvenční lékové formy včetně lékových forem s postupným uvolňováním neplní všechny z uvedených podmínek. Řada nanoforem, mezi které řadíme polymerní nanočástice a nanokapsle, lipozomy, pevné lipidové nanočástice, fytozomy, nanoemulze a další, přináší značnou řadu výhod, včetně zvýšení rozpustnosti a biologické dostupnosti, zvýšení farmakologické aktivity, stability a zlepšení tkáňové distribuce. Nanoformy s inkorporovanými biologicky aktivními látkami tak mají potenciál pro zvýšení biodostupnosti a stabilních parametrů léčiv a obecně biologicky a farmakologicky aktivních látek.

2. Lipidové mezofáze

Samovolné uspořádání amfifilních molekul do organizovaných struktur je jedním ze spontánních rysů mnoha biologických struktur, jako je buněčná plazmatická membrána, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a hustě zvrásněné mitochondriální membrány. Uvedené biologické

struktury jsou inspirací pro vývoj nových biomimetických materiálů³.

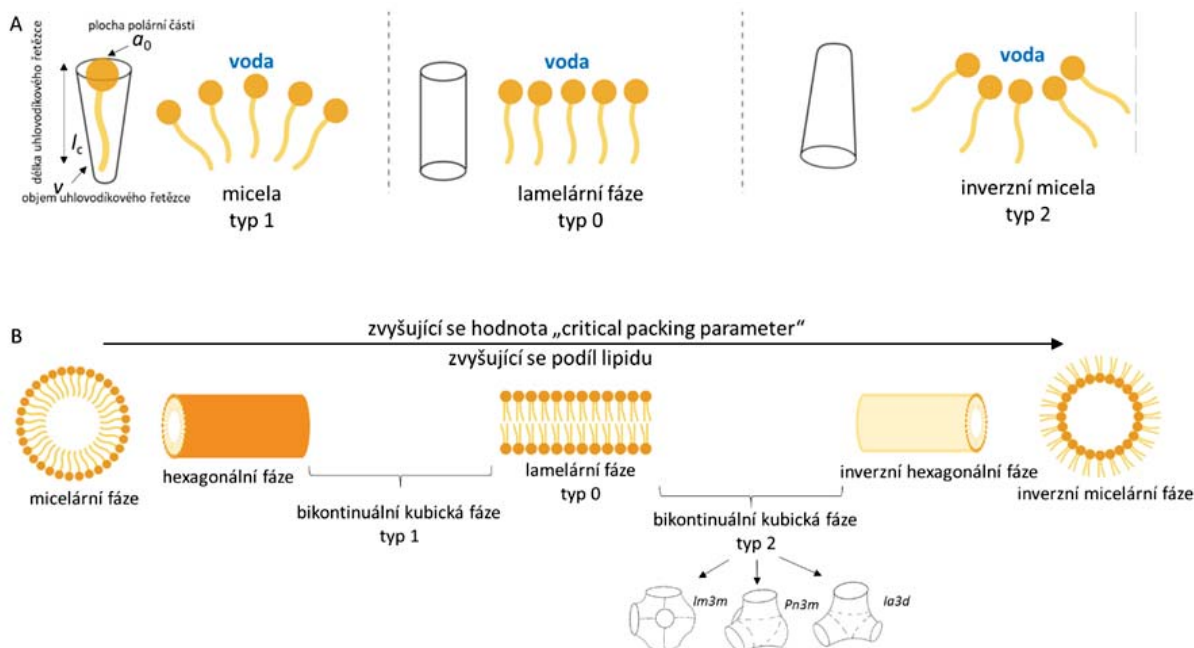
Cílem samouspořádaných útvarů je dosáhnout energeticky výhodného stavu. Jednou z hlavních hnacích sil vzniku těchto nadmolekulárních struktur je hydrofobní efekt. Existuje však mnoho faktorů určujících a ovlivňujících strukturu a stabilitu jednotlivých samouspořádaných útvarů. Rozhodující roli hraje koncentrace a tvar amfifilu. Pokud je koncentrace amfifilu rovna nebo vyšší než KMK a teplota vyšší než kritická micelární teplota (známá také jako Krafftova teplota), dochází k tvorbě micel. Amfifyly se liší především velikostí a tvarem hydrofilní a hydrofobní části molekuly, které se následně odrážejí v jejich prostorovém uspořádání (obr. 1).

Tenzidy mají tendenci tvořit samouspořádané kuželovité útvary typu 1, zatímco molekuly, které disponují menší polární částí, např. lipidy, mají tendenci tvořit inverzní micelární fáze typu 2. Biologické membrány tvořené širokým spektrem molekul různých tvarů tvoří dynamické samouspořádané útvary včetně lokálních planárních/lamelárních struktur⁷. Tvar samouspořádaných útvarů lze kvalitativně popsat podle teorie Israelachviliho². Tato teorie je založena na bezrozměrném parametru¹, tzv. „critical packing parameter“ (CPP). Parametr CPP je definován podle následující rovnice:

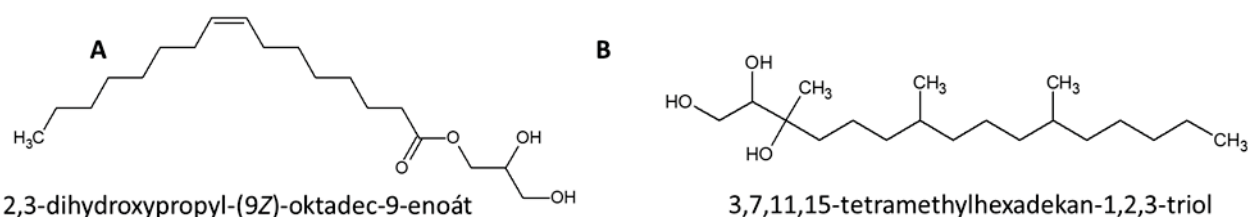
$$CPP = \frac{v}{a_0 l_c}$$

kde v je objem uhlovodíkového řetězce, a_0 je plocha polární části a l_c je délka uhlovodíkového řetězce.

Sférické a válcovité micely se tvoří jak u samouspořádaných útvarů typu 1, tak u inverzního micelárního uspořádání typu 2.



Obr. 1. A) Tvary a B) typy samouspořádaných útvarů amfifilních molekul po kontaktu s vodou



Obr. 2. Struktura A) 1-monooleinu a B) fytantriolu

Amfifily ve vodném prostředí zaujímají prostorové uspořádání, přičemž základní lipidové fáze nazýváme lamelární, hexagonální a bikontinuální kubické fáze. Vlivem přidaných složek do systému se mohou tvořit i jiné fáze⁷.

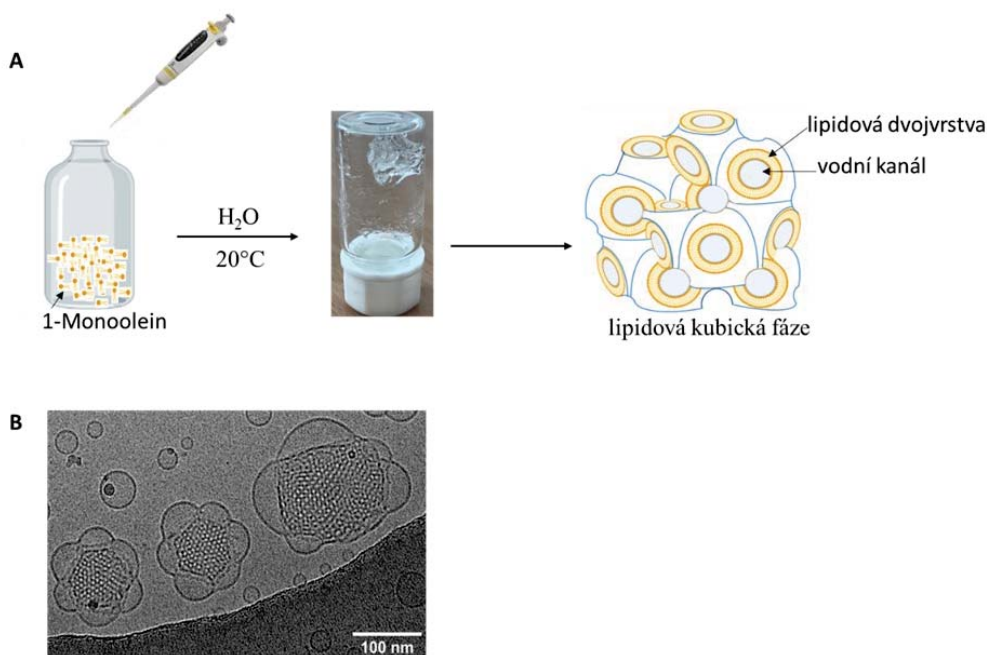
Dobře prostudované mezofázové lipidové struktury jsou založeny na 1-monoacylglycerolu (1-monoolein) a fytantriolu, jejichž struktury jsou zobrazeny na obr. 2.

1-Monoolein (2,3-dihydroxypropyl-(9Z)-oktadec-9-enoát, MO) je viskózní čirá látka s charakteristickým zápachem⁸. MO je nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v oleji a nižších uhlovodících např. chloroformu. Zejména díky vysoké rozpustnosti v oleji se MO využívá jako potravinářská emulze. Jde o netoxický, biologicky odbouratelný a biologicky kompatibilní materiál⁹.

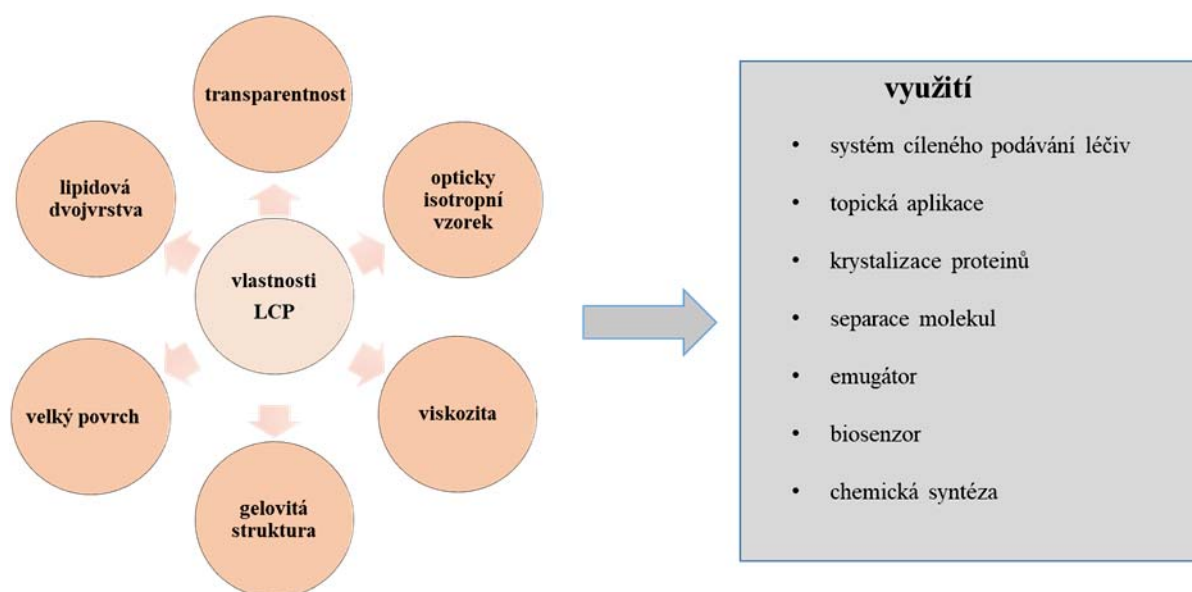
Vlastnosti amfifilních struktur jsou určeny složením jednotlivých fází, z nichž má zejména bikontinuální kubická fáze vysokou prostorovou orientaci^{10,11}. Důležitou podmínkou reprodukovatelnosti vzniku těchto prostorově uspořádaných fází je přesná definice použitých výchozích složek.

Kubická fáze (LCP) je jednou z mnoha kapalných krystalických fází, které se spontánně tvoří po smíchání lipidů s vodou za vhodně zvolených podmínek. Schematické zobrazení přípravy a LCP je ukázáno na obr. 3A.

LCP je termodynamicky stabilní, samostatně sestavená lipidová fáze s unikátními vlastnostmi. Kubická fáze se skládá ze dvou spojitých fází, z nichž jednu tvoří lipidová dvojvrstva a druhou voda. LCP je charakterizována krystalografickým prostorovým uspořádáním s *Im3m* (angl. primitive), *Pn3m* (angl. double diamond) a *Ia3d* (angl. gyroid) symetrií⁹. V případě *Im3m* fáze se vodní kanály setkávají v šesticečných spojích pod úhlem 90°. Pro *Pn3m* fázi je charakteristické čtyřcestné křížení vodních kanálů pod úhlem 109,5°. Snímek kuzozomů s *Pn3m* symetrií z transmisní elektronové kryomikroskopie vidíme na obr. 3B. Třícestné „křížovatky“ protínající se pod úhlem 120° jsou typické pro *Ia3d* fázi⁹. Vlastnosti kubické fáze ji činí atraktivním nástrojem pro řadu různých aplikací (obr. 4).



Obr. 3. A) Schématické zobrazení přípravy lipidové kubické fáze a B) snímek kuzozomů z transmisní elektronové kryomikroskopie



Obr. 4. Schématické znázornění vlastností lipidových fází a jejich následné využití (LCP – lipidová kubická fáze)

3. Začlenění proteinů do lipidových kubických fází

Kubická fáze jako matrice pro krystalizaci integrálních membránových proteinů se používá již více jak dvě desetiletí. Landau a Rosenbusch jako první v roce 1996 využili LCP pro krystalizaci membránového proteinu¹². Dnes můžeme najít v proteinové databance (PDB) více jak 700 proteinů, pro jejichž krystalizaci byla využita LCP (cit.¹³). Spadá mezi ně celá řada enzymů, transportérů¹⁴, kanálů, receptorů¹⁵, ale také strukturních proteinů¹⁶.

Krystalizace proteinů v LCP se ukázala být klíčová pro objasnění struktury několika mikrobiálních rhodopsinů a receptorů spojených s G-proteinem. LCP poskytuje proteinům přírodnější membránové prostředí na rozdíl od uměle vytvořeného prostředí spojeného s přítomností detergentů¹³. Příkladem využití LCP pro krystalizaci polárních, ve vodě rozpustných proteinů je lysozym. Lysozym na rozdíl od membránového bakteriorhodopsinu^{17,18} krystalizuje nezávisle na typu lipidové fáze¹⁹.

LCP byla také použita pro konstrukci biosenzorů, a to především elektrochemických. Viskózní, stabilní trojrozměrná lipidová dvojvrstva s inkorporovanými membránovými proteiny se snadno aplikuje na povrch elektrody²⁰. Polární analyty se nacházejí ve vodných kanálcích lipidových mezofází, mají tak volný přístup k povrchu elektrody i k proteinům. Tyto látky snadno komunikují s elektrodou přímo nebo pomocí elektroaktivních značek²¹. V roce 1994 Razumas a spol.²² jako první uvedli práci zabývající se přípravou LCP biosenzorů. První biosenzory založené na bázi enzymů inkorporovaných do LCP byly navrženy pro stanovení glukosy, laktátu, močoviny a kreatininu.

Proudové odezvy závislé na oxidaci H_2O_2 byly detegovány amperometricky. Tabulka I shrnuje publikované elektrochemické enzymové biosenzory založené na LCP.

Uvedené studie ukazují, že proteiny mohou být začleněny do lipidové fáze v poměrně vysokých koncentracích a mohou snadno komunikovat s povrchem elektrody. Co by ale mělo být bráno v úvahu, je vliv fyzikálně-chemických faktorů, jako je podíl vodné fáze, teplota, tlak, složení lipidů a přítomnost jiných látek, na stabilitu LCP při inkorporaci proteinů. Výše zmíněné faktory by mohly ovlivňovat fázový přechod LCP, její destabilizaci a podporovat tak následné uvolnění inkorporovaných enzymů v důsledku přechodu LCP na fázi hexagonální až lamelární.

Kromě krystalizace proteinů a konstrukce biosenzorů může být LCP využita i jako matrice pro výzkum stability, aktivity nebo interakce proteinů s ligandy^{23–25}. Příkladem je stabilitní studie sodno-draselné pumpy (NKA). NKA je membránový protein přenášející sodné a draselné ionty proti jejich koncentračnímu spádu za využití energie z hydrolyzy ATP. Naše práce ukázala stabilizaci NKA v LCP. Po 14 dnech aktivita NKA v LCP dosahovala stále 60 % maximální aktivity, zatímco NKA inkubovaná ve vodném prostředí již nebyla aktivní²⁴.

Modelovým příkladem studií zaměřených na výzkum oxidačně-redukčního chování proteinů inkorporovaných do LCP jsou studie prováděné s cytochromem c (cit.^{25–27}). Interakce cytochromu c s LCP napodobující prostředí vnitřní mitochondriální membrány byla zkoumána pomocí FTIR spektroskopie, diferenciální skenovací kalorimetrie a elektrochemických technik. Difúzní koeficient cytochromu c byl stanoven elektrochemickými metodami a ukázal velmi omezenou mobilitu proteinu v lipidovém prostředí²⁸.

Tabulka I
Elektrochemické enzymové biosenzory na bázi LCP

Enzym/protein	Metoda	Elektroda	Lit.
Glukosaoxidasa, ceruloplasmin	amperometrie	platinový disk	60
Hemoglobin	CV, amperometrie	elektroda ze skelného uhlíku	61
Glukosaoxidasa, laktát oxidasa, ureasa, kreatindeaminasa	amperometrie, potenciometrie	platinová elektroda pH elektroda	22
Glukosaoxidasa, pyranosaoxidasa a lakasa (angl. laccase)	CV	elektroda ze skelného uhlíku	62
Glukosaoxidasa	CV	uhlíková elektroda	63
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	SWV	elektroda ze skelného uhlíku	24
Ethanoldehydrogenasa	CV, DPV	elektroda ze skelného uhlíku	64
Lakasa (angl. laccase)	chronoamperometrie, CV, impedance	modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku	65
Cellobiosadehydrogenasa	CV, DPV	modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku	66
Cholesteroloxidasa	CV	elektroda ze skelného uhlíku, zlatá elektroda	67
Bilirubinoxidasa	CV	rotační uhlíková elektroda	68

CV – cyklická voltametrie, SWV – voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím, DPV – diferenční pulsní voltametrie

4. Začlenění elektroaktivních značek do lipidových kubických fází

Barauskas a spol.²⁹ připravili elektrochemicky aktivní kubickou fázi obsahující různé typy amfifilních látek. Byl pozorován několikanásobný pokles difuzního koeficientu amfifilů inkorporovaných do LCP ve srovnání s difuzním koeficientem stanoveným v acetonitrilových roztocích.

Rowinski a spol.²⁰ zkoumali chování hydrofilních sond v kubické fázi metodami cyklické voltametrie a chronokulometrie. Bylo zjištěno, že difuzní koeficient pro Ru(NH)₆³⁺ a benzochinon v LCP je nižší, resp. v souladu s difuzním koeficientem stanoveným v roztoku. Podobně se Kostela a spol.³⁰ zabývali stanovením difuzního koeficientu hydrofilních, hydrofobních a amfifilních elektroaktivních značek v LCP. Difuzní koeficienty pro tyto elektrochemicky aktivní značky byly také stanoveny v hexagonální fázi pomocí elektrochemických a impedančních metod. Získané výsledky ukazují, že hydrofilní sondy jsou transportovány k povrchu elektrody rychleji než sondy hydrofobní³¹.

5. 3D lipidové nanočástice

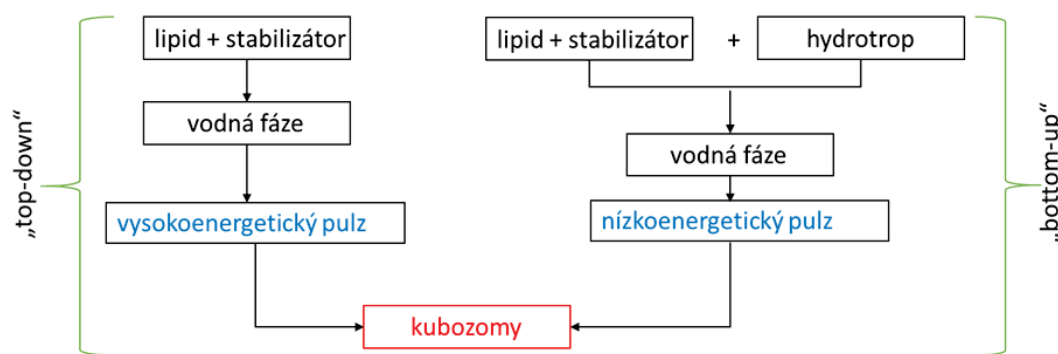
Pro konstrukci biosenzorů a vývoj transportních a aplikačních soustav se stále hledají a vyvíjejí nové nanonosiče na bázi lipidů. Jedna z klíčových výhod použití 3D lipidových nanočástic je účinná solubilizace ve vodě málo rozpustných látek, jak bylo ukázáno např. u kurkuminu³² nebo kvercetinu³³.

Mezi nejprozkoumanější lyotropní nanostrukturální nosiče řadíme kubozomy a hexozomy, které jsou definovány jako koloidní nanočástice s vnitřní bikontinuální kubickou a hexagonální strukturou. Tato skupina koloidních disperzí se nazývá ISAzomy (angl. internally self assembled ‘somes’ or particles). ISAzomy zahrnují kromě kubozomů a hexozomů také micelární kubozomy³⁴.

První zmínky o existenci kubozomů pocházejí z 80. let 20. století, kdy Larsson zjistil, že disperzí LCP vznikají submikronové částice s identickým vnitřním uspořádáním, jako má nadřazená kubická struktura³⁵. Kubozomy jsou vysoce stabilní nanočástice vytvořené z lipidové kubické fáze a stabilizované vnější polymerní vrstvou. Ve srovnání s lipozomy poskytují kubozomy a hexozomy výrazně větší povrch (až 400 m² g⁻¹) pro inkorporaci jak membránových proteinů, tak malých hydrofilních nebo hydrofobních molekul³⁶. Obecně existují dva hlavní přístupy přípravy kubozomů, přístup „top-down“ a „bottom-up“, přičemž oba vyžadují použití vhodného stabilizátoru (obr. 5).

Metoda „top-down“ je nejpoužívanější a nejstarší technikou v přípravě kubozomů⁸, zahrnuje dva hlavní kroky. Nejprve se připraví LCP, která je následně homogениzována/sonikována za využití vysokoenergetických pulzů. Kubozomy připravené metodou „top-down“ jsou stabilní vůči agregaci až jeden rok. Nevýhodou této metody je využití vysokoenergetických pulzů, které mohou ovlivňovat aktivitu inkorporovaných biologicky aktivních látek citlivých na zvýšenou teplotu³⁶.

Druhý způsob se běžně označuje jako metoda „bottom-up“, zahrnuje disperzi směsi obsahující lipid,



Obr. 5. Postup přípravy kubozomů

stabilizátor, hydrotrop a nadbytek vody (obr. 5)³⁷. Hydrotrop je klíčovým faktorem této metody, pomáhá solubilizaci lipidů za vzniku lipidových prekurzorů³⁸. Mezi nejčastěji používané hydrotrophy patří močovina, alginát sodný a benzoát sodný. Výhodou tohoto přístupu je využití menšího množství energie, takže může být použita i pro přípravu kubozomů s teplotně nestabilními látkami, jako jsou peptidy nebo proteiny⁸. Stejný postup přípravy lze využít i pro hexozomy³⁹.

Některé amfifilní látky – tenzidy (stabilizátory) brání agregaci ISAzomů ve vodném prostředí. V posledním desetiletí byly použity různé typy stabilizátorů pro přípravu kubozomů a hexozomů. Jeden z neúčinnějších a dobře prozkoumaných tenzidů je Poloxamer 407, který je komerčně dostupný pod názvem Pluronic F127 (cit.^{40,41}). Kromě Pluronic F127 se používají i další stabilizační látky včetně jiných polymerů (jako je F128, F108)^{42,43}, PEGylovaných lipidů nebo β -kaseinu⁴⁴. Výběr stabilizátoru pro přípravu ISAzomů je velmi důležitý, stabilizátory mohou modulovat vnitřní lipidovou nanostrukturu a tedy afinitu k hostujícím látkám⁴⁵.

Kapalné krystalické fáze a jejich odpovídající vodné disperze jsou charakterizovány především pomocí dvou technik, a to SAXS (malouhlový rozptyl rentgenového záření) a SANS (malouhlový rozptyl neutronů)⁴⁶. Metody se převážně využívají k popisu vlivu fyzikálně-chemických faktorů na strukturní vlastnosti nanočástic včetně složení lipidů, teploty, pH, tlaku a samotného efektu po inkorporaci cílových látek. Kromě SAXS a SANS se pro morfologickou charakterizaci využívá také cryo-TEM (transmisní elektronová kryomikroskopie)⁴⁷ a AFM (mikroskopie atomárních sil)⁴⁸, pro kontrolu velikosti částic DLS (dynamický rozptyl světla).

Pro demonstraci použití nanonosičů pro konstrukci biosenzorů uvádím práci založenou na kubozomech na bázi fytantriolu stabilizovaných pomocí F127. Pevný zlatý povrch senzoru byl modifikován prostřednictvím biotinovaných lipidů, které byly součástí kubozomů. Na modifikovaný povrch byla dále aplikována druhá sada kubozomů obohacená o glykolipid (GM1), který umožnil specifickou vazbu cholerového toxinu B z roztoku⁴⁹.

V dnešní době evidujeme rostoucí zájem o využití ISAzomů, zejména kubozomů a hexozomů, jako nanonosičů pro inkorporaci léčiv, zobrazovacích sond a antimikro-

biálních peptidů. Pozornost je věnována zejména solubilizaci a stabilizaci biologicky aktivních látek a vlivu složení lipidů a typu a koncentrace stabilizátoru na strukturní a morfologické vlastnosti těchto nanoforem. Na druhou stranu uvolňování látek z kubozomů/hexozomů nebo vlivu inkorporovaných látek či samotných kubozomů/hexozomů na buněčné signální dráhy se věnuje pouze pár studií. Uvolňování doxorubicinu z kubické lipidové fáze v závislosti na změně pH bylo studováno elektrochemickými metodami⁵⁰. Biodostupnost a cytotoxicita kubozomů byla zkoumána především na nádorových buněčných liniích^{41,51,52}. Kubozomy a hexozomy se začínají uplatňovat v teranostice. DLS, SAXS a cryo-TEM metody ukázaly, že hexozomy jsou schopny začlenit do své struktury jak fluorescenční sondu, tak protinádorové léčivo kamptotecin. Fluorescenční mikroskopii bylo ukázáno, že nádorová buněčná linie HeLa je schopna akumulovat modifikované hexozomy do svých lipidových struktur. Pro fluorescenční mikroskopii byly použity netoxické koncentrace modifikovaných hexozomů⁵³. Práce⁵⁴ jako první ukazuje využití kubozomů v radioterapii v kombinaci s chemoterapií. Kubozomy na bázi 1-monooleinu byly modifikovány začleněním protinádorového léčiva doxorubicinu a běžně používaného radionuklidu. Cytotoxicita modifikovaných kubozomů byla testována na buněčné lince HeLa. Bylo ukázáno, že kubozomy modifikované doxorubicinem a zároveň radionuklidem jsou toxičtější v porovnání se samotnými kubozomy nebo kubozomy se začleněním chemoterapeutikem/radionuklidem.

Kombinací cryo-TEM a SAXS metod byl studován vliv krevní plazmy na velikost, strukturní a morfologické vlastnosti kubozomů v čase⁵⁵. Pouze několik studií se zaměřuje na výzkum stability lipidových kubických a hexagonálních nanočástic v krevním řečišti, strukturních přeměn kubozomů/hexozomů po kontaktu s buněčnými membránami, krevními buňkami či proteiny, nebo se věnuje jejich buněčnému vylučování.

Strukturní uspořádání bikontinuálních kubických a hexagonálních fází umožňuje pomalejší (resp. postupné) uvolňování inkorporovaných látek. Také bylo ukázáno, že bikontinuální kubické nanostruktury mají mukoadhezivní vlastnosti^{56,57}. Využití těchto 3D nanolipidových struktur bylo aplikováno především pro orální, subkutánní, transdermální a periodontální podání biologicky aktivních

látek. Lipidové kapalné krystalické fáze jsou vysoce viskózní, a proto mají omezené využití jako intravenózní nanonosiče. Detailnější přehled využití kubo- a hexazomálních lipidových struktur na bázi 1-monooleinu nebo fytantriolu pro systémy cíleného podávání léčiv je shrnuto v následujících publikacích^{5,8,34,36,39,58}.

6. Závěr

Bylo ukázáno, že vysoce organizované 3D lipidové struktury se mohou využívat jako matrice pro krystalizaci integrálních membránových proteinů nebo při vývoji nových lipidových nanoforem pro transport a stabilizaci biologicky aktivních molekul. Optimální vnitřní lipidové uspořádání a výběr vhodných tenzidů pro stabilizaci nanonosičů jsou nezbytné pro navržení konkrétní využitelné lipidové matrice. Navzdory unikátním vlastnostem kubo- a hexozomů stále existuje řada otázek o osudu nanonosičů po jejich *in vivo* podání. Stejně tak, limitující znalosti shledávám v oblasti buněčného testování, včetně hlubšího pochopení mechanismu interakce s buněčnými membránami nebo receptory, samotného vstupu do buněk nebo uvolnění biologicky aktivních látek z nanonosičů. Zajímavým budoucím směrem výzkumu by mohlo být využití lipidových vehikul pro inkorporaci biologicky aktivních lipidů⁵⁹.

Děkuji prof. Janu Vackovi a doc. Jiřímu Vrbovi (Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci) za diskusi a kritické připomínky k textu.

Práce byla finančně podpořena projektem Grantové agentury České republiky č. 19-21237Y.

Použité zkratky

AFM	mikroskopie atomárních sil
CPP	„critical packing parameter“
cryo-TEM	transmisní elektronová kryomikroskopie
CV	cyklická voltametrie
DLS	dynamický rozptyl světla
DPV	diferenční pulsní voltametrie
KMK	kritická micelární koncentrace
LCP	lipidová kubická fáze
MO	1-monoolein
NKA	sodno-draselná pumpa
SANS	maloúhlový rozptyl neutronů
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SWV	voltametrie s vkládaným pravouhlým napětím

LITERATURA

- Kulkarni C. V.: *Nanoscale* 4, 5779 (2012).
- Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72, 1525 (1976).
- Patra J. K., Das G., Fraceto L. F., Campos E. V. R., del Pilar Rodriguez-Torres M., Acosta-Torres L. S., Diaz-Torres L. A., Grillo R., Swamy M. K., Sharma S.: *J. Nanobiotechnology* 16, 1 (2018).
- Mitov M.: *ChemPhysChem* 15, 1245 (2014).
- Shanmugam T., Banerjee R.: *Ther. Deliv.* 2, 1485 (2011).
- Nazaruk E., Górecka E., Osornio Y. M., Landau E. M., Bilewicz R.: *J. Electroanal. Chem.* 819, 269 (2018).
- Kulkarni C. V.: *Cosmetics* 3, 37 (2016).
- Gaballa S. A., El Garhy O. H., Abdelkader H.: *JABPS* 3, 1 (2020).
- Kulkarni C. V., Wachter W., Iglesias-Salto G., Engelskirchen S., Ahualli S.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 3004 (2011).
- Qiu H., Caffrey M.: *Biomaterials* 21, 223 (2000).
- Barauskas J., Landth T.: *Langmuir* 19, 9562 (2003).
- Landau E. M., Rosenbusch J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14532 (1996).
- Li D., Caffrey M.: *J. Mol. Biol.* 432, 5104 (2020).
- Cherezov V., Yamashita E., Liu W., Zhalnina M., Cramer W. A., Caffrey M.: *J. Mol. Biol.* 364, 716 (2006).
- Rasmussen S. G. F., DeVree B. T., Zou Y., Kruse A. C., Chung K. Y., Kobilka T. S., Thian F. S., Chae P. S., Pardon E., Calinski D.: *Nature* 477, 549 (2011).
- Kang Y., Gao X., Zhou X. E., He Y., Melcher K., Xu H. E.: *FEBS J.* 283, 816 (2016).
- Qutub Y., Reviakine I., Maxwell C., Navarro J., Landau E. M., Vekilov P. G.: *J. Mol. Biol.* 343, 1243 (2004).
- Chiu M. L., Nollert P., Loewen M. C., Belrhali H., Pebay-Peyroula E., Rosenbusch J. P., Landau E. M.: *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56, 781 (2000).
- Landau E. M., Rummel G., Cowan-Jacob S. W., Rosenbusch J. P.: *J. Phys. Chem. B* 101, 1935 (1997).
- Rowiński P., Korytkowska A., Bilewicz R.: *Chem. Phys. Lipids* 124, 147 (2003).
- Nazaruk E., Bilewicz R., Lindblom G., Lindholm-Sethson B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1569 (2008).
- Razumas V., Kanapienien J. J., Nylander T., Engström S., Larsson K.: *Anal. Chim. Acta* 289, 155 (1994).
- Ericsson B., Larsson K., Fontell K.: *Biochim. Biophys. Acta* 729, 23 (1983).
- Zatloukalová M., Nazaruk E., Novak D., Vacek J., Bilewicz R.: *Biosens. Bioelectron.* 100, 437 (2018).
- Razumas V., Talaikytė Z., Barauskas J., Mieziš Y., Nylander T.: *Vib. Spectrosc.* 15, 91 (1997).
- Razumas V., Larsson K., Mieziš Y., Nylander T.: *J. Phys. Chem. A* 100, 11766 (1996).
- Kraïneva J., Narayanan R. A., Kondrashkina E., Thiagarajan P., Winter R.: *Langmuir* 21, 3559 (2005).
- Vacek J., Zatloukalova M., Novak D.: *Curr. Opin. Electrochem.* 12, 73 (2018).
- Barauskas J., Razumas V., Talaikytė Z., Bulovas A., Nylander T., Tauraitė D., Butkus E.: *Chem. Phys. Lipids* 123, 87 (2003).
- Kostela J., Elmgren M., Kadi M., Almgren M.:

- J. Phys. Chem. B 109, 5073 (2005).
31. Kumar P. S., Lakshminarayanan V.: *Langmuir* 23, 1548 (2007).
 32. Esposito E., Ravani L., Mariani P., Contado C., Drechsler M., Puglia C., Cortesi R.: *Mater. Sci. Eng., C* 33, 4923 (2013).
 33. Linkevičiūtė A., Misiūnas A., Naujalis E., Barauskas J.: *Colloids Surf., B* 128, 296 (2015).
 34. Yaghmur A., Mu H.: *Acta Pharm. Sin. B* 11, 871 (2021).
 35. Larsson K.: *J. Phys. Chem.* 93, 7304 (1989).
 36. Karami Z., Hamidi M.: *Drug Discovery Today* 21, 789 (2016).
 37. Spicer P. T., Hayden K. L., Lynch M. L., Ofori-Boateng A., Burns J. L.: *Langmuir* 17, 5748 (2001).
 38. Mezzenga R., Meyer C., Servais C., Romoscanu A. I., Sagalowicz L., Hayward R. C.: *Langmuir* 21, 3322 (2005).
 39. Hirlekar R., Jain S., Patel M., Garse H., Kadam V.: *Curr. Drug Delivery* 7, 28 (2010).
 40. Tilley A. J., Drummond C. J., Boyd B. J.: *J. Colloid Interface Sci.* 392, 288 (2013).
 41. Murgia S., Falchi A. M., Mano M., Lampis S., Angius R., Carnerup A. M., Schmidt J., Diaz G., Giacca M., Talmon Y.: *J. Phys. Chem. B* 114, 3518 (2010).
 42. Chong J. Y., Mulet X., Waddington L. J., Boyd B. J., Drummond C. J.: *Soft Matter* 7, 4768 (2011).
 43. Yaghmur A., Glatter O.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 147, 333 (2009).
 44. Zhai J., Waddington L., Wooster T. J., Aguilar M.-I., Boyd B. J.: *Langmuir* 27, 14757 (2011).
 45. Nilsson C., Østergaard J., Larsen S. W., Larsen C., Urtti A., Yaghmur A.: *Langmuir* 30, 6398 (2014).
 46. Angelova A., Angelov B., Garamus V. M., Couvreur P., Lesieur S.: *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 445 (2012).
 47. Helvig S., Azmi I. D., Moghimi S. M., Yaghmur A.: *AIMS Biophys.* 2, 116 (2015).
 48. Neto C., Aloisi G., Baglioni P., Larsson K.: *J. Phys. Chem. B* 103, 3896 (1999).
 49. Fraser S. J., Mulet X., Martin L., Praporski S., Mechler A., Hartley P. G., Polyzos A., Separovic F.: *Langmuir* 28, 620 (2012).
 50. Nazaruk E., Szlęzak M., Górecka E., Bilewicz R., Osornio Y. M., Uebelhart P., Landau E. M.: *Langmuir* 30, 1383 (2014).
 51. Falchi A. M., Rosa A., Atzeri A., Incani A., Lampis S., Meli V., Caltagirone C., Murgia S.: *Toxicol. Res.* 4, 1025 (2015).
 52. Tudose A., Celia C., Belu I., Borisova S., Paolino D.: *Farmacia* 62, 777 (2014).
 53. Caltagirone C., Arca M., Falchi A. M., Lippolis V., Meli V., Monduzzi M., Nylander T., Rosa A., Schmidt J., Talmon Y.: *RSC Adv.* 5, 23443 (2015).
 54. Cytryniak A., Nazaruk E., Bilewicz R., Górzyńska E., Żelechowska-Matysiak K., Walczak R., Mames A., Bilewicz A., Majkowska-Pilip A.: *Nanomaterials* 10, 2272 (2020).
 55. Mat Azmi I. D., Wu L., Wibroe P. P., Nilsson C., Østergaard J., Sturup S., Gammelgaard B., Urtti A., Moghimi S. M., Yaghmur A.: *Langmuir* 31, 5042 (2015).
 56. Nielsen L. S., Schubert L., Hansen J.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 231 (1998).
 57. Souza C., Watanabe E., Borgheti-Cardoso L. N., Fantini M. C. D. A., Lara M. G.: *J. Pharm. Sci.* 103, 3914 (2014).
 58. Akbar S., Anwar A., Ayish A., Elliott J. M., Squires A. M.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 101, 31 (2017).
 59. Zatloukalová M., Jedinák L., Riman D., Franková J., Novák D., Cytryniak A., Nazaruk E., Bilewicz R., Vrba J., Papoušková B.: *Redox Biol.* 46, 102097 (2021).
 60. Nylander T., Mattisson C., Razumas V., Mieziš Y., Håkansson B.: *Colloids Surf.* 114, 311 (1996).
 61. Gao F., Yao Z., Huang Q., Chen X., Guo X., Ye Q., Wang L.: *Colloids Surf.* 82, 359 (2011).
 62. Nazaruk E., Bilewicz R.: *Bioelectrochemistry* 71, 8 (2007).
 63. Aghbolagh M. S., Khani Meynaq M. Y., Shimizu K., Lindholm-Sethson B.: *Bioelectrochemistry* 118, 8 (2017).
 64. Wu G., Yao Z., Fei B., Gao F.: *J. Electrochem. Soc.* 164, G82 (2017).
 65. Liu Y., Qu X., Guo H., Chen H., Liu B., Dong S.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2195 (2006).
 66. Grippo V., Ma S., Ludwig R., Gorton L., Bilewicz R.: *Bioelectrochemistry* 125, 134 (2019).
 67. Ropers M.-H., Bilewicz R., Stébé M.-J., Hamidi A., Miclo A., Rogalska E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 240 (2001).
 68. Rowinski P., Kang C., Shin H., Heller A.: *Anal. Chem.* 79, 1173 (2007).
- M. Zatloukalová** (*Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc*): **3D Lipidic Matrix for Incorporation and Stabilization of Biologically Active Molecules**
- In aqueous media, biologically active substances are usually unstable, poorly soluble compounds with low bioavailability. Incorporation of these compounds into the structure of lipid-based lyotropic liquid crystalline phase or nanoparticles can increase their solubility and subsequent bioavailability. The aim of this review is to clarify the principle of self-assembly of lipidic amphiphilic molecules in the aqueous environment, to present lipid bicontinuous cubic and hexagonal phases and their current biological application.
- Keywords: lipidic nanoparticles, lipidic cubic phase, cubosome, hexosome, biological active compound
- Zatloukalová M.: *Chem. Listy* 116, 172–179 (2022).
 ● <https://doi.org/10.54779/chl20220172>

MULTIRESPONZIVNÍ POLYMERNÍ KONTRASTNÍ ČINIDLA PRO ^{19}F MRI NA BÁZI POLY[N-(2,2-DIFLUORETHYL)AKRYLAMIDU]

Tento článek je součástí seriálu *Ženy v české chemii*

KRISTÝNA KOLOUCHOVÁ^a
a ONDŘEJ GROBORZ^{a,b}

^a Ústav makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Heyrovského náměstí 2, 162 06 Praha 6,

^b Ústav biofyziky a informatiky, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Salmovská 1, 120 00 Praha 2
kolouchova26@gmail.com

Došlo 25.1.22, přijato 2.2.22.

Klíčová slova: termoresponzivita, ROS-responzivita, LCST, diagnostika, teranostika, systémy pro cílený transport léčiv, polymerní depo

• <https://doi.org/10.54779/chl20220180>

Úvod

Magnetická rezonance (magnetic resonance imaging, MRI) byla vynalezena v roce 1971 na univerzitě ve Stony Brooku profesorem Paulem Lauterburgem a od té doby se stala jednou z klinicky nejdůležitějších neinvazivních zobrazovacích technik^{1–3}. Tato technika je založená na sledování distribuce vodíku (^1H) v organismu s pomocí silného magnetického pole a radiofrekvenčních pulzů k získání anatomicko-patologického obrazu. Metoda MRI je vhodná zejména pro zobrazování měkkých tkání a orgánů. Její hlavní výhodou oproti rentgenu (RTG), počítačové tomografii (computed tomography, CT), pozitronové emisní tomografii (positron emission tomography, PET) a jedno-

fotonové emisní tomografii (single-photon emission computerized tomography, SPECT) je, že pacienta nevystavuje působení ionizujícího záření, takže je vhodná i pro těhotné ženy a mladistvé. Další významnou výhodou MRI je, že tato metoda není limitována tloušťkou měřené tkáně (narozdíl od ultrazvuku)⁴. Díky těmto výhodám se MRI stala nepostradatelnou součástí klinické praxe.

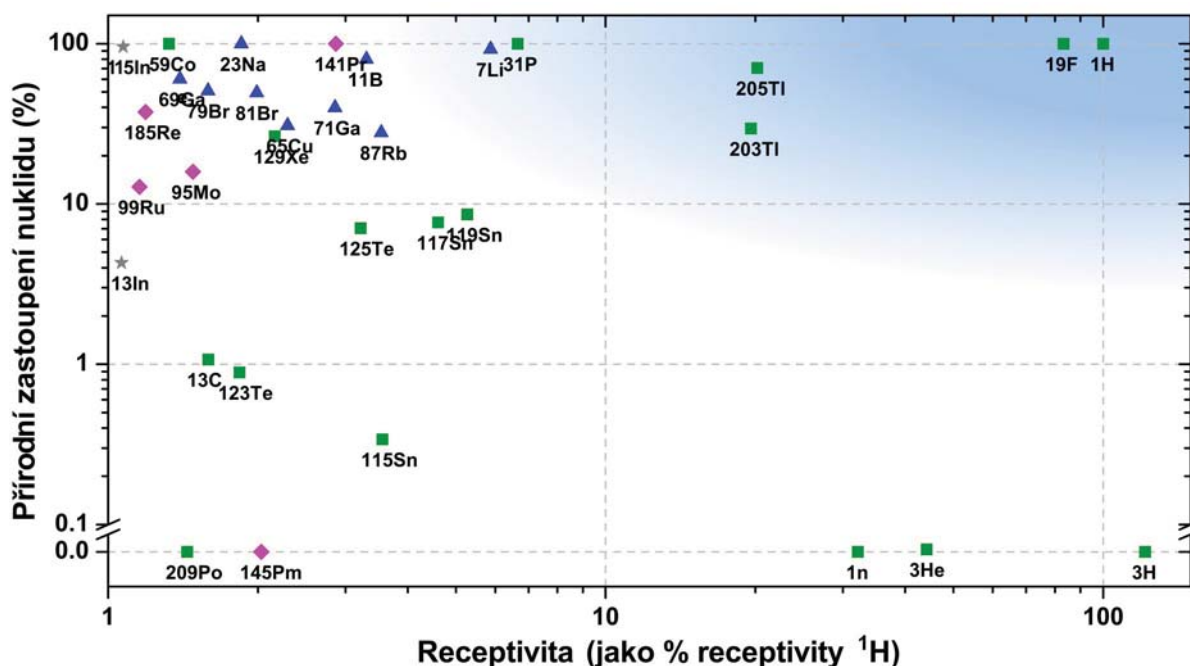
I přes velkou klinickou užitečnost MRI nelze některé patologické tkáně rozlišit od zdravých pomocí standardních MRI technik, protože mezi nimi nevzniká dostatečný kontrast. V některých případech lze kontrast mezi fyziologickými a patologickými tkáněmi zvýšit s pomocí kontrastních látek s afinitou k patologické tkáni, ve které se akumulují. S pomocí kontrastních látek pak lze na magnetické rezonanci detegovat například amyloidní plaky u Alzheimerovy nemoci či některá nádorová onemocnění, která by jinak nešlo zobrazit^{5,6}. Nicméně, paleta aktuálně používaných kontrastních látek stále neumožňuje detegovat mnohé patologie, protože chybí látky s afinitami k daným patologiím^{7–12}. Navíc, kontrastní látky jsou většinou komplexy gadolinia, které se může po dekomplexaci v organismu kumulovat a působit toxicky¹³. Proto je v současnosti žádoucí získat nové netoxické kontrastní látky či tracers, které by umožňovaly rozšířit spektrum možných MRI vyšetření.

Další možností, jak rozšířit spektrum aplikací MRI, je detekce jiných atomů než ^1H . Metoda MRI umožňuje sledovat distribuci jakýchkoliv nuklidů s nenulovým spinovým číslem (např. ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P), nicméně jeden z nevhodnějších nuklidů pro MRI je fluor ^{19}F . Nuklid ^{19}F má celou řadu vhodných vlastností:

(a) Má jednu z nejvyšších známých MR sensitivit (obr. 1) (jinými slovy, jádra ^{19}F poskytují na MRI silný signál,



Ing. Kristýna Kolouchová, Ph.D. získala inženýrský titul v roce 2016 na Ústavu organické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Její magisterská práce se zabývala přípravou Fisherových biskarbenových komplexů. Během studia na VŠCHT Praha se zrodil její zájem o makromolekulární chemii, což vedlo k doktorskému studiu na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky. Studium absolvovala v pracovní skupině „Nadmolekulárních polymerních systémů“ pod vedením Mgr. Martina Hrubého, Ph.D., DSc. Svou doktorskou práci zaměřila na přípravu a aplikaci chytrých polymerních systémů, kombinujících terapeutickou funkci kontrolovaného uvolňování léčiv s možností zobrazování polymeru pomocí fluoroové magnetické rezonance. V průběhu doktorského studia byla spoluautorkou devíti článků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech, svou práci prezentovala na mnoha mezinárodních konferencích a dále se zúčastnila tří zahraničních stáží na univerzitě v Gentu, Tel Avivu a Postupimi. Po obhájení doktorského titulu v prosinci roku 2020 získala prestižní stipendium vlámské výzkumné nadace (FWO, Research Foundation – Flanders) na tříletou post-doktorandskou stáž na Univerzitě v Gentu ve skupině „Polymer Chemistry & Biomaterials“ pod vedením prof. Sandry Van Vlierbege. Zde v současnosti pokračuje na výzkumu polymerních tracerů, tentokrát se zaměřením na aplikace v regenerativní medicíně.



Obr. 1. Sensitivita a relativní přírodní zastoupení různých nuklidů a jejich spinové číslo. Přibližná oblast nuklidů vhodných pro MRI je vyznačena modře (převzato z literatury a upraveno¹⁴). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy).

kteří závisí na gyromagnetickém poměru daného nuklidu a jeho spinovém čísle).

- (b) Fluor se v přírodních zdrojích vyskytuje jen jako ^{19}F , není tedy potřeba jej pro zvýšení kontrastu izotopově obohacovat.
- (c) Fluor může mít velmi rozmanité chemické posuny, takže je možné aplikovat a sledovat i více fluorovaných kontrastních činidel (dále jen tracerů) najednou (pokud mají rozdílné chemické posuny).
- (d) ^{19}F MRI lze změřit i běžnými ^1H MRI přístroji, jen s minimálními hardwarovými změnami (je dokonce možné měřit zároveň ^1H a ^{19}F MRI)^{2–4}.

Nicméně, narozdíl od vodíku je obsah fluoru v organismu minimální (velmi nízký „background noise“), což znamená, že (a) před vyšetřením musíme dodat fluorované xenobiotikum (též ^{19}F tracer) a (b) jakýkoliv signál z ^{19}F pak odpovídá sledovanému xenobiotiku.

Od 90. let minulého století byla vyvinuta řada ^{19}F tracerů, z nichž několik našlo uplatnění v klinické praxi^{6,15,24–28,16–23}. Nejvíce zkoumanou skupinou potenciálních tracerů byly perfluorované uhlovodíky (též fluorouhlíky), protože mají vysoký obsah fluoru, jsou netoxické, obvykle velmi dobře tolerovány a při perorálním podání se prakticky nevstřebávají a zůstávají jen v gastrointestinálním traktu. Díky své nevstřebatelnosti některé z nich – například perflubron (1-bromperfluoroktan) – se pro vyšetření tohoto traktu dokonce začaly používat v klinické praxi. Zájem o ^{19}F MRI nicméně postupně upadal pro nedostatek jiných

klinicky zajímavých tracerů k vyšetřování a ^{19}F MRI na čas upadla v zapomnění.

V posledních letech se výzkum ^{19}F MRI začíná soustřeďovat na makromolekulární (polymerní) tracery, u kterých lze kombinací monomerů získat požadovaný obsah fluoru pro MRI a zároveň v širokém rozmezí ladit fyzikálně-chemické vlastnosti těchto tracerů (např. rozpustnost či afinitu k tkáním)²³. Polymerní tracery zároveň mohou do své molekulární či supramolekulární struktury zakomponovat léčiva, která pak přepravují na patologicky postižené místo, čímž zvyšují specificitu léčby a zároveň snižují její vedlejší účinky^{5,29–34}. Navíc, tyto systémy pro cílenou dopravu a řízené uvolňování léčiv (drug-delivery systems, DDS) umožňují monitorování průběhu terapie (tento přístup se někdy označuje jako teranostika, kombinace slov **terapie** a **diagnostika**).

Aby byl polymer použitelný pro ^{19}F MRI, měl by mít co nejvyšší obsah fluoru ve své struktuře. Zároveň, tyto fluorové atomy by měly být chemicky a magneticky ekvivalentní, aby poskytovaly na MRI jediný signál. Posledními důležitými parametry jsou relaxační časy T_1 (spin-mřížkový čas) a T_2 (spin-spinový čas), kde T_1 by měl být co nejnižší, a naopak T_2 co nejvyšší (alespoň 10 ms)²³. Proto jen málokterý fluorovaný polymer je vhodný pro ^{19}F MRI – použití většiny polymerů ztroskotá na velmi nevhodných relaxačních časech (např. polytetrafluorethylen, teflon, má relaxační čas T_2 významně pod 1 ms (cit.²³), takže signál není na běžných přístrojích detegovatelný).

Mezi fluorovanými polymery svými vlastnostmi vyniká poly[*N*-(2,2-difluorethyl)akrylamid] (PDFEA), jehož kopolymery poskytují velmi versatilní platformu pro vývoj polymerních tracerů pro ^{19}F MRI. V tomto článku popisujeme vlastnosti a možné aplikace kopolymerů poly[*N*-(2,2-difluorethyl)akrylamidu] (PDFEA), coby multiresponzivních „chytrých“ ^{19}F tracerů.

Vlastnosti kopolymerů *N*-(2,2-difluorethyl)akrylamidu

Polymery na bázi *N*-(2,2-difluorethyl)akrylamidu mají poměrně vysoký obsah fluoru (až 28 hm.%) a jsou hydrofilní (což je na fluorované polymery poměrně neobvyklé). Dále dávají na NMR jeden úzký a silný signál s velmi vhodnými relaxačními časy (T_1 v rozmezí 300 až 450 ms, T_2 120 až 200 ms), což je velká výhoda pro jejich aplikaci v ^{19}F MRI. Vodné roztoky PDFEA vykazují termoresponzivitu označovanou jako dolní kritická rozpouštěcí teplota (lower critical solution temperature, LCST). To znamená, že při zahřátí jeho vodných roztoků nad teplotu zákalu (cloud point temperature, T_{CP}) dojde k fázové separaci na fázi s vysokým obsahem polymeru a s nízkým obsahem polymeru, což se projeví vznikem hydrogelových agregátů viditelných okem. Právě tohoto jevu lze využít v mnoha biologických aplikacích pro tvorbu nanočástic pro DDS, injikovatelná termogelující depa či kultivace tkání.

Pozoruhodné na polymerech je především to, že i když po agregaci dochází ke snížení signálu polymeru, tak efekt je relativně malý (obr. 2) a objevuje se až významně nad T_{CP} polymeru. Jinými slovy, narozdíl od většiny polymerních tracerů je možné polymery na bázi PDFEA detegovat na ^{19}F MRI i v agregovaném stavu (pevném skupenství). Tento jev lze vysvětlit tak, že agregaci vznikají nanogelové částice^{25,28,35}, v nichž je část polymeru vysrážená (a má krátký T_2 „à la teflon“, tudíž jej

nevidíme na MRI), ale většina polymeru má stále zachovanou část své mobility (a nedochází tak ke zkrácení času T_2).

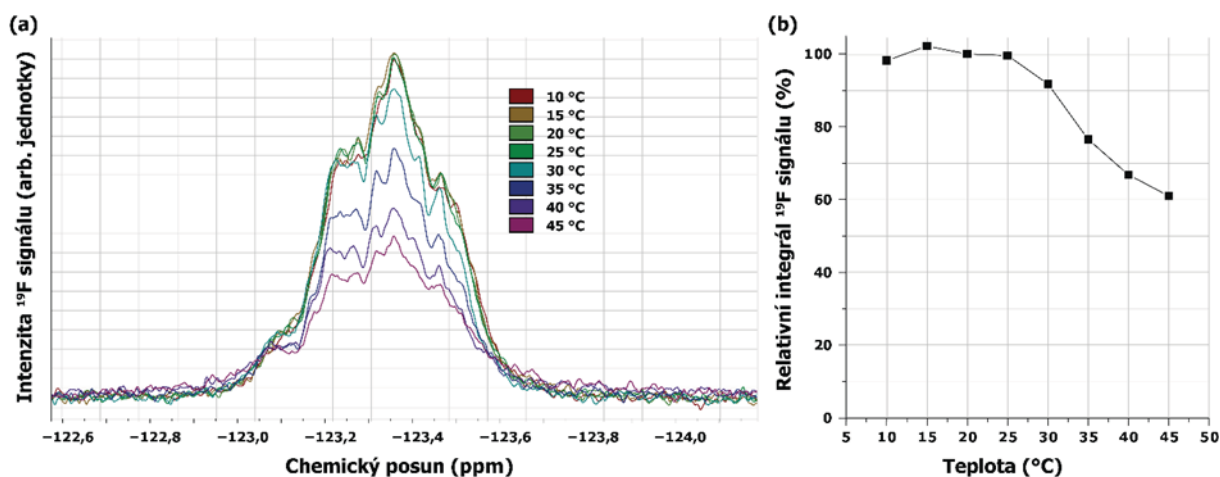
Termoresponzivní částice

Složitější polymerní architektury s termoresponzivní složkou jsou rovněž schopné samouspořádání při změně teploty^{36–41}. Roztoky blokových kopolymerů DFEA s hydrofilními monomery, například *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidem (HPMA) nebo 2-methyl-2-oxazolinem (MeOx), také vykazují termoresponzivní chování (které je podmíněné přítomností jednotek DFEA)^{25,28,35}. Jestliže se takovéto kopolymery ohřejí nad svou T_{CP} , dochází i zde k jejich agregaci a vzniku nanogelových částic („self-assembled particles“) (obr. 3), jejichž průměr je do značné míry „laditelný“ poměrem obsahů komonomerů. Tyto částice pak je možné použít na dopravu léčiva do nádorů díky tzv. Enhanced Permeability and Retention (EPR) efektu⁴². Tento jev popisuje fenestraci nádorových cév a špatnou nebo úplně chybějící lymfatickou drenáž, díky čemuž se nanočástice do velikosti cca 200 nm akumulují v nádorové tkáni. Díky obsahu fluoru jsou tyto polymery sledovatelné na ^{19}F MRI, což může přinést další klinicky cenné informace o úspěšnosti léčby a prognóze pacienta.

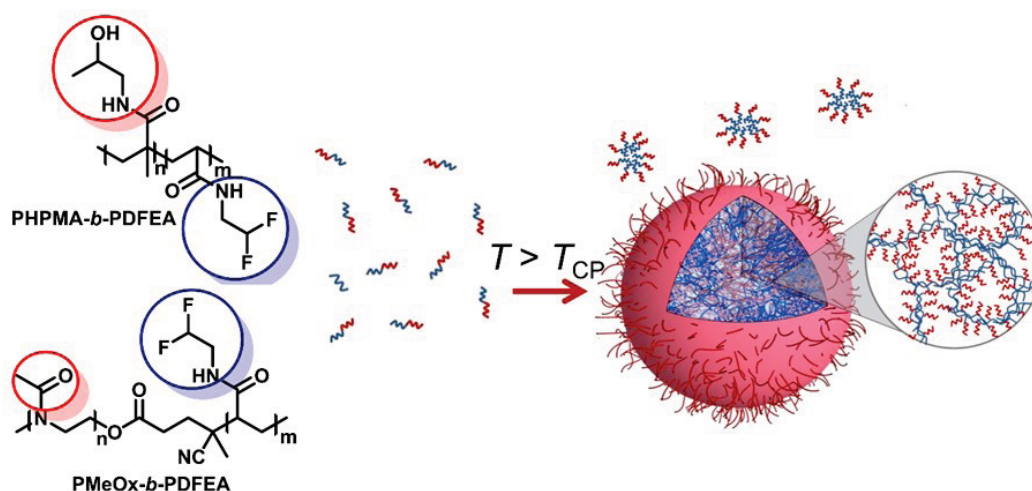
Redoxně responzivní a termoresponzivní částice

Záněty a nádory mají poněkud specifické prostředí – vyskytuje se zde nižší pH (téměř 5,0) a vyšší koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS). Toho lze využít k přípravě multi-responzivních DDS, která by uvolňovala svůj obsah jen v těchto podmínkách^{20,21,27,43–45}.

S touto myšlenkou byly připraveny kopolymery HPMA a DFEA, které navíc obsahovaly malé množství kovalentně vázané ferrocenové skupiny. Tato skupina je sama značně hydrofobní (čímž podporuje agregaci polymeru), nicméně v přítomnosti reaktivních forem kyslíku



Obr. 2. (a) ^{19}F NMR spektra kopolymeru PDFEA při různých teplotách a (b) integrál ^{19}F MR signálu v závislosti na teplotě roztoku. $T_{\text{CP}} \approx 23$ °C (převzato z literatury³⁵). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy).

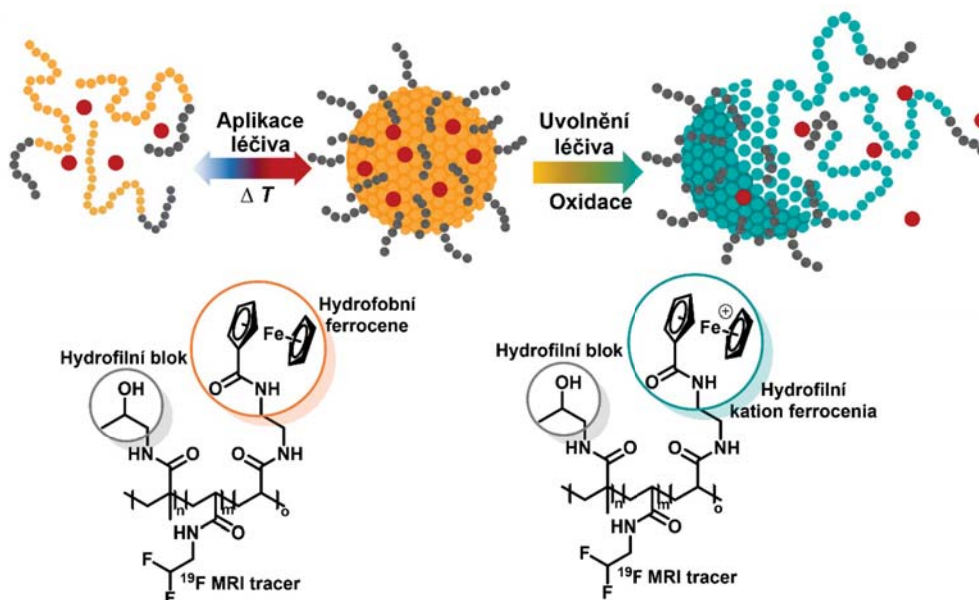


Obr. 3. Schématické znázornění samouspořádání připravených polymerů ve vodném roztoku nad teplotou přechodu do fyzikálně síťované nanogelové částice, která je v rovnováze s populací micel (upraveno z citace²⁵).

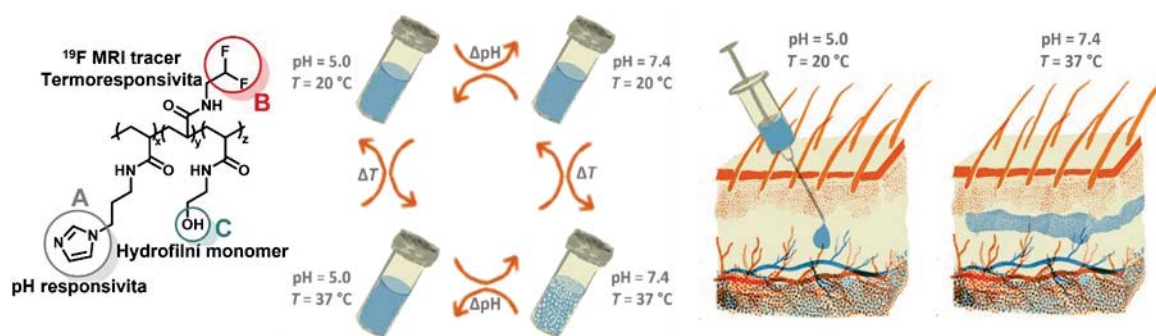
a za kyselého pH se může oxidovat na hydrofilní ferrocenium a tím podpoří rozpad částic (obr. 4)²⁷. Takovéto částice se poté dají použít na dopravu léčiv s pomocí EPR efektu. Pokud se částice dostanou do nádorového prostředí, díky lokální oxidaci rychle uvolní svůj obsah a mají terapeutický účinek, zatímco v jiných částech těla svůj obsah uvolňují pomaleji a zabraňují tak tomu, aby obsah léčiva dosáhl toxických úrovní²⁷. Díky obsahu PDFEA je možné celý proces sledovat metodou ¹⁹F MRI.

Injikovatelné implantáty

Roztoky netoxických termoresponzivních polymerů je možné aplikovat do tkání, kde dojde k ohřátí roztoků, fázové separaci a vzniku „injikovatelných“ implantátů na místě vpichu. Tyto implantáty mohou sloužit jako nosič radionuklidu (pro brachyterapii, tj. „lokální radioterapii“), pro lokální imunoterapii, či mohou lokálně uvolňovat inkorporovaná léčiva. Pokud jsou polymery zároveň pH responzivní a rozpouštějí se při kyselém pH, mají dodatečné výhody:



Obr. 4. Schématické znázornění tvorby částic za současné enkapsulace léčiva zvýšením teploty roztoku polymeru a léčiva a následný rozpad částic a uvolnění léčiva po oxidaci ferrocenu



Obr. 5. Schéma syntézy termo- a pH-responzivních terpolymerů. Jsou znázorněny jejich rozpustnosti ve vodných roztocích o různé teplotě a pH a schematicky jejich *in vivo* aplikace (upraveno z literatury²⁶).

- (a) polymery lze rozpustit v okyseleném fyziologickém roztoku a vpíchnout do tkáně; narozdíl od čistě termo-responzivních polymerů nehrozí agregace polymerů v injekční stříkačce. V tkáni se roztok jak ohřeje, tak zneutralizuje a agreguje na místě vpichu (obr. 5).
- (b) implantáty se rozpouštějí rychleji, pokud je v jejich okolí nějaká patologická tkáň s kyselým pH (např. nádor nebo zánět), což způsobuje, že nádor/zánět je vystaven vyšším koncentracím léčiv než okolní zdravá tkáň (obr. 6)²⁶.

Kopolymery (zde přesněji terpolymery) DFEA je možné připravit s různými obsahy hydrofilních monomerů (např. *N*-(2-hydroxyethyl)akrylamidu, s cílem modulovat T_{CP}) a pH-responzivního monomeru (např. derivátu imidazolu). V bazickém prostředí je tento polymer bez náboje a agreguje při 25 až 40 °C (podle obsahu hydrofilního

monomeru)²⁶. V kyselém prostředí dojde k protonaci imidazolové skupiny, čímž na polymeru vzniká kladný náboj a zvýší se tak jeho hydrofilita. Tím se jeho T_{CP} zvýší nad tělesnou teplotu (takže polymer při tělesné teplotě neagreguje). Díky přítomnosti fluoru v monomerní jednotce DFEA je možné tento proces sledovat *in vivo* pomocí ¹⁹F MRI. Pozoruhodné je, že dle obsahu hydrofilního monomeru je možné ladit biologické poločasy těchto dep ve zdravých potkanech v rozmezí mezi 30 a více než 200 dny.²⁶ Takovéto polymery by tedy bylo možné použít pro dlouhodobou farmakoterapii nebo pro značení a následné sledování tkání, kde volbou složení polymeru je možné dosáhnout vlastností implantátu vhodného pro zamýšlenou aplikaci.

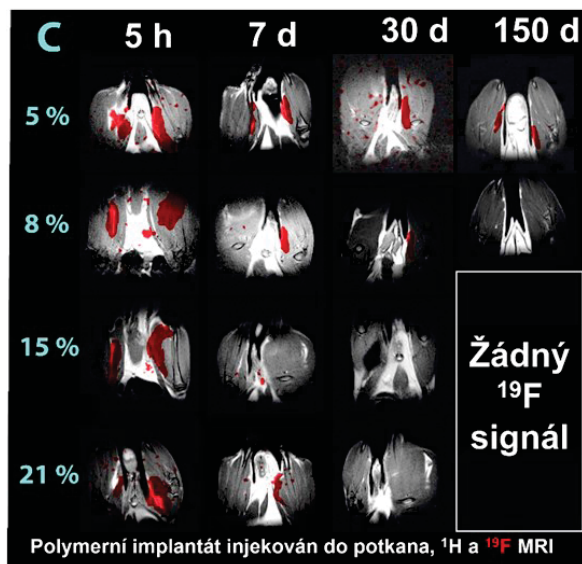
Závěr

V této studii popisujeme různé možné aplikace polymerních ¹⁹F MRI chytrých polymerních materiálů na bázi poly[*N*-(2,2-difluorethyl)akrylamidu]. Tyto polymery jsou biokompatibilní, netoxické a mohou najít užití u multiresponzivních systémů pro cílený transport léčiv či injikovatelných dep pro široké škály medicínálních aplikací.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (grant č. LT-C19032) a Technologické agentuře České republiky (grant TAČR KAPPA č. TO01000074).

LITERATURA

- Lautenburg P. C.: *Nature* 242, 190 (1973).
- Rinck P. A.: *Spectrosc. Eur.* 20, 7 (2008).
- Mansfield P., Grannell P. K.: *Phys. Rev. B* 12, 3618 (1975).
- Bennett K. M., Jo J., Cabral H., Bakalova R., Aoki I.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 74, 75 (2014).
- Yoo D., Lee J. H., Shin T. H., Cheon J.: *Acc. Chem. Res.* 44, 863 (2011).
- Staal X., Koshkina O., Srinivas M., v knize: *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals* (Tressaud A., Haufe G.,



Obr. 6. Spojení ¹H MRI (šedě) a ¹⁹F MRI (červeně) při sledování časových změn obsahu fluorovaných kopolymerů v potkaním stehně. Hodnoty C odpovídají molární koncentraci hydrofilního komonomeru, tj. *N*-(2-hydroxyethyl)akrylamidu. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy).

- Leroux F. R., ed.), kap. 11, str. 397. Academic Press, Cambridge 2019.
7. Bruckman M. A., Yu X., Steinmetz N. F.: *Nanotechnology* 24, 462001 (2013).
 8. Penfield J. G., Reilly R. F.: *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 3, 654 (2007).
 9. Servant A., Jacobs I., Busy C., Fabbro C., da Ros T., Pach E., Ballesteros B., Prato M., Nicolay K., Kostarelos K.: *Carbon* 97, 126 (2016).
 10. Chen Y. a 11 spoluautorů: *Biomaterials* 33, 2388 (2012).
 11. Na H. B., Hyeon T.: *J. Mater. Chem.* 19, 6267 (2009).
 12. Ahrens E. T., Rothbächer U., Jacobs R. E., Fraser S. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8443 (1998).
 13. Ibrahim M. A., Hazhirkarzar B., Dublin A. B.: *Gadolinium Magnetic Resonance Imaging*. StatPearls Publishing, Treasure Island 2022.
 14. Groborz O.: *Pharmacokinetics of Intramuscularly Administered Thermoresponsive Polyacrylamides*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2021.
 15. Ruiz-Cabello J., Barnett B. P., Bottomley P. A., Bulte J. W. M.: *NMR Biomed.* 24, 114 (2011).
 16. Srinivas M., Heerschap A., Ahrens E. T., Figdor C. G., de Vries I. J. M.: *Trends Biotechnol.* 28, 363 (2010).
 17. Giraudeau C. a 10 spoluautorů: *Angiogenesis* 16, 171 (2013).
 18. Fuchs A. V., Bapat A. P., Cowin G. J., Thurecht K. J.: *Polym. Chem.* 8, 5157 (2017).
 19. Fu C., Tang J., Pye A., Liu T., Zhang C., Tan X., Han F., Peng H., Whittaker A. K.: *Biomacromolecules* 20, 2043 (2019).
 20. Švec P. a 15 spoluautorů: *Macromolecules* 55, 658 (2021).
 21. Fu C., Herbst S., Zhang C., Whittaker A. K.: *Polym. Chem.* 8, 4585 (2017).
 22. Higuchi M., Higuchi M., Iwata N., Matsuba Y., Sato K., Sasamoto K., Saido T. C.: *Nat. Neurosci.* 8, 527 (2005).
 23. Jirak D., Galisova A., Kolouchova K., Babuka D., Hruby M.: *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* 32, 173 (2019).
 24. Knight J. C., Edwards P. G., Paisey S. J.: *RSC Adv.* 1, 1415 (2011).
 25. Babuka D., Kolouchova K., Hruby M., Groborz O., Tosner Z., Zhigunov A., Stepanek P.: *Eur. Polym. J.* 121, 109306 (2019).
 26. Kolouchova K. a 11 spoluautorů: *J. Control. Release* 327, 50 (2020).
 27. Kolouchova K., Groborz O., Cernochova Z., Skarkova A., Brabek J., Rosel D., Svec P., Starcuk Z., Slouf M., Hruby M.: *Biomacromolecules* 22, 2325 (2021).
 28. Kolouchova K. a 12 spoluautorů: *Biomacromolecules* 19, 3515 (2018).
 29. Sumer B., Gao J.: *Nanomedicine* 3, 137 (2008).
 30. Ahmed N., Fessi H., Elaissari A.: *Drug Discovery Today* 17, 928 (2012).
 31. Vu-Quang H., Vinding M. S., Nielsen T., Ullisch M. G., Nielsen N. C., Kjems K.: *Nanomed. Nanotechnol., Biol. Med.* 12, 1873 (2016).
 32. Chen F., Ehlerding E. B., Cai W.: *J. Nucl. Med.* 55, 1919 (2014).
 33. Alexis F., Anker J. N.: *Ther. Deliv.* 5, 97 (2014).
 34. Švec P. a 13 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 63, 15960 (2020).
 35. Babuka D., Kolouchova K., Groborz O., Tosner Z., Zhigunov A., Stepanek P., Hruby M.: *Nanomaterials* 10, 2231 (2020).
 36. Kotsuchibashi Y., Ebara M., Aoyagi T., Narain R.: *Polymers* 8, 380 (2016).
 37. Bloksma M. M., Paulus R. M., van Kuringen H. B. C., van der Woerd F., Lambermont-Thijs H. M. L., Schubert U. S., Hoogenboom R.: *Macromol. Rapid Commun.* 33, 92 (2012).
 38. Ward M. A., Georgiou T. K.: *Polymers* 3, 1215 (2011).
 39. Loukotová L. a 11 spoluautorů: *J. Control. Release* 268, 78 (2017).
 40. de la Rosa V. R., Woisel P., Hoogenboom R.: *Mater. Today* 19, 44 (2016).
 41. Kolouchová K. a 10 spoluautorů: *Polym. Chem.* 12, 5077 (2021).
 42. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.: *J. Control. Release* 65, 271 (2000).
 43. James H. P., John R., Alex A., Anoop K. R.: *Acta Pharm. Sin. B* 4, 120 (2014).
 44. Jäger E. a 10 spoluautorů: *Nanoscale* 8, 6958 (2016).
 45. Jäger E. a 17 spoluautorů: *Biomacromolecules* 21, 1437 (2020).

K. Kolouchová^a and O. Groborz^b (^a *Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*, ^b *Institute of Biophysics and Informatics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Multiresponsive Polymer Tracers for ¹⁹F MRI Based on Poly[*N*-(2,2-difluoroethyl) Acrylamide]**

Polymers with lower critical solution temperature (LCST) are molecularly soluble in their solutions at low temperatures but, when heated above their cloud point temperature, these polymers assemble into supramolecular particles or macroscopic precipitates. These particles or precipitated polymeric depots can be used for diagnostics, targeted drug delivery, controlled drug release from a depot or a combination of diagnostics and therapy (theranostics). Herein, we describe smart polymer systems which contain *N*-(2,2-difluoroethyl)acrylamide monomer unit (DFEA) and form polymeric nanoparticles upon heating or precipitate after injection to polymeric implants/depots. Due to a high fluorine content and to relaxation properties of this element, these polymers are suitable as tracers for the ¹⁹F MRI method, a promising non-invasive diagnostic tool. Moreover, DFEA copolymers can contain monomers that react to additional physicochemical properties, resulting in multiresponsive polymers (pH- or redox-responsive), which can be used for smart drug delivery

systems with controlled release of drugs in the target environment.

Keywords: thermoresponsiveness, ROS-responsiveness, LCST, diagnostic, theranostic, drug delivery systems, polymer depot

● Kolouchová K., Groborz O.: Chem. Listy 116, 180–186 (2022).

● <https://doi.org/10.54779/chl20220180>

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (grant no. LT-C19032) and Technology Agency of the Czech Republic (grant no. TAČR KAPPA č. TO01000074).

ROLE A ZASTOUPENÍ ŽEN V ČESKÉ CHEMII, ZEJMÉNA NA VŠCHT PRAHA

Tento článek je součástí seriálu Ženy v české chemii

ANNA MITTNEROVÁ

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
anna.mittnerova@vscht.cz

Došlo 9.1.22, přijato 25.1.22.

Klíčová slova: vědkyně, profesorka, genderová rovnováha, Cena Julie Hamáčkové

• <https://doi.org/10.54779/chl20220187>

Motto

„Nerovnost postavení mužů a žen ve vědě se odráží v počtu publikací, v oceňování a zejména v oblasti financování. Ženy a dívky patří do vědy! Stereotypy ale odvádí ženy z vědeckých oborů. Je čas uznat, že více diversity znamená více inovací. Pokud nebude víc žen v oborech přírodních a technických věd, bude svět i nadále utvářen muži a pro muže a potenciál žen zůstane nevyužitý. Musíme proto zajistit, aby dívky měly možnost studovat obory, v nichž vidí své budoucí uplatnění: například programování, strojařství, cloudové technologie, robotika nebo zdravotnictví.“¹ říká ve svém poselství k Mezinárodnímu dni žen a dívek ve vědě generální tajemník OSN António Guterres.

1. Úvod

Téma role a zastoupení žen se zaměřením na chemii a související vědní obory je velice široké a mapovat ho a publikovat výsledky průzkumu je námět na víceletý projekt. Určitý segment mapoval projekt s názvem „Transformační procesy po roce 1989 optikou přeměny výzkumných ústavů chemického průmyslu“ podpořený GA ČR v letech 2018–2020 (cit.²) řešený na Sociologickém ústavu AV ČR, v.v.i. v letech 2018–2020.

Na VŠCHT Praha probíhal v letech 2014–2017 projekt TRIGGER „Transforming Institutions by Gendering Contents and Gaining Equality in Research“³ podpořený ze 7. rámcového programu EU a projekt PEDICEV „Posilování evropské dimenze českého výzkumu zastupováním ČR v expertních skupinách ERA a transformací výzkumné organizace z hlediska genderové vyváženosti“⁴ podpořený z programu EUPRO II MŠMT ČR. Tyto projekty měly za cíl zjistit, jaká je skutečná situace z hlediska zastoupení mužů a žen na úrovni studijních programů a ve výzkumné, pedagogické a tvůrčí činnosti této vysoké školy a navrhnout opatření, která by vedla k utváření vnitřní kultury, jež by nastavovala příznivé podmínky pro vyšší zapojení žen do výzkumu, umožňovala vyvážené zastoupení mužů a žen i na vyšších kariérních pozicích a v rozhodovacích orgánech školy a reflektovala tak změny v současné společnosti, kdy na této vysoké škole studuje víc dívek než chlapců.



Ing. Anna Mittnerová (nar. 1950). Vystudovala na VŠCHT Praha, technologii skla a keramiky na FCHT, kde ještě 5 let pracovala na výzkumném úkolu pro tehdejší Keramické závody Znojmo. V letech 1978 až 1992 působila v laboratořích Stavební geologie Praha. Po roce 1989 odešla do komerční společnosti zastupující zahraniční firmy v oblasti stavební chemie a požární bezpečnosti. Rok pracovala i na obchodním oddělení Americké ambasády v Praze. V roce 2003 se vrátila zpět na akademickou půdu jako administrátorka mezinárodních projektů VaV. Po krátkém působení na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR přešla v roce 2006 na Oddělení pro vědu a výzkum VŠCHT Praha, kde administrovala projekty zejména rámcových programů EU zde řešených. Byla řešitelkou projektů programů MŠMT EUPRO a EUPRO II a EU programu „Lifelong Learning“. V roce 2014 získala se svým týmem účast ve čtyřletém projektu 7.RP EU s názvem TRIGGER, „Transforming Institutions by Gendering Contents and Gaining Equality in Research“, ve kterém začala prosazovat zavádění nových přístupů vycházejících z genderových politik ve VaV do vnitřního systému řízení VŠCHT Praha. Podílela se na rozjezdu Poradenského a kariérního centra a mentoringového programu pro začínající vědkyně a vědce. V současnosti působí na Zahraničním oddělení, kde má na starosti mezinárodní mobility vědeckých pracovníků. Podílela se na návrhu a vytvoření elektronického informačního systému MOBIS pro registraci přijíždějících cizinců, zpracovala a publikovala metodické návody „Výjezdy do zahraničí v akademické sféře, průvodce související legislativou“ a „Zaměstnávání a hostování cizinců v českém akademickém prostředí“. Zúročuje tak své zkušenosti, které získala v letech 2010–2013, kdy byla delegátkou Programového výboru PEOPLE Evropské komise pro 7.RP a kdy působila v poradní skupině MŠMT pro rozvoj lidských zdrojů a gender. A. Mittnerová je spoluautorkou aplikace ANLUPA pro snadné vyhledávání grantových příležitostí ve VaV. Každoročně se podílí na organizaci popularizační akce Noc vědců na VŠCHT Praha.

Anna Mittnerová vychovala dvě, dnes již dospělé děti, má 4 vnoučata. Jejimi koníčky a zálibami jsou hudba, zpěv, hraje na kytaru a klavír, ráda sportuje, v létě jezdí na kole, v zimě lyžuje.

2. Pohled od historie do současnosti a podíl zastoupení žen

Vyšší zapojení žen v technických oborech českých vysokých škol, potažmo v chemii, je třeba vnímat i z hlediska obrovské proměny společnosti od konce 19. století do současnosti. Je třeba porovnat, jaké měly možnosti studovat a realizovat se v technických oborech ženy v Rakousko-uherském mocnářství, jaké změny do vzdělávání přinesl vznik samostatného Československa, neopomenout vliv druhé světové války, uvědomit si, co přineslo období budování socialismu a normalizace a jaké změny nastaly po pádu tohoto režimu v roce 1989 a sledovat, jak se situace proměňuje nyní a jak jí vnímá současná společnost. Bohužel i v dnešní době stále přetrvává v části společnosti obava z výuky a hlavně z maturity z matematiky a dalších předmětů jako např. fyzika a chemie. I přes veškeré snahy popularizátorů chemie z řad vědecké komunity je chemie pořád vnímána jako něco škodlivého a život ohrožujícího. O to více je nutné zviditelňovat kariérní trajektorie a úspěchy významných osob a zejména žen, které v oboru chemie vynikly a jejichž působení bylo přínosem nejen pro danou instituci či vysokou školu, ale i pro celou společnost.

V roce 2016 vyšel ve sborníku České společnosti chemické u příležitosti 68. sjezdu chemických společností⁵ příspěvek s názvem „Studium a další působení žen na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, proměny v průběhu posledních 100 let“. Z tohoto příspěvku si připomeňme některé pasáže:

„V Rakousko-uherském mocnářství nebylo ženám umožněno studovat na vysokých školách technických. Začátkem dvacátého století však sílilo emancipační hnutí a snahy tento přístup ke vzdělávání žen změnit. V těchto snahách se angažoval i dvorní rada, a rektor České vysoké školy technické, profesor Julius Stoklasa, který se se svým profesorským sborem již v roce 1909 zasazoval o „připuštění“ žen k řádnému studiu na všech oborech a speciálních kursech vysokého učení technického. Toto doporučení se týkalo i studia technické chemie. Tehdejší snahy vystihuje článek v Národní politice z roku 1912 (cit.⁶), kde byla otištěna řeč prof. Stoklasy pronesená na manifestativní schůzi pro vyšší vzdělání ženské u příležitosti 50. výročí úmrtí Boženy Němcové.“ Nicméně jeho žádost byla ve Vídni zamítnuta a situace se začala měnit až po první světové válce a po rozpadu mocnářství.

„V roce 1920 byla v rámci Českého vysokého učení technického ustavena jako jedna ze sedmi vysokých škol



Vysoká škola chemicko-technologického inženýrství (VŠCHTI), na které již ve školním roce 1920/21 studovalo 48 žen, což bylo 5 % ze všech posluchačů. Jednou z prvních posluchaček České vysoké školy technické byla pozdější profesorka Julie Hamáčková,

kteřá je považována za zakladatelku české hydrochemie. V letech 1955/56 byla proděkankou a od r. 1957 do r. 1959 děkankou fakulty technologie paliv a vody.⁷

V meziválečném období se procentuální zastoupení žen mezi posluchači a aspiranty nepřehouplo přes 10 %. Situace se začala rapidně měnit až v padesátých letech, kdy ve školním roce 1955/56 vzrostl počet posluchaček na 30 % a na této hodnotě setrval i během dalších let socialistické éry. Po revoluci v roce 1989 začal poměr zastoupení studentek vůči studentům na VŠCHT Praha strmě stoupat a do roku 2005 skokově vzrostl o 20 %.

V roce 2002 vydala VŠCHT Praha k padesátému výročí samostatného působení publikaci „Historie výuky chemie, Osobnosti a události“⁸, která mapuje historii výuky chemie na území dnešní České republiky. Kromě historických dokumentů a fotografií zahrnuje kniha životopisy šedesáti významných pedagogů, kteří byli ve své době zejména vedoucími kateder a ústavů. Mezi těmito šedesáti osobnostmi je zmíněna pouze jediná žena, a to Julie Hamáčková.

V roce 2005 bylo procentuální zastoupení studentů a studentek v přepočtu na celou školu stejné, v dalších letech počet studentek dále stoupal a v roce 2015 vzrostl jejich podíl na 60 %. V roce 2020 bylo nejvyšší procentuální zastoupení studentek na Fakultě potravinářské a biochemické technologie, a to 72 %, nejmenší pak na Fakultě chemicko-inženýrské (43 %). Na Fakultě chemické technologie studovalo 56 % studentek a na Fakultě technologie ochrany prostředí 49 % studentek.

V posledních letech je tedy patrný trend, kdy na úrovni studentů bakalářských a magisterských studijních programů převažuje počet žen, u studentů doktorských studijních programů je dosaženo vyrovnaného počtu mužů a žen, nicméně od kariérní úrovně vědecký pracovník znamená strmý pokles zastoupení žen. Celkový počet zaměstnanců v roce 2020 byl 1222 a z toho 580 žen (47 %), to je téměř polovina, ale pokud nejvyšší akademické pozice zastávají v převaze muži, musí potom většina žen působit na nižších kariérních pozicích. Administrativních, technických a ostatních pracovníků bylo celkem 328 z toho 204 žen (62 %).

V letech 2017 až 2021 bylo na VŠCHT Praha jmenováno profesorem⁹ celkem 47 akademiků, z toho pouze 3 ženy, to je pouhých 6,3 %. Tyto tři ženy jsou všechny z Fakulty potravinářské a biochemické technologie (FPBT), v rámci této fakulty je to 33 % ze všech jmenovaných. Z toho vyplývá, že na zbylých třech fakultách nebyla za posledních 5 let jmenována profesorkou ani jediná žena. Pokud tento trend bude i nadále pokračovat, situace v poměru zastoupení žen na nejvyšší akademické pozici, tedy v pozici profesora, se ještě zhorší. Z 10 % profesorek z celkového počtu profesorů působících na VŠCHT Praha, vykazovaných ve statistikách z roku 2015, jsou v současnosti všechny profesorky již v důchodovém věku, i přesto na VŠCHT Praha stále působí. Během let 2017–2021 bohužel tři z těchto profesorek zemřely (prof. J. Moravcová, prof. G. Basařová a prof. A. Králová). Dá se tedy předpokládat, že během dalších 5 let může dojít k významnému poklesu podílu zastoupení žen na pozici profesora.

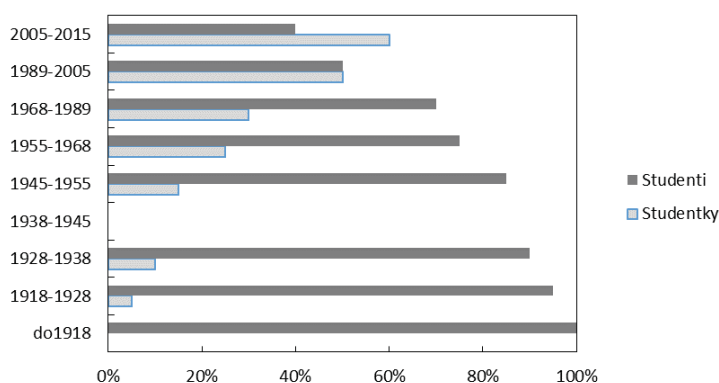
Zde je namístě hledat příčiny této nevyrovnané situace a odstraňovat bariéry pro možnost kariérního růstu žen. Pokud současný trend nezměníme, pomyslné „nůžky“ zastoupení mužů a žen na akademických pozicích se nám ještě více rozevřou. Namísto je podpora ženských talentů, kterých je na VŠCHT Praha bezpochyby dostatek, a motivace talentovaných akademiček, aby usilovaly o získání docentur a profesur. Pozornost by se měla v neposlední řadě zaměřit i na zvýšení podílu žen na všech úrovních vedení VŠCHT Praha, včetně rozhodovacích orgánů. Vždyť za 70 let samostatné existence měla VŠCHT Praha pouze 2 ženy ve funkci děkanky, a to prof. Julii Hamáčkovou v letech 1957–1959 a po dlouhé odmlce působila v letech 2015–2018 na Fakultě chemicko-inženýrské jako děkanka prof. RNDr. Marie Urbanová, CSc.

Následující obr. 1 a 2 názorně ukazují, jak stoupalo zastoupení studentek v průběhu posledních 100 let a jak byly zastoupeny ženy a muži na různých stupních kariéry od studia až k nejvyšším akademickým pozicím¹⁰.

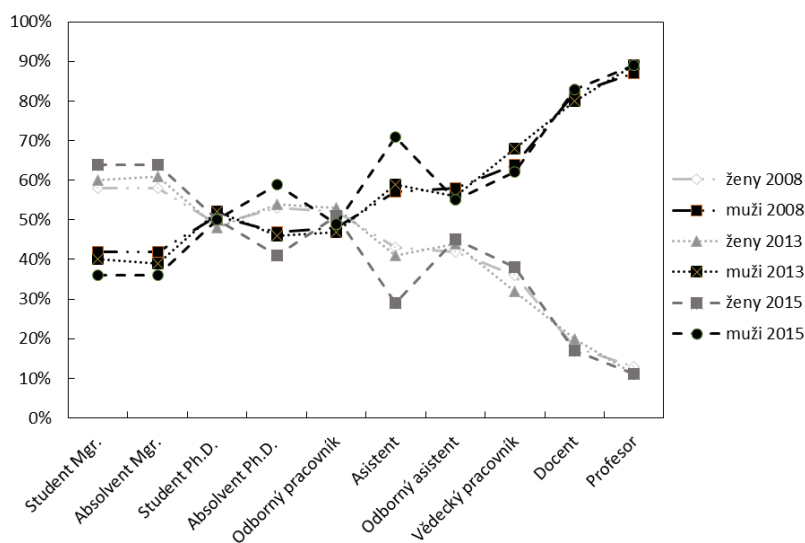
V roce 2014 a 2017 bylo provedeno v rámci projektu TRIGGER statistické šetření, ve kterém byly zjišťovány počty žen a mužů v letech 2008, 2013 a 2015 na různých stupních jejich studijní a kariérní dráhy, od studentů bakalářských, magisterských a doktorských studijních programů ke kariérním stupňům akademickým, od pozice asistent až po pozici profesor. Z obr. 2 je zřetelně vidět obrovský úbytek žen na vyšších akademických pozicích, bohužel tento trend i nadále přetrvává.

3. Významné ženy na VŠCHT Praha

Ukázalo se, že jedním z motivačních nástrojů jak přilákat ženy do výzkumu a vývoje je publikování životních příběhů žen, které i přes různé překážky dosáhly ve vědeckém světě významných úspěchů a dokázaly utvářet, jakým směrem se v daném oboru bude dál věda vyvíjet anebo celý nový obor založit a dále rozvíjet.



Obr. 1. Poměr zastoupení studentů a studentek v průběhu posledních 100 let



Obr. 2. Zastoupení mužů a žen od studentů k nejvyšším akademickým pozicím



Při řešení projektu TRIGGER bylo v letech 2014–2015 uskutečněno dvacet rozhovorů s významnými, úspěšnými, ale i nadějnými a začínajícími ženami vědkyněmi z VŠCHT Praha. Rozhovory byly zaměřeny na popis životní dráhy jednotlivých respondentek a významných okolností, které formovaly jejich další kariérní dráhy. Výpovědi žen byly sepsány do publikace „Hledání dynamické rovnováhy: tři generace výzkumnic na VŠCHT Praha“¹¹, kterou vydalo Vydavatelství VŠCHT Praha na přelomu roku 2015–2016. Jednotlivé příběhy jsou velmi zajímavé a kniha podává i svědectví doby od osamostatnění školy v roce 1952 do současnosti. Následně po této knize byla na základě rozhovorů s dvaceti muži z VŠCHT Praha vydána i kniha „Dynamická rovnováha na dosah? S chemiky z VŠCHT Praha o vědě a rovnosti“, která vyšla v prosinci 2017. Obě knihy lze získat prostřednictvím autorky tohoto článku (gro@vscht.cz), k dispozici jsou i v elektronické verzi v katalogu Vydavatelství VŠCHT Praha <https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog> nebo je možné je zakoupit ve vybraných knihkupectvích např. v Národní technické knihovně v Praze v Dejvicích. Příběhy žen byly též zpracovány do formy plakátové výstavy a najdete je i na webových stránkách <https://gro.vscht.cz/prectete-si/>.

V tomto článku není možné vyjmenovat všechny významné ženy v historii ani ze současnosti VŠCHT Praha a už vůbec ne ty, které jsou jejími absolventkami a prosadily se mimo svou alma mater buď v komerční, veřejné nebo vládní sféře. Zmíníme se alespoň o některých, které pracovaly na VŠCHT Praha.

V letech 2014–2017 působilo na celé VŠCHT Praha 12 profesorek, nejvíc na Fakultě potravinářské a biochemické technologie, uvádím jejich jména, na internetu je možné vyhledat i jejich profily. Byly to: prof. Ing. Gabriela Basařová, DrSc., prof. Ing. Jana Čopíková, CSc., prof. Ing. Alena Čejková, CSc., prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc. prof. Ing. Jana Dostálová, CSc., prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., prof. Ing. Alena Králová, CSc., prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc., prof. RNDr. Olga Valentová, CSc. Bohužel tři z nich již nejsou mezi námi, ale tři další ženy dosáhly této akademické pozice v poslední době, když novými profesorkami byly jmenovány prof. Dr. Ing. Petra Patáková, prof. Ing. Jana Pulkrabová, Ph.D. a prof. Dr. Ing. Michaela Rumlová. Na Fakultě potravinářské a biochemické technologie před rokem 2014 ještě působily:

- Prof. Dr. Ing. Martina Macková, pro obor mikrobiologie (nar. 1965, profesorkou jmenována v roce 2006). Ve velmi mladém věku ji zasáhla zákeřná nemoc, roztroušená skleróza. Navzdory tomuto handicapu

věnovala práci na ústavu veškerou svoji energii a čas. Předáním medaile Emila Votočka *in memoriam* ocenila VŠCHT Praha její celoživotní pedagogickou a vědeckou práci a lidské vlastnosti.

- Prof. Ing. Ludmila Šilhánková, CSc., obor mikrobiologie (nar. 1927, profesorkou jmenována v r. 1991), na VŠCHT Praha působila do roku 1972.
- Prof. Ing. Dr. Zora Šormová, DrSc., obor biochemie (nar. 1915, profesorkou jmenována v roce 1969). Na VŠCHT Praha působila jako externí profesorka do r. 1972.

Na Fakultě chemicko-inženýrské, Ústavu fyziky a měřicí techniky působí stále prof. RNDr. Marie Urbanová, CSc. a prof. RNDr. Drahoslava Janovská, CSc., která působí na Ústavu matematiky.

Na Fakultě technologie ochrany prostředí Ústavu technologie vody a prostředí stále pracuje jako pedagog a členka řešitelského týmu projektu podpořeného z TA ČR prof. Ing. Jana Zábranská, CSc.

Za každou z výše jmenovaných žen profesorek stojí neskutečné množství práce jak pedagogické, tak i v oblasti výzkumu, a to nejen v tuzemsku, ale i v mezinárodním měřítku. Do projektů řešených v rámci výzkumných programů EU se zapojuje nejvíce prof. Hajšlová. Kromě své každodenní práce se profesorky angažují i v různých odborných poradních uskupeních, rozhodovacích orgánech, jsou zapojeny i do dalšího veřejného života mimo VŠCHT a propagují dobré jméno školy i v médiích a na různých akcích pro veřejnost.

Důvodem k zamyšlení je fakt, že Fakulta chemické technologie nemá ve svých řadách ani jednu ženu na pozici profesorky, přitom potenciál žen na této fakultě je významný, od roku 2005 se zde habilitovalo 9 žen. Jednou z příčin může být fakt, že se zde zajišťují přednášky, laboratorní cvičení a zkoušení stovek studentů v bakalářských programech. Velké zásluhy zejména na výuce předmětu Obecná a anorganická chemie I a II je nutno připisat doc. Olze Smrčkové a doc. Dagmar Sýkorové z Ústavu anorganické chemie, obě nedávno odešly do důchodu a v jejich práci dále pokračují doc. Ing. Kateřina Rubešová, PhD. a doc. Ing. Pavla Nekvindová, PhD., na Ústavu organické technologie doc. Ing. Eliška Vyskočilová, PhD. a na Ústavu chemie pevných látek doc. Ing. Barbora Doušová, CSc. O jejím příběhu se dočtete ve výše zmiňované knize rozhovorů. Jistě by si zasloužily v tomto článku zmínku o své přínosné práci i další ženy, bohužel výčet zde není úplný.

Přehled habilitačních řízení a řízení ke jmenování profesorem na celé škole je od roku 2005 veden na webových stránkách Vědy a výzkumu <https://www.vscht.cz/veda-a-vyzkum/habilitace>, kde si zvědavý čtenář může najít jména nových docentů, docentek, profesorů a profesorek.

Ženy se uplatňují i ve vedení školy, funkci prorektorky pro vědu a výzkum zastávala v letech 2004–2007 prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc., která následně kandidovala i na funkci rektorky. Prof. RNDr. Olga Valentová, CSc. zastávala po tři období v letech 2008–2016 funkci předsedkyně Akademického senátu VŠCHT Praha, prof. RNDr. Marie Urbanová, CSc. byla v letech 2015–2018

děkanou Fakulty chemicko-inženýrské. V druhé polovině roku 2021 byla jmenována prorektorkou pro vědu a výzkum prof. Dr. Ing. Michaela Rumlová. Funkci kvestorky zastává již více jak 10 let Ing. Ivana Chválná.

Údaje o dalších ženách, které se v minulosti podílely na vzdělávání studentů/tek a rozvoji školy v oblasti vědy, výzkumu, inovací a tvůrčí činnosti dosud nejsou zpracovány a autorka tohoto článku bude vděčná za jakékoliv informace, které by pomohly k doplnění přehledu významných žen a jejich zásluh na rozvoji nejen VŠCHT Praha ale i oborů, které se vzděláním získaném na této škole souvisí.

Rovněž tak by bylo nejen velmi zajímavé, ale i užitečné mapovat kde se uplatňují absolventky VŠCHT Praha, v jakých oborech a v jakém sektoru, jakých dosáhly úspěchů, kolik práce pro společnost za nimi stojí. Některé příběhy žen jsou zveřejněny na webu oddělení komunikace VŠCHT Praha v rubrice Příběhy úspěšných <https://www.vscht.cz/uspesni>, je to však jen zlomek těch, které během 70leté existence VŠCHT Praha absolvovaly na této škole.

4. „Neviditelné“ významné ženy

Škola by vůbec nemohla existovat, kdyby z ní najednou odešly všechny ženy, které mají vysokoškolské vzdělání v oboru chemie, ale nikde se o nich moc nemluví a nepíše, a které vykonávají zásadní činnosti pro to, aby škola jako celek mohla fungovat. Mnohdy pracují pouze za tarifní mzdy, které zde dnes bohužel nedosahují ani výše zaručené mzdy pro příslušnou kvalifikaci. Kvůli své pracovní náplni nemají třeba možnost věnovat se výzkumu a vývoji a postupovat tak na pomyslném kariérním a mzdovém žebříčku výše. Jde především o pedagogické pracovnice, které např. zajišťují přednášky, semináře a zkoušení v klíčových předmětech prvních ročníků bakalářských studijních programů, do nichž se každoročně zapisují stovky studentů, vedou laboratorní cvičení, starají se o zkvalitňování a inovaci výuky, vytváří nové studijní materiály, v současné pandemické době vymýšlí a zajišťují on-line způsob výuky. Nutno také zmínit ženy, většinou absolventky VŠCHT Praha, které zajišťují chod fakult na jejich děkanátech, na pedagogickém oddělení, rovněž tak na oddělení vědy a výzkumu, v projektovém centru, na zahraničním oddělení, oddělení pro strategii a rozvoj. Nesmíme zapomenout ani na Ústav učitelství a humanitních věd, Ústav jazyků a Ústav ekonomiky a managementu a na servisní pracoviště, jako jsou centrální laboratoře nebo výpočetní centrum. Zcela výjimečnou roli hraje ve fungování školy i Centrum informačních služeb, které založila a vede Ing. Eva Dibuszová, Ph.D. a pod nějž spadá i Vydavatelství VŠCHT Praha, které je ve svém oboru ojedinělé v rámci celé České republiky i Slovenska.

Stále větší váha je kladena i na dobrou prezentaci VŠCHT Praha vůči veřejnosti, středoškolským učitelům a jejich žákům, kteří by se mohli v budoucnosti stát našimi studenty. V širším záběru se dnes snaží škola získávat studenty i ze zahraničí. Široké spektrum popularizačních akcí a dalších aktivit zajišťuje na oddělení komunikace

Ing. Petra Karmetová, Ph.D., která na tomto oddělení pracuje již 20 let. Jako absolventka FCHT zná velmi dobře strukturu a fungování celé školy a hlavně její akademické a vědecké pracovníky a jejich aktivity. V době digitalizace a rozmachu používání sociálních sítí, zejména u mladé generace, je popularizace chemie nutný způsob, jak středoškolákům přiblížit studijní obory a motivovat je k rozhodnutí jít studovat na VŠCHT Praha.

Když srovnáme obsah publikace „Historie výuky chemie, osobnosti a události“, která byla vydána v roce 2002 a podíváme se na strukturu a činnost VŠCHT Praha v roce 2022, zjistíme, že jsme se ocitli nejen v novém století, ale v úplně jiné době, která má díky digitalizaci jiné možnosti, klade na lidi jiné nároky a všude v pracovním procesu dnes hrají významnou roli ženy, které na VŠCHT Praha tvoří téměř polovinu ze všech zaměstnanců a víc jak polovinu ze všech studentů.

Z výše popsaného je zřejmé, že většinu servisních činností včetně výuky studentů v bakalářských programech na VŠCHT Praha zajišťují ženy. Je nasnadě, že je nutno přizpůsobit těmto okolnostem i systémy řízení fakult, rektorátu a prakticky celé školy. Hodnocení výkonu pracovních činností a dosahovaných výsledků by se mělo týkat všech pracovníků, kteří se na chodu školy podílejí. V Akademickém senátu, který je jedním z řídicích orgánů fakult a školy mohou být zastoupeni pouze akademičtí pracovníci a studenti, měli bychom tedy najít způsob, jak by se na řízení školy mohli podílet i odborní neakademičtí pracovníci/ce (vědečtí, servisní), mezi nimiž je velký podíl žen. S tím úzce souvisí i kariérní řád a finanční ohodnocení pracovních pozic, které je poplatné době, kdy vzniklo a v současnosti již neodpovídá realitě, protože nároky kladené na odborné neakademické pracovníky/ce jsou dnes daleko vyšší než v minulosti, např. požadované vysokoškolské vzdělání, znalost dalšího světového jazyka, což je angličtina, umět pracovat s novými technologiemi a hlavně se stále učit něco nového a vymýšlet, jak uplatnit nové postupy ve své činnosti. Umět se přizpůsobovat novým podmínkám je základní pravidlo přežití nejen živých organismů, ale i této školy, aby zůstala i nadále nejvýznamnější institucí svého druhu v Česku a obstála i v mezinárodních žebříčcích. Protože vynikajících vědeckých výsledků dnes nelze dosahovat bez podpory solidního zázemí, zařazení studentů a vědců do výzkumných týmů, využívání kvalitních služeb servisních pracovišť a využívání technické infrastruktury, která v oblasti chemie dosahuje mnohamiliónových hodnot.

5. Ocenění významných přínosů žen, Cena Julie Hamáčkové



Abychom dokázali uznat i zásluhy těch mnohdy „neviditelných“ žen, byla v roce 2015 v souvislosti s řešením projektu TRIGGER ustanovena na VŠCHT nová cena¹² a byla nazvána po první

Tabulka I
Cena Julie Hamáčkové – ocenění v letech 2015–2021

Rok	Kat.	Jméno	Stěžejní přínosy	Fakulta, Ústav
2015	A	Ing. Monika Tomaniová, Ph.D.	Manažerské řízení projektů RP EU a organizace mezinárodní konference RAFA	FPBT, Ústav analýzy potravin a výživy
	B	Cena neudělena		
2016	A	doc. Ing. Pavla Nekvindová, Ph.D.	Modernizace a e-learning výuky bakalářských studentů (anorganická chemie I a II) podíl na výzkumu a vývoji doma i v zahraničí, podíl na patentech	FCHT, Ústav anorganické chemie
	B	Ing. Jitka Svatošová	Vybudování systému mezinárodních mobilit studentů, řízení projektů OP PA, iniciace dětských táborů, a iniciace zřízení předškolního zařízení DK Zkumavka pro děti zaměstnanců	Rektorát, Oddělení pro strategii a rozvoj
2017	A	RNDr. Jana Punčochářová, CSc.	Mimořádná obliba u studentů, dlouholetá praxe, obor ekotoxikologie	FTOP, Ústav chemie ochrany prostředí
	B	Ing. Petr Straka, Ph.D.	Popularizace a organizace akcí pro děti, osobní angažovanost při výstavbě DK Zkumavka pro předškolní děti	FTOP, Ústav technologie ropy a alternativních paliv
2018	A	RNDr. Miroslava Dubcová, Ph.D.,	Oblíbená u studentů, vyučuje pět matematických předmětů, správce počítačové sítě, předsedkyně Akademického senátu fakulty	FCHI, Ústav matematiky
	B	Ing. Anna Mittererová	Řešení projektů s tematikou genderové rovnováhy, iniciace a angažovanost v utváření vyvážené vnitřní kultury na VŠCHT	Rektorát, oddělení pro vědu a výzkum, personální odbor
2019	A	doc. Ing. Lidmila Bartovská, CSc.	Mnoholeté působení, výuka Fyzikální chemie I a II, vychovala už 2 generace, velice činná publikačně, výukové materiály a skripta, vědecké publikace	FCHI, Ústav fyzikální chemie
	B	Cena neudělena		
2020	A	Doc. Ing. Eliška Vyskočilová	Velmi oblíbená studenty, vyučuje i v angličtině, vytváří nové výukové materiály, publikuje výsledky výzkumu, první žena, která se habilitovala v oboru Organická technologie	FCHT, Ústav organické technologie
	B	Dr. Ing. Pavla Šmejkalová	Vyučuje čtyři předměty, oblíbená u studentů, vede laboratoře, program Athens, je knihovnicí, vyučuje studenty jak zohlednit genderové aspekty ve výzkumných pracích podílí se na zabezpečení soutěže o Cenu Julie Hamáčkové v kategorii c)	FTOP, Ústav technologie vody a prostředí
2021	A	Doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D.	Velmi oblíbená studenty, garantka a inovátorka studijních programů, vědeckovýzkumná činnost, tajemnice ústavu, členka Akademického senátu, při „lock-downu“ připravila sérii videoklipů k Laboratořím, připravila poster „Jak fungují vakcíny proti COVID-19“	FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie
	B	Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.	Kromě pedagogiky se věnuje i výzkumné činnosti, např. stanovení RNA SARS-CoV-2 ve vodách, vyučuje studenty jak začleňovat do studentských prací analýzu dle genderu nebo pohlaví, podílí se na zabezpečení soutěže o Cenu Julie Hamáčkové v kategorii c)	FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie

profesorce a děkance Julii Hamáčkové. Cena má tři kategorie, v kategorii A a B jsou každoročně vyhlašovány výzvy na nominace kandidátek z řad zaměstnankyň školy, v kategorii A těch, které zásadně přispěly k rozvoji vědy, výzkumu, pedagogiky, inovací, akademického prostředí školy, a v kategorii B ocenění za podporu a prosazování rovných příležitostí, v této kategorii mohou být nominováni i muži. Kategorie C oceňuje studentské práce, které zohledňují genderové aspekty nebo provádí analýzu dle pohlaví u témat, kde je to relevantní (např. výzkum související s působením chemických látek na lidský organismus a podobně). Na udělení ceny v kategorii A a B bývá vyhlašována výzva na konci každého roku na nominace kandidátek/tů. Rozhodování hodnotící komise o výběru laureátů není vůbec jednoduché. Cena Julie Hamáčkové by měla být udělována těm, kteří leckdy stojí v pozadí, ale jsou důležitým článkem pro fungování ústavu, katedry, školy, podílejí se na utváření pozitivního vnímání a hrají důležitou společenskou úlohu, s důrazem na pedagogiku a činnosti, které člověka tolik neposouvají ve vlastní kariéře, ale udržují a posouvají dopředu chod celého kolektivu, nebo vyššího celku. Pro dokreslení uvádíme jména osob, ze kterého jsou pracoviště a velmi stručnou informaci o tom, za jaké počiny jim byla v minulých letech Cena udělena (tab. I). Bližší informace o Ceně Julie Hamáčkové jsou uveřejněny na webových stránkách <https://gro.vscht.cz/cjh/>.

V tomto výčtu neuvádím kandidátky nominované jejich ústavu na udělení ceny, je mezi nimi celá řada dalších žen, které se těší velké oblibě u studentů a angažují se i v dalších aktivitách např.:

FCHT

- Ing. Petra Ménová, Ph.D., Ústav organické chemie
- Ing. Alena Řezníčková, Ph.D., Ústav inženýrství pevných látek
- Katherine Villa Gómez, Ph.D., Centrum pokročilých funkčních nanorobotů
- Mgr. Yevgeniya Kalachyova, Ph.D., Ústav inženýrství pevných látek

FPBT

- Ing. Eva Vaňková, Ph.D., Ústav biotechnologie

FCHI

- RNDr. Eva Muchová, Ph.D., Ústav fyzikální chemie
- doc. Mgr. Fatima Hassouna, Ph.D., Ústav počítačové a řídicí techniky
- Ing. Hana Soušková, Ph.D., Ústav počítačové a řídicí techniky

Další pracoviště

- Ing. Dana Strachotová, Ph.D., Ústav ekonomiky a managementu
- Ing. Hana Štěpánková, Oddělení pro vědu a výzkum

Na cenu v kategorii B (podpora a prosazování rovných příležitostí) byli nominováni i muži:

- prof. Ing. Pavel Jeníček, CSc., Ústav technologie vody a prostředí
- prof. Ing. František Štěpánek, Ph.D., Ústav chemického inženýrství
- RNDr. Štěpánka Smrčková, Ph.D., Ústav technologie vody a prostředí

6. Výjimečné počiny přesahující rámec VŠCHT Praha

Na závěr je vhodné zmínit dvě ženy, které nejenže přispěly k rozvoji školy, svého oboru, ale které jsou úžasnými morálními vzory pro naše studenty, zaměstnance školy a pro celou naši společnost, a troufnu si podotknout, že o nich ne každý ví.



prof. Ing. Ludmila Šilhánková, CSc.¹³

Narodila se v roce 1927, VŠCHTI absolvovala v r. 1950, po studiích pracovala ve Výzkumném ústavu kvasného průmyslu a v r. 1952 přešla na Fakultu potravinářské a biochemické technologie. Kandidátskou disertační práci zde obhájila roku 1958, habilitovala se v r. 1966. Zejména její práce zaměřené na šlechtění kvasinek pro technologické účely získaly světovou pozornost. Patentovala řadu kmenů a postupů v oblasti produkční mikrobiologie. V době socialistické éry měla řadu nepřátel v tehdejší komunistickém vedení fakulty, přesto nezatrpkla a i přes své tělesné postižení (velmi omezená pohyblivost v důsledku v dětství prodělané obrny) si zachovala optimismus a strhující elán do vědecké



práce. Profesorkou byla jmenována až v r. 1991. I ve vysokém věku neváhala začínat řešit nové aktuální problematiku v oblasti mikrobiologie a kvasinkové genetiky. Žila velice skromným životem a pět let po její smrti se její nejbližší kolegové z ústavu dozvěděli, z Nadace Bona Via, že odkázala 2 200 000 Kč nadaci Olgy Havlové s přáním, aby tyto peníze byly využity na podporu vzdělávání a rekreaci dětí a mladých lidí se zdravotním postižením. Bona Via jí za to udělila *in memoriam* první cenu v kategorii „Závěť pomáhá“. Na webu Výboru dobré vůle Olgy Havlové najdete článek „Jiný způsob, jak pomoci neziskové organizaci“¹⁴, ve kterém vzpomíná na prof. Šilhánkovou na slavnostním večeru předání ceny její žačka a kolegyně prof. Kateřina Demnerová.



Ing. Hana Dvořáková, CSc.¹⁵

Ing. Hana Dvořáková, CSc. (nar. 1954), vystudovala na VŠCHT Praha organickou chemii na FCHT, disertační práci, vzhledem k tehdejšímu politickému poměru, však prováděla a obhajovala v Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV (ÚOCHB) na téma Acyklická analoga nukleosidů a nukleotidů s modifikovanými purinovými basemi. V tomto akademickém ústavu nadále pracovala, od roku 1986 ve skupině prof. Antonína Holého. V roce 1996 přešla na VŠCHT Praha,

kde působí do současnosti v Centrálních laboratořích¹⁶.

Je zakladatelkou Nadace Experientia¹⁷, kterou financuje ze svého podílu na licenčních poplatcích za antivirové látky vyvinuté s profesorem Antonínem Holým na ÚOCHB.



Foto: Předání mimořádné ceny rektora VŠCHT Praha manželům Haně a Dalimilovi Dvořákovým. Archiv VŠCHT Praha

Na tradičním adventním koncertu VŠCHT Praha v Betlémské kapli v pondělí 13. prosince 2021 předal Pavel Matějka mimořádnou cenu rektora VŠCHT Praha manželům Haně a Dalimilovi Dvořákovým za dlouholetou podporu svobodného výzkumu mladých badatelů a studentů v oblasti chemie¹⁸. Oba jsou úzce spjatí s VŠCHT Praha a jsou svým seriózním jednáním a skromným vystupováním vzory pro studenty i mladé výzkumné pracovníky naší školy. Manželé Hana a Dalimil Dvořákoví se před dvěma roky rozhodli vložit zcela ojedinělou částku v historii české filantropie – 200 milionů korun – do Nadace Experientia, která podporuje mladé vědecké talenty. Tato zpráva vyvolala velký společenský ohlas, a to zdaleka nejen mezi vědeckou komunitou. Reakce na mimořádný filantropický počin manželů Dvořákových naplno ukázaly, jak moc tato země potřebuje pozitivní vzory. Jak moc potřebujeme naději spočívající v neokázalém a zároveň autentickém uplatňování ideálů humanity. Manželé Dvořákoví dojali veřejnost svou skromností, lidskostí a tím, s jakou samozřejmostí využili své soukromé peníze nikoliv ke svému obohacení, ale k obohacení české společnosti, resp. světové vědy.

Čtenářům doporučuji přečíst si rozhovory s manželými Dvořákovými v různých médiích např. „Jen stěží jsme vyšli, říká manželé Dvořákoví. Teď mladým vědcům pošlou 200 milionů“ zveřejněný na webu Aktuálně.cz dne 22. 1. 2020 (cit.¹⁹) nebo článek na iDnes.cz „Byli u vývoje léku proti HIV. Netušili, že to z nich udělá mecenáše vědy“²⁰.

7. Závěr

Vysoká škola, která byla ještě před 100 lety pouze mužskou záležitostí, je dnes školou, na které studují děvčata zrovna tak jako chlapci, na které působí řada význam-

ných odbornic ve svém oboru. I přes občasné pochybnosti některých konzervativců je dnes VŠCHT Praha zastoupena řadou významných žen, nemusí být ani profesorky, ale baví je předávat své odborné znalosti dalším generacím, aktivně se zapojovat do projektů vědeckého výzkumu, publikovat, spolupracovat se zahraničními partnery, s průmyslem a s dalšími organizacemi, a hlavně šířit dobré jméno této skvělé vysoké školy doma i v zahraničí.

LITERATURA

1. *Mezinárodní den žen a dívek ve vědě 2021*. <http://www.osn.cz>, staženo 2. 10. 2021.
2. Projekt GA ČR, Transformační procesy po roce 1989 optikou přeměny výzkumných ústavů chemického průmyslu, Sociologický ústav AV ČR, v.v.i., Mgr. Blanka Nyklová, Ph.D. <https://www.soc.cas.cz/projekt/transformacni-procesy-po-roce-1989-optikou-premeny-vyzkumnych-ustavu-chemickeho-prumyslu>, staženo 2. 10. 2021.
3. Projekt 7. RP EU TRIGGER Transforming Institutions by Gendering Contents and Gaining Equality in Research, <http://triggerproject.eu/>, staženo 2. 10. 2021.
4. Projekt MŠMT ČR, program EUPRO II, PEDICEV (<https://eupro.vscht.cz/>) <https://gro.vscht.cz/>, staženo 2. 10. 2021.
5. Mittnerová A.: Czech. Chem. Soc. Symp. Ser. 14, 04-07/09 (2016), <http://www.ccsss.cz/index.php/ccsss/issue/view/9>, staženo 2. 10. 2021.
6. Stoklasa J.: Národní politika, Ročník: 1912 Vý-tisk: 4. 2. 1912, str. 1.
7. Mittnerová A.: Nepitná pitná voda: O prof. Julii Hamáčkové, <https://www.vscht.cz/popularizace/mohlo-by-vas-zajimat/17740/hamackova>, staženo 2. 10. 2021.
8. Schätz M.: Historie výuky chemie, Osobnosti a události, VŠCHT Praha, 2002. https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-80-7080-442-4, staženo 2. 10. 2021.
9. Habilitační řízení a řízení ke jmenování profesorem, webové stránky VŠCHT Praha, Oddělení pro vědu a výzkum, <https://www.vscht.cz/veda-a-vyzkum/habilitace>, staženo 2. 10. 2021.
10. Mittnerová A.: Bulletin Asociace ČSCH, 49 (2) (2018), <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin49/>, staženo 2. 10. 2021.
11. Víznerová H., Nyklová B.: *Hledání dynamické rovnováhy*, <https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog>, staženo 2. 10. 2021.
12. Cena Julie Hamáčkové <https://gro.vscht.cz/cjh>, staženo 2. 10. 2021.
13. Závět' pomáhá, Bona Via https://gro.vscht.cz/aktualne#novinka_detail24772600029625, staženo 2. 10. 2021.
14. Výbor dobré vůle <https://www.vdv.cz/clanky/novinky~2/jiny-zpusob-jak-pomoci-neziskove-organizaci/>, staženo 2. 10. 2021.
15. Dvořáková H.: <https://clab.vscht.cz/nmr/kontakty/>

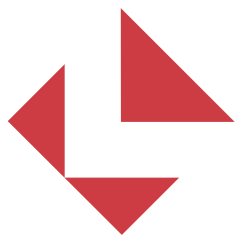
- dvorakova#, staženo 2. 10. 2021.
16. Centrální laboratoře VŠCHT Praha, <https://clab.vscht.cz/nmr>, staženo 2. 10. 2021.
 17. Nadace Experientia <https://www.experientia.cz/o-nadaci/>, staženo 2. 10. 2021.
 18. VŠCHT Praha Ceny rektora 2021 <https://www.vscht.cz/veda-a-vyzkum/ceny-a-souteze/ceny-udelene/ceny-rektora/2021#>, staženo 2. 10. 2021
 19. Aktuálně.cz <https://zpravy.aktualne.cz/domaci/jenstezi-jsme-vysli-rikaji-manzele-dvorakovi/r~76715a7c3c5f11eab259ac1f6b220ee8/>, staženo 2. 10. 2021.
 20. iDnes.cz https://www.idnes.cz/technet/veda/hana-dalimil-dvorak-dvorakova-dvorakovi-mecenas-veda-antonin-holy-hiv-lek-ustav-organicke-chemie-a-b.A180907_122951_veda_mla, staženo 2. 10. 2021.

A. Mittnerová (*University of Chemistry and Technology, Prague*): **The Role and Representation of Women in Chemistry in the Czech Republic, Especially at the University of Chemical Technology Prague**

The article describes the cultural changes of Czech society in the approach to education and the involvement of women in research and pedagogical activities in chemical fields at the University of Chemistry and Technology in Prague over the last 100 years. The achievements of female researchers and academics in the last two decades at this university are reviewed.

Keywords: female researcher, female professor, female student, gender balance, Julie Hamackova Award

- Mittnerová A.: Chem. Listy 116, 187–195 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220187>



LABOREXPO

1.-2. 6. 2022

PVA EXPO PRAHA - LETŇANY

26

27

28

29

30

31

La

Lanthan

B

Bór

O

Kyslík

Re

Rhenium

X

LABOREXPO

P

Fosfor

O

Kyslík

VELETRH
LABORATORNÍ
TECHNIKY JIŽ
PO DESÁTÉ!

KOMPLETNÍ VYBAVENÍ PRO LABORATOŘE

WORKSHOPY A PRODUKTOVÉ PREZENTACE

ANALÝZY VZORKŮ A MOBILNÍ LABORATOŘE

MOŽNOST NAVŠTÍVIT VELETRH VĚDY

ORGANIZÁTOR

CHEMAGAZÍN

MÍSTO
KONÁNÍ

PVA
EXPO PRAHA

WWW.LABOREXPO.CZ



SVEC FELLOWSHIP



Objective

The goal of CASSS Frantisek Svec Fellowships for Innovative Studies is to provide resources to graduate students and post-doctoral researchers so that they may explore and blend a range of possible 'out of the box' or cross-disciplinary training or innovative learning opportunities in the broad fields of biopharmaceutical science and technology – and thereby help build their capacity to be future leaders in biopharmaceutical development. The fellowship honors and embraces the legacy of Frantisek Svec who set a high bar for scientific creativity, excellence, and service during his distinguished scientific career.

Eligibility

Graduate students currently enrolled in a degree-granting program and post-doctoral researchers working in either academic or industrial laboratories studying a discipline relevant to biopharmaceutical sciences are encouraged to apply. The relevant disciplines include protein and nucleic acid therapeutics, vaccines, cell therapy, and gene therapy, etc. – as well as the application of chromatographic and electrophoretic separation methods within the field. The competition for the Svec Fellowships is open to graduate students and post-doctoral fellows worldwide who likewise, may apply to conduct their fellowship anywhere in the world.

Evaluation Criteria

Successful fellowship proposals will request support for *innovative* learning opportunities that *creatively* seek to *expand the scope* of applicants' current activities. The scientific rationale of the proposed project must be clearly and compellingly articulated. Fellowship funds must be applied to academic and scholarly purposes, not commercialization of discoveries of their current research. Examples of suitable activities include (but are not limited to) enrollment in training courses (*e.g.*, a Cold Spring Harbor training course), extended study of a discipline new to the applicant in an academic or industrial laboratory, an internship with a pharmaceutical regulatory agency or health care delivery organization. The proposed project should be realistic in scale – *e.g.*, attend a specialized training program not launch a 6-month research expedition to Antarctica. Applicants should note that the above examples are just that, examples. You are encouraged to think outside the box and design novel learning activities that will both serve your own development and potentially provide models for future training programs.

Applicants may apply for up to \$5,000 to be used to pay enrollment fees, travel, living expenses, and materials that support the objective of the fellowship application. Funds may not be used to pay institutional overhead at the applicants' current institution.

If the proposal includes work or study at another laboratory or institution, a letter of acceptance or permission from the site of the fellowship must be included with the application.

Responsibilities of the successful fellowship awardee

Along with supporting your innovative studies, our goal is to introduce you to the CASSS community of scientists. Each awardee will craft a single page summary of what was accomplished during their fellowship (goals, milestones, what was accomplished or not and why/why not) and provide an accounting of how the funds were spent. We look forward to all awardees must participate (*e.g.* present a poster or talk, co-lead a workshop, or facilitate a round-table, etc.) in a CASSS sponsored conference within 18 months of the conclusion of their project. The fellowship includes waived registration at said conference and reasonable travel and lodging reimbursement (which is not part of the original fellowship award). At the conference, the awardee will be assigned a conference "mentor" who will help introduce the awardee to the CASSS community, be recognized as a Svec Fellowship recipient, and invited to the conference activities such as a speaker networking dinner.

Application process

Completed applications will be submitted as a single pdf file through the CASSS application portal <https://www.casss.org/page/Fellowships>

The application must include a project description (not to exceed two pages) which describes the scientific rationale, how the project is responsive to the program objective, the applicant's qualifications to carry out the project and how the applicant will apply the knowledge gained through completion of the project to her/his future professional activities. In addition to the project description, the applicant should include:

- A two-page *curriculum vitae* detailing degree(s) held or in progress and summarizing related publications, presentations and other relevant information.
- A letter of recommendation from the applicant's direct advisor or supervisor.
- If the recipient plans to spend time in another laboratory, a letter from the responsible individual of the laboratory



Česká společnost chemická, Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
tel.: 221 082 383, redakce tel. 221 082 370
e-mail: chem.spol@csvts.cz
http://www.csch.cz

Členské služby a výhody | Česká společnost chemická

Zapojení v České chemické společnosti, členu Asociace českých chemických společností, EuCheMS, ECTN-A a ČSVTS přináší individuálním chemikům, kromě vlastního členství v největší a nejstarší české profesní organizaci chemiků (zal. 1866):

ROZŠÍŘTE SVÉ KONTAKTY

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCh,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění,...
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC, členové IUPAC dostávají časopis Chemistry International,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),

ZÚČASTNĚTE SE NÁRODNÍCH SJEZDŮ

- možnost zúčastnit se národních sjezdů s významnou slevou pro členy, které jsou pořádány každoročně, jednou na Slovensku jednou v ČR,

ZLEPŠETE SVOJI INFORMOVANOST

- možnost dostávat 4x ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů v tištěné či elektronické podobě,
- možnost dostávat 4x ročně, cestou elektronické pošty, členské upozornění na nejdůležitější události a aktuality,
- volný přístup k členskému magazínu ChemViews (<http://www.chemistryviews.org/>), jehož je ČSCh spoluvlastníkem, a to i na vašem mobilním telefonu apod.,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě,
- informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCh“, kterou po dohodě s PřF UK Praha zřídila ČSCh v Knihovně chemie (sídlicí v budově Hlavova 8/2030, Praha 2, Albertov, přízemí, v místnostech č. 148, 149, 150).

ZAPOJTE SE DO ŘEŠENÍ GRANTŮ EU

- možnost participovat na řešení grantů s evropskými partnery, jako např. ECTN a partnerskými národními společnostmi.

UŠETŘETE PENÍZE

- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCh,
- významnou slevu (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCh spolumajitelem,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCh,
- slevu při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společností AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.

ZDŮRAZNĚTE SVOJI PROFESIONALITU

- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,

BUĎTE VIDĚNI

- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- a řadu dalších služeb, které se teprve sjednávají,

PRO FIRMY A PODNIKATELE

- Firmám, podnikům, institucím a dalším právnickým osobám nabízí ČSCh mimo jiné i tzv. „kolektivní členství“, při kterém se ve vzájemné smlouvě sjedná to, čím mohou pomoci jedna strana druhé. Podrobnosti na dotaz.

OBSAH**ÚVODNÍK**

- Ženy v české chemii** 145
J. Barek

REFERÁTY

- Sub/superkritická fluidní chromatografie pro analýzu chirálních sloučenin** 146
K. Kalíková, D. Folprechtová a Z. Kadlecová
- Od 5-azapyrimidinové chemie k thiadiazolům** 152
M. Krečmerová
- Nová role hemu ve zdraví a nemoci – hemové senzorové proteiny** 163
M. Martínková
- Využití 3D-lipidových matic pro začlenění a stabilizaci biologicky aktivních molekul** 172
M. Zatloukalová
- Multiresponzivní polymerní kontrastní činidla pro ¹⁹F MRI na bázi poly[*n*-(2,2-difluorethyl)akrylamidu]** 180
K. Kolouchová a O. Groborz
- Role a zastoupení žen v české chemii, zejména na VŠCHT Praha** 187
A. Mittnerová

CONTENTS**EDITORIAL**

- Women in Czech Chemistry** 145
J. Barek

REVIEW ARTICLES

- Sub/supercritical Fluid Chromatography for Chiral Compounds Analysis** 146
K. Kalíková, D. Folprechtová, and Z. Kadlecová
- From 5-Azapyrimidine Chemistry to Thiadiazoles** 152
M. Krečmerová
- The Novel Role of Heme in Health and Diseases – Heme-Containing Sensor Proteins** 163
M. Martínková
- 3D Lipidic Matrix for Incorporation and Stabilization of Biologically Active Molecules** 172
M. Zatloukalová
- Multiresponsive Polymer Tracers for ¹⁹F MRI Based on Poly[*N*-(2,2-difluoroethyl) Acrylamide]** 180
K. Kolouchová and O. Groborz
- The Role and Representation of Women in Chemistry in the Czech Republic, Especially at the University of Chemical Technology Prague** 187
A. Mittnerová

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 116 (2022), čís./no. 3 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 146, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 132 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUČÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, V. Šimánek, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2022 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2022 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: V. Spiwok • Dáno do tisku 28.2.2022.



Švýcarský nůž analytiky

Inspirovaný věrností a spolehlivostí – to je nová éra SFC

Superkritický fluidní chromatografický systém Nexera UC je dostupný v různých konfiguracích tak, aby poskytoval aplikačně specifické řešení zákazníkům ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Unikátní hardwarové inovace zaručují spolehlivou a stabilní analýzu, kterou lze získat ideální nástroj pro náročné separace vzorků. Díky spojení specifické MS detekce a všestrannosti SFC dosáhne tento systém nejvyšší možné citlivosti.

Bezprecedentní stabilita tlaku zajistí přesná a reprodukovatelná data

pomocí unikátního nízko-objemového regulátoru zpětného tlaku

Rychlejší průtoky, vyšší výkon a nižší náklady na analýzu

díky nízko-viskózní mobilní fázi, která je nejvíce přátelská k životnímu prostředí

Automatizovaný proces vytváření metod pro LC nebo SFC testování

Kombinace se superkritickou fluidní extrakcí spojuje rychlou a jednoduchou přípravu vzorku s nejmodernější chromatografickou analýzou a vysokocitlivostní detekcí





MERCK

streamline laboratory labeling

New: MilliSentials™ Lab Labeling System

Are you using yesterday's tools for tomorrow's research?

The MilliSentials Lab Labeling System provides a complete laboratory labeling solution with laboratory grade labels, a compact WIFI capable printer, and custom-designed laboratory labeling software. The MilliSentials Lab Labeling System offers a complete labeling system specifically designed for the laboratory.



SigmaAldrich.com/MilliSentials

© 2022 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved. Merck, the vibrant M and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

The life science business
of Merck operates as
MilliporeSigma in the
U.S. and Canada.

Millipore®

Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products