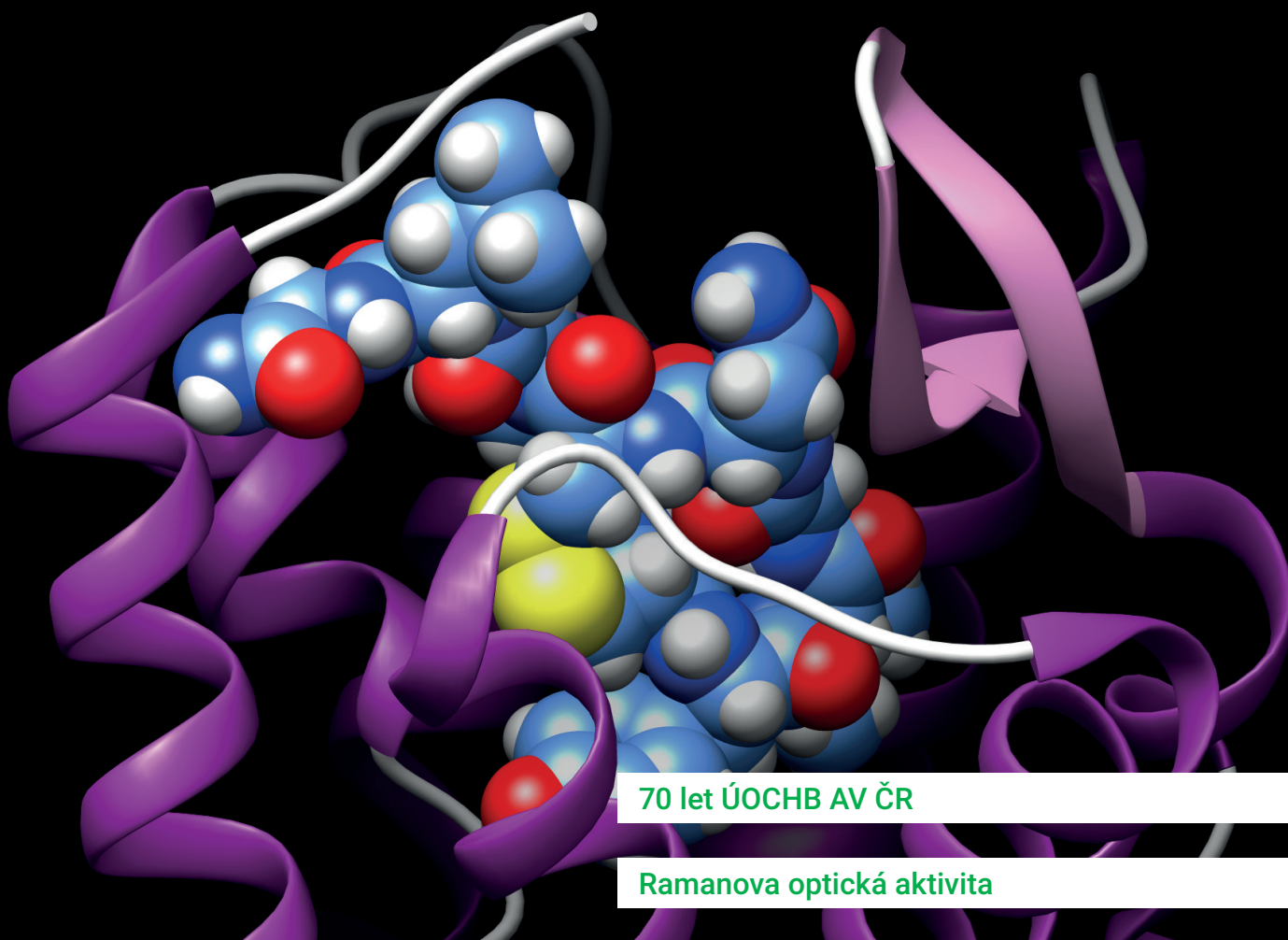


Chemické Listy

12

ročník • 117



70 let ÚOCHB AV ČR

Ramanova optická aktivita

Peptid uvolňující prolaktin

Permeační testy ve farmacii

Strukturní biologie v antivirovém výzkumu



Jubilejní minisymposium k 70. výročí založení ÚOCHB

V letošním roce si Ústav organické chemie a biochemie (ÚOCHB) připomíná 70 let od svého založení. Jeho historie se začala psát po druhé světové válce na Fakultě chemické Českého vysokého učení technického v Praze. Tehdy se kolem prof. Františka Šorma zformovala skupina vědců, která se v roce 1951 přestěhovala do budovy na Flemingově náměstí, sídla nově vytvořeného Ústředního ústavu chemického. V neoklasicistní budově projektované pro zemědělský výzkum se natrvalo zabydlela chemie. Chemický ústav se 1. ledna 1953 začlenil do nově vzniklé Československé akademie věd pod názvem Ústav organické chemie ČSAV. Toto datum je dnes považováno za den vzniku ÚOCHB.

Ve středu 8. listopadu se v rámci letošních oslav 70. výročí založení ÚOCHB uskutečnilo Jubilejní minisymposium, které připomnělo důležité momenty ze života ústavu. Vzpomínkové přednášky si do hlavního sálu ÚOCHB přišlo poslechnout mnoho bývalých i současných zaměstnanců a návštěvníků z řad veřejnosti. Programem, který naplnil celé odpoledne, provázela tisková mluvčí ÚOCHB Veronika Sedláčková.

Účastníky minisymposia přivítal ředitel ÚOCHB prof. Jan Konvalinka. Úvodní přednáška Dr. Marcely Krečmerové byla věnovaná chemii nukleosidů – výzkumnému tématu, které se v ÚOCHB rozvíjí již od prvních let po jeho založení a které nejvíce přispělo k slávě a prosperitě tohoto ústavu. Výzkum nukleových kyselin a jejich složek inicioval František Šorm, na jehož práci v 60. letech úspěšně navázal Dr. Alois Piskala. Příběh tohoto vědce zůstává veřejnosti téměř neznámý, třebaže se jedná o objevitele mimořádně účinných 5-aza analogů pyrimidinových bází, které dodnes pomáhají při léčbě onemocnění krve tvorby. Dosud největším úspěchem ÚOCHB je bezesporu vývoj acyklických nukleosidfosfonátů, které byly poprvé popsány prof. Antonínem Holým a belgickým virologem Erikem De Clercqem v roce 1986. Tyto sloučeniny představují významnou skupinu léčiv, která se uplatňují při léčbě různých onemocnění virového původu. Několik látek tohoto typu ze skupiny Antonína Holého bylo uvedeno na trh americkou firmou Gilead Sciences. Mezi tyto látky patří i tenofovir, který je veleúspěšným preparátem pro prevenci a léčbu HIV/AIDS a slouží také k léčbě chronické hepatitidy B. Výzkum chemie nukleosidů a nukleotidů v ÚOCHB úspěšně pokračuje i dnes. Další přednáška Jubilejního minisymposia byla věnovaná dvěma důležitým spektrálními technikám sloužícím ke strukturální charakterizaci organických sloučenin. Historii hmotnostní spektrometrie (MS) a spektroskopie jaderné magnetické rezonance (NMR) v ÚOCHB shrnuli ve svých příspěvcích doc. Josef Cvačka a doc. Martin Dračinský. Zmíněné techniky se v ústavu začaly rozvíjet na počátku šedesátých let

a ÚOCHB dodnes patří mezi důležitá centra těchto metod u nás. Následovala přednáška o počátcích a rozvoji chemie steroidních látek v ÚOCHB. Prof. Pavel Kočovský ukázal významné milníky v chemii steroidních skeletů a připomenul cílenou syntézu mnoha zajímavých látek, např. strofanthidinu, estronu, kančího feromonu nebo analogu brassinolidu triolonu, který je dnes komerčně dostupný jako stimulant růstu rostlin. Přednášku doplněnou řadou fotografií a osobních vzpomínek uzavřel zmínkou o současném výzkumu neurosteroidů. Další dvě přednášky Jubilejního minisymposia se uskutečnily prostřednictvím vzdáleného připojení ze Spojených států. Dr. Michal Lébl připomenul dlouholetý výzkum peptidů v ÚOCHB přednáškou nazvanou „Úspěchy a promrhané šance peptidové chemie“. Zmínil příběh prof. Josefa Rudingera, talentovaného vedoucího skupiny peptidů, který usiloval o chemickou syntézu biologicky aktivních hormonů. Josef Rudinger byl blízko syntézy oxytocinu, nicméně americký biochemik Vincent du Vigneaud byl rychlejší a v roce 1955 získal za první syntézu polypeptidového hormonu Nobelovu cenu. Josef Rudinger se svým týmem později vyvinul metodu pro průmyslovou výrobu oxytocinu, kterou v roce 1958 zahájila společnost Léčiva. Syntézou, biologickými účinky a fyzikálně-chemickými vlastnostmi hormonů produkovaných neurohypofýzou se pak dále zabývala řada skvělých vědců v ÚOCHB. Ve druhé přednášce přenesené do konferenčního sálu z USA se Dr. Peter Štrop ohlédl za počátky strukturální biologie v ÚOCHB a Ústavu molekulární genetiky (ÚMG). Představil první snahy o pokroky v technikách a disciplínách, které dnes umožňují studovat strukturu proteinů a objasňovat jejich funkce v důležitých biologických procesech. Řeč byla o prvotních snahách produkovat rekombinantní proteiny pomocí izolovaných a syntetických genů, prvních proteinech syntetizovaných na pevné fázi, počátcích značení proteinů a molekulovém modelování i o prvních proteinových strukturách vyřešených pomocí NMR a rentgenové krystalografie. V přednášce zavzpomínal na vynikající výzkumníky a vědce, kteří u počátků strukturální biologie v ÚOCHB a ÚMG stáli. V předposlední přednášce minisymposia připomněla prof. Irena Valterová další z hlavních výzkumných směrů, a to přírodní látky. Nejprve hovořila o výzkumu rostlinných terpenických látek. Důležitým objevem bylo odhalení protizánětlivých účinků azulenu, chamazulenu a jejich derivátů, které vedlo k patentování a komercializaci Dermazulenu, léčivé masti na popáleniny a kožní poranění. Koncem šedesátých let se v ÚOCHB začal rozvíjet výzkum hmyzích hormonů. Pozornost se soustředila na analogy juvenilního hormonu, který byl znám od třicátých let jako látka regulující vývoj hmyzu. Výchozí strukturou pro mnoho juvenoidů syntetizovaných v ÚOCHB byl juvabion – první analog juvenilního hormonu objevený Dr. Karlem Slámou v papíru vyrobeném ze dřeva jedle balzámové. Později se začala řešit i výzkumná témata

související s chemickou komunikací hmyzu. Chemii společenského hmyzu se ÚOCHB věnuje dodnes. Jubilejní minisymposium vyvrcholilo přednáškou doc. Martina France, který se za minulostí ÚOCHB ohlédl očima nezávislého historika. Jeho přednáška nazvaná „Velkolepá vize Františka Šorma a její realizace. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v proměnách času“ připomněla historii ústavu prostřednictvím osudů a osobnosti Františka Šorma, otce zakladatele ÚOCHB. František Šorm byl představen jako mimořádný vědec se skvělými organizačními schopnostmi, který se snažil budovat ÚOCHB jako respektované centrum vědeckého výzkumu s důrazem na praktickou využitelnost vědeckých výsledků. František Šorm současně zastával řadu vrcholných funkcí včetně předsedy ČSAV, člena Ústředního výboru Komunistické

strany Československa a poslance Národního shromáždění ČSSR. V roce 1968 hlasoval proti vstupu vojsk Varšavské smlouvy na území Československa a politické důsledky na sebe nenechaly dlouho čekat. Byl zbaven vedení ÚOCHB, funkce předsedy ČSAV a později, po dosažení 60 let, musel odejít do penze. Základní směřování ústavu však zůstalo zachováno a ÚOCHB dodnes těží z odkazu Františka Šorma.

Jubilejní minisymposium bylo příjemným a zajímavým vzpomínáním na doby minulé a snad i inspirací pro další generace vědců a výzkumníků. Přejme ÚOCHB mnoho dalších úspěšných let!

Josef Cvačka



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

Čestné členství České společnosti chemické za příkladnou reprezentaci české chemie a biochemie na mezinárodním i vnitrostátním fóru bylo uděleno RNDr. PhDr. Zdeňkovi Hostomskému, CSc., dr.h.c.

Dr. Hostomský je špičkovým mezinárodně uznávaným biochemikem a vynikajícím odborníkem v oblasti vývoje nových léčiv. Je autorem více než 90 publikací s více než 4800 citacemi bez autocitací, H-index 34. Vystudoval biochemii na Přírodovědecké fakultě a později dějiny filosofie na Filozofické fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Po skončení vojenské služby působil v Ústavu molekulární genetiky ČSAV, mj. v laboratoři Václava Pačese, zaměřující se v té době na technologie sekvenování DNA. V roce 1983 obhájil kandidátskou práci „Sekvenční analýza genomu bakteriofágů PZA, $\phi 15$ a $\phi 29$ “ a získal titul CSc. Během své aspirantury (tehdejší formě dnešního doktorského studia) se začal zajímat o postupy syntézy oligonukleotidů a jejich možností při konstrukci syntetických genů a úzce spolupracoval se skupinou Jiřího Smrta z Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV. Jejich spolupráce vyústila v syntetický gen kódující proenkefalin. V roce 1985 odjel do Spojených států amerických na roční stáž v Kalifornském technologickém institutu (Caltech). Po návratu do Prahy pak i s rodinou v roce 1987 emigroval zpět do Kalifornie. Připojil se k biotechnologické společnosti Agouron Pharmaceuticals zaměřené na racionální vývoj léčiv na základě znalosti struktur cílových proteinů. V roce 2000 se stal výkonným ředitelem ve Výzkumném centru rakoviny firmy Pfizer, kde se soustředil na onkologický výzkum. Několik z jeho projektů vyústilo v léčiva schválená americkou a později i evropskou lékovou agenturou: jedním z nich je nelfinavir (Viracept), jeden z prvních inhibitorů proteasy z viru HIV, účinných v boji proti AIDS, dodnes používaný v léčbě AIDS u dětí; dalším je celá třída protinádorových léčiv, tzv. PAARP inhibitorů (jako je rucaparib (Rubraca)). V roce 2012 se stal sedmým ředitelem Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB) AV ČR a tuto funkci vykonával až do roku 2022. V současné době je zástupcem ředitele ÚOCHB pro mezinárodní vztahy a hlavním řešitelem a vědeckým koordinátorem Národního institutu virologie a bakteriologie v rámci projektu Exceles NPO financovaného Evropskou unií.

Při svém působení jak v zahraničí, tak i v ČR příkladným způsobem reprezentoval českou chemii a biochemii a velmi účinně a efektivně podporoval aktivity České společnosti chemické v oblasti mezinárodní spolupráce, organizace nej-různějších vědeckých akcí, konferencí a kongresů i v oblasti vydávání časopisu Chemické listy.

Vzhledem k mimořádným kvalitám a významné roli Dr. Hostomského při reprezentaci české chemie na mezinárodním i vnitrostátním fóru mu bylo uděleno Čestné členství České společnosti chemické. K předání příslušného diplomu došlo na mimořádně kvalitní mezinárodní konferenci věnované 70. výročí založení ÚOCHB, který patří beze sporu k našim špičkovým vědeckým ústavům. Necítím se povolán hodnotit tento vynikající ústav a jeho mezinárodně uznávané výstupy, avšak musím jednoznačně konstatovat, že málokterá česká instituce tolik přispěla k dobrému vnímání chemie jako vědecké disciplíny širokými vrstvami naší populace a k popularizaci chemie zejména mezi naší mládeží. A s radostí mohu konstatovat, že vynikajících výsledků se tomuto ústavu daří dosahovat i díky náročné, ale férové a přátelské atmosféře, k níž Zdeněk Hostomský významnou měrou přispěl a přispívá. A tak rád blahopřeji Zdeňkovi k tomuto prestižnímu ocenění, ústavu k jeho 70. výročí a všem jeho zaměstnancům přeji radost z další práce pro českou chemii a biochemii a držím jim palce, aby si i v dnešní složité době dokázali udržet přátelskou atmosféru, která je tím nejlepším katalyzátorem vědeckých úspěchů. A poděkovat celému ÚOCHB za jeho vydatnou podporu všech aktivit České společnosti chemické, jejímž praktickým vyjádřením jsou i články v tomto čísle našeho časopisu, které reprezentují sice jenom malou, ale dle mého názoru velmi zajímavou část vědeckých aktivit ÚOCHB.



Jiří Barek

Předseda Odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

**Redaktor časopisu Chemické listy
prof. Ing. František Švec, DrSc.
z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy
v Hradci Králové získal Cenu Neuron 2023
za celoživotní přínos vědě v oboru chemie**

Prof. Ing. František Švec, DrSc. absolvoval inženýrské studium v oboru chemie makromolekulárních látek na VŠCHT Praha v roce 1965, v roce 1969 získal titul CSc. (dnešní ekvivalent Ph.D.) na téže škole a v témže oboru a v roce 1987 získal titul DrSc. na Ústavu makromolekulární chemie tehdejší ČSAV. V letech 1969–1976 působil jako asistent na VŠCHT Praha, v letech 1976–1992 na Ústavu makromolekulární chemie ČSAV a později AV ČR v Praze. V letech 1992–1996 působil na Cornell University, Ithaka, NY, USA, a v letech 1997–2014 na University of California, Berkeley, CA, USA, kde v letech 2005–2014 zastával prestižní funkci ředitele oddělení v nanotechnologickém ústavu Molecular Foundry v Lawrence Berkeley National Laboratory. Současně působil jako hostující profesor na Univerzitě v Innsbrucku (2003–2006), Beijing University of Chemical Technology (2013–2017) a Gwangju Institute of Science and Technology (2013–2017). Od roku 2017 dosud působí na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, nejprve jako Klíčový zahraniční vědecký pracovník a nyní jako vědecký pracovník. Je vedoucím redaktorem prestižního časopisu *Journal of Separation Science*, časopisu *Separation Science Plus* a členem redakční rady mnoha významných mezinárodních časopisů z oblasti separačních věd. Je nositelem řady významných ocenění (např. Dr.H.C. z Umeå University, Švédsko, ACS Award in Chromatography, zlatá medaile A. J. P. Martina od UK Chromatographic Society, zlatá medaile Univerzity Karlovy atp.).

Mimořádně rozmanitá vědecká činnost prof. Švece zahrnuje vývoj nových separačních médií v různých tvarech a formátech pro různé separační módy např. v proteomice či metabolomice, pro porézní polymerní monolitické kolony, mikrofluidní a kapilární systémy a různé membránové techniky. Je autorem více než 500 publikací, 80 přehledových referátů či kapitol v monografiích, 3 monografií a 75 patentů. Je nejcitovanějším vědcem na Univerzitě Karlově a jedním z nejcitovanějších českých vědců (více než 36 000 citací, H-index 106). Přednesl stovky pozvaných přednášek ve více než 50 zemích. Navíc je vynikajícím učitelem a propagátorem moderních separačních metod. Rozhovor s ním

v časopise Univerzity Karlovy FORUM výstižně charakterizuje osobnost nového laureáta i jeho názory a postoje a rozhodně stojí za přečtení (<https://www.ukforum.cz/en/uk-forum/9000-v-cesku-se-neuci-jak-napsat-kvalitni-odborny-clanek-rika-nejcitovanejsi-vedec-uk>).

Znám profesora Švece osobně již více než 35 let a po celou tuto dobu příkladně reprezentoval českou chemii na mezinárodním fóru, vždy ochotně a úspěšně pomáhal při rozvíjení spolupráce českých chemiků s významnými institucemi, kde pracoval či které reprezentoval. Zvláště bych chtěl zdůraznit jeho všestrannou podporu mezinárodním aktivitám České společnosti chemické zejména v oblasti analytické chemie a jeho aktivní práci v časopise *Chemické listy* i v době, kdy se řada kolegů vyhýbá publikování v českém jazyce a jeho kultivování a udržování. V mých očích je to jasný důkaz, že chemici s nepochybnitelným odborným kreditem se rozhodně nemusí bát publikovat v *Chemických listech* a naopak je k tomu tímto veřejně vyzývám.

Podle mého názoru všechny výše uvedené skutečnosti jasně dokazují, že prof. Švec si Cenu Neuron 2023 v plné míře zasloužil.

Je mou milou povinností poblahopřát na tomto místě také **prof. Ing. Michalu Holčápkovi, Ph.D.** z Katedry analytické chemie Fakulty chemické technologie Univerzity Pardubice, který získal prestižní Cenu Neuron 2023 za propojení vědy a byznysu za úspěšný transfer vědeckého patentu do komerčního světa a založení spin-off společnosti **Lipidica** orientované na komerční realizaci jeho nápadu, jak z jedné kapky krve detegovat rakovinu slinivky.

Jako předsedu Odborné skupiny analytické chemie České společnosti chemické mě opravdu těší, že tato dvě špičková ocenění šla letos do oblasti analytické chemie, která si to nepochybně zaslouží stejně jako oba vynikající laureáti.

A v neposlední řadě chci poděkovat nadaci Neuron (<https://www.nfneuron.cz>) za podporu vynikajících chemiků působících v naší republice. Tato neobyčejně záslužná aktivita nepochybně zvyšuje prestiž vědy v našem státě a vzbuzuje zájem mladé generace o přírodní i technické vědy, což je podle mého názoru to nejdůležitější, co musíme dělat, chceme-li, aby náš stát měl odpovídající postavení v těchto oblastech. Náš časopis se rozhodně vrátí ke všem oceněným z oblasti chemie a k jejich vynikajícím výsledkům.

Jiří Barek

Předseda Odborné skupiny analytické chemie
České společnosti chemické



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

Šormiáda

Pro mnoho lidí, našich i cizinců, ústav Na cvičišti, později na Flemingově náměstí, byl především akademik Šorm, který se od roku 1962 stal předsedou Československé akademie věd a v této funkci zůstal až do roku 1969. Já jsem akademika Šorma poprvé viděl koncem roku 1957, kdy mě k němu na pohovor poslal můj školitel docent Horák. Ten o této příležitosti řekl i absolventovi naší fakulty, Luboši Stárkovi, a tak jsme v předpokojí čekali dva. Šorm si pro oddělení steroidů vybral mě, neměl bych na to ale být nezaslouženě pyšný: Šorm věděl, že často první zaměstnání nastává adepty normy chování, které pak je těžké překonávat. Mimochodem, ten neúspěšný kandidát byl už tou dobou zaměstnancem Výzkumného ústavu endokrinologického, který později vedl jako jeho ředitel.

Já jsem přišel rovnou z univerzity, a univerzity vždy byly prostředím nejvyš demokratickým. Proto mě překvapovalo, jakou úctu k němu projevovali mí noví šéfové, vedoucí oddělení Dr. Černý a jeho zástupce Ing. Fajkoš, oba doktoři věd. Mluvili o něm a titulovali ho jako Profesora. Přicházel do každého týmu aspoň jednou týdně a vždy se ptal na experimentální pokroky minulého týdne. Jakmile laborantky zpozorovaly, že přišel Šéf, začaly hořečně utírat prach. Sám jsem zažil, že při zkoušení jednou zpozoroval zaprášený kousek mého stolu. Stačilo, že ho jen štitivě prstem setřel a příště už jsem si dával na čistotu větší pozor.

Dr. Černý zval Šorma na oslavy oddělení při kulatých výročí, tedy při sepsání 50., 100. a 150. publikace. Přicházel rád a dokázal se přirozeně veselit. Jednou někdo na mejdan přinesl právě čerstvě módní hula-hup. Vzpomínám si, jak se jako všichni ostatní snažil udržet kruh hula-hupu v ideální poloze, ale na jeho kulatém bříšku kruh nevydržel víc než čtyři otočky. Neúspěch ho ale přesto neodradil a se smíchem to zkoušel znova a znova.

Já jsem jako začátečník byl přidělen ke končícímu aspirantu s tím, že později budu pokračovat v jeho projektu. V té době si Šorm uvědomil, že k zatím nedostupným kortikoidům může vést nejen totální syntéza, ale že mohou být připraveny i parciální syntézou z jiných 18-substituovaných látek: tedy z alkaloidů rodu Holarrhena anti-dysenterica. Tak nechal objednat suchou kůru Holarrhena, a to rovnou 900 kg! Kde se ale takové množství může vü-

bec extrahovat? Díky své pozici Šorm snadno zorganizoval můj pobyt v továrně Galeny v Komárově u Opavy, kde jsem extrakci provedl s pomocí tamního personálu. Mým úkolem bylo uhlídat obsluhu ve dvou směnách, aby zahušťování extraktu termolabilních alkaloidů neurychlovala zvýšením teploty. Separaci kyslíkatých a bezkyslíkatých alkaloidů jsem pak realizoval v poloprovozu vysočanského Výzkumného ústavu léčivých rostlin. Nakonec jsem získal asi kilogram kyslíkatých alkaloidů, z nichž kolega Lábler izoloval holarrhimin a jeho deriváty. A z petroletherové frakce jsem já po methylaci získal 3,5 kg krásně krystalického bílého konessinu. Ještě mám pár gramů schovaných. Tyto suroviny jsme pak používali delší dobu pro přípravu 18-substituovaných analog steroidních hormonů. Jeden z mých produktů jsme na biologické testy poslali firmě Smith, Kline and French. Za 2 g látky jsme získali 2000 US \$. Ústav mi pak za ně dal zvláštní odměnu – 360 Kčs! To bylo radosti!

V Šormově životě kritickou roli sehrál rok 1968. Šorm jako člen parlamentu hlasoval proti stálému umístění okupačních vojsk v republice. Takových lidí bylo jen pár a účinek byl téměř okamžitý: třebaže podle stanov akademik nemohl být své funkce doživotně zbaven, Šorma sesadili a směl pracovat už jen jako důchodce na našem ústavu. Seděl v maličké kanceláři Dr. Herouta, kde jsem ho jednou navštívil a požádal o podpis na svém novém rukopise. Vysvětlil mi, že bude lepší, když jeho jméno na mé publikaci nebude.

Poslechl jsem, ale stejně to moc nepomohlo. Nakonec jsem si vysloužil dlouhý pohovor v budově nynější Komerní banky vedle Prašné brány. Tenkrát to ovšem nebyla banka a z těch pohovorů rozhodně neodcházeli účastníci s úsměvem na rtech. Naopak.

A Šormova rodina? Šormův syn měl umělecké ambice, chtěl být sochařem. V té době ale nejdřív musel projít jiným přijímacím řízením, v němž hlavní otázkou byla role akademika Šorma. Mladý Šorm neprošel, nebyl totiž schopen pochopit, že měl svého otce označit za nepřítele státu. Opakovaně.

Rok 1968 byl příležitostí, mnozí bývali kolegové toho využili, ale do Prahy se dnes už vrací jen na návštěvu. Škoda.

Alexander Kasal,
ÚOCHB AV ČR



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

ROZMANITOST SPEKTROSKOPIE RAMANOVY OPTICKÉ AKTIVITY

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

PETR BOUŘ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika
bour@uochb.cas.cz

Došlo 18.8.23, přijato 10.10.23.

Spektroskopie Ramanovy optické aktivity (ROA) je poměrně vzácná vzhledem k experimentální náročnosti a často pracné interpretaci spekter. Přesto se neustále rozvíjí a v poslední desetiletí výzkum v tomto směru přinesl podstatné zdokonalení experimentálních a teoretických metod. S tím bylo získáno mnoho nových poznatků o struktuře a chování molekul a jejich interakcích se světlem. V článku se pokusíme podat stručný přehled našich i obecných zkušeností s touto metodou. Ukazuje se, že ROA spektroskopie poskytuje unikátní informace o molekulách, je vhodná nejen ke stanovení absolutní konfigurace molekul, ale i jejich optické čistoty, zkoumání konformačních stavů a elektronové struktury.

Klíčová slova: Ramanova optická aktivita, rezonance, cirkulárně-polarizovaná luminiscence, simulace spekter

Obsah

1. Úvod, historie
2. Fyzikální principy a souvislosti Ramanovy optické aktivity
3. Příklady nerezonanční spektroskopie
4. Magnetická rezonanční měření v plynech
5. Chirální rozptyl v kombinaci s povrchovým Ramanovým zesílením
6. Rezonanční Ramanova optická aktivita a interference s cirkulárním dichroismem
7. Cirkulárně polarizovaná luminiscence
8. Závěr

1. Úvod

Úvahy o optické aktivitě, rozdílném chování pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného světla v chirálním prostředí, se v souvislosti s Ramanovým rozptylem objevily krátce po jeho objevení^{1,2}. První pokusy s optickými izomery molekul ale nebyly úspěšné, výsledky se zpravidla ukázaly jako nereprodukovatelné, vysvětlitelné chybami, artefakty měření³⁻⁵. Dnes víme, že Ramanova optická aktivita (ROA) pravděpodobně ani nebyla tehdejšími přístroji zachytilná.

„Moderní“ ROA spektroskopie se zrodila v 60. letech 20. století, nejprve ve formě důkladných teoretických úvah^{6,7}. Ale ani v následujících letech nebyly experimentální pokroky přímočaré, a „výsledky“ byly záhy připsány nepřesnostem přístrojů^{8,9}. Za první ROA spektra se považují data z roku 1973 pro 1-fenylethanol a 1-fenylethylamin¹⁰.



Prof. RNDr. Petr Bouř, DSc. studoval Matematicko-fyzikální fakultu Univerzity Karlovy v Praze, titul CSc. získal na ÚOCHB v roce 1993. Absolvoval vědecké stáže v USA, Kanadě a Norsku, zabývá se teorií a experimentální metodologií související s optickou spektroskopií. V současné době je vedoucím skupiny Biomolekulární spektroskopie na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, a profesorem na Ústavu analytické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Publikoval 240 prací v odborných časopisech.

Metoda se dlouhou dobu držela v několika specializovaných laboratořích (např. prof. Barrona (Glasgow)¹¹, Nafieho (Syracuse)¹² a Huga (Freiburg)¹³). W. Hug je také považován za „otce“ prvního komerčního ROA spektrometru firmy Biotoools, dostupného zhruba od roku 2005. Částečně vlivem historických náhod, například osobních kontaktů s dalším průkopníkem vibrační optické aktivity, prof. Keiderlingem (Chicago), se metoda relativně brzy objevila i v Praze na Univerzitě Karlově¹⁴, poté na Vysoké škole chemicko-technologické¹⁵, Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR¹⁶ a Univerzitě Palackého v Olomouci¹⁷.

V České republice je proto výzkum v tomto směru relativně „předimenzován“ (ROA se ovšem stala rychle populární i v jiných zemích, např. v Polsku, Belgii nebo Japonsku). Jeden ze světových odborníků na experimentální aspekty ROA, J. Kapitán (Univerzita Palackého, Olomouc), dokonce v současnosti vyvíjí se svými spolupracovníky vlastní komerční verzi ROA spektrometru¹⁷.

Během času si tato spektroskopie našla uplatnění zejména při studiu „biomolekul“, jako jsou cukry, peptidy, bílkoviny, nukleotidy a nukleové kyseliny¹². Velkou pozornost vzbudilo i určení absolutní konfigurace bromchlorfluormethanu¹⁸. Příkladem unikátní informace, kterou je možné získat pouze touto metodou, je analýza konformačního chování deuterovaného neopentanu (2,2-dimethylpropan)¹⁹. Objevily se různé „odrůdy“ experimentů, jako ROA zesílená na kovových površích^{20,21}, vzbuzená agregací karotenoidů²², indukovaná aplikací magnetického pole²³, měřená v plynném stavu²⁴ nebo za podmínek „rezonance“ pro barevné vzorky²⁵. Mimo standardního laseru o vlnové délce 532 nm se experimentuje s excitací ultrafialovou²⁶ nebo v blízké infračervené oblasti²⁷. Pro

chemiky je určitě zajímavá možnost přesně stanovit pomocí této metody enantiomerní přebytek²⁸ a uvažuje se i o jejím použití jako diagnostické metody v lékařství²⁹. Samostatnou kapitolou jsou dva jiné jevy, mimo vlastní vibrační ROA, které lze také sledovat pomocí ROA spektrometru: cirkulárně polarizovaná luminiscence (CPL)³⁰ a kombinace elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) s Ramanovým rozptylem cirkulárně-polarizovaného záření (ECD-Raman)³¹.

Poměrně unikátní pro spektrální metodu je úzké sepětí ROA a kvantově-chemických výpočtů. Polohy, intenzity a znaménka spektrálních páسů lze přiřadit struktuře na základě empirických vztahů³²; daleko univerzálnější je ale interpretace spekter na základě jejich „*ab initio*“ simulací. Ty navíc poskytují doplňkové informace o studovaných systémech. Výpočetní metody a experiment se v tomto směru vzájemně doplňovaly, inspirovaly a podněcovaly. Teoretickými milníky bylo např. zavedení Londonových orbitalů do výpočtů³³, což odstranilo závislost výsledků na zvolení souřadné soustavy, spojení simulací s „rychlými“ výpočty založenými na teorii elektronové hustoty³⁴, a přenos vibračních parametrů umožňující simulovat vibrační spektra proteinů i jiných systémů až o desítkách tisíc atomů³⁵.

2. Fyzikální principy a souvislosti

Pro představu o možnostech a omezeních ROA je užitečné zařadit ji mezi ostatní spektroskopické metody využívající chiralitu molekul a cirkulárně-polarizované světlo (tab. I). Jako forma vibrační optické aktivity (VOA), ROA zkoumá vibrační přechody. Ty je možné sledovat

Tabulka I
Zjednodušený přehled chiroptických metod

| Chiroptická metoda | Pro elektronové přechody | Pro vibrační přechody |
|--|--|---|
| <i>Využívající přírodní chiralitu:</i> | | |
| Optická rotační disperze (ORD) | standardní, většinou nahrazena ECD | VORD, známá, ne moc rozšířená ⁵⁸ |
| Cirkulární dichroismus (CD) | elektronický CD (ECD), standardní metoda | vibrační cirkulární dichroismus (VCD), pozorován poprvé v roce 1974 (cit. ⁵⁹), komerčně dostupný po roce 1997 |
| Cirkulárně polarizovaná luminiscence (CPL) | začíná být komerčně dostupná | neznámá |
| Ramanova optická aktivita (ROA) | neznámá | pozorovaná od r. 1973 (cit. ¹⁰), komercializovaná od roku 2005 (cit. ⁶⁰) |
| <i>Chiralita buzená magnetickým polem:</i> | | |
| Magnetická ORD | Faradayův efekt | nepoužívá se |
| Magnetický cirkulární dichroismus | MCD, poměrně častá metoda | Magnetický VCD (MVCD), pozorován od r. 1984 (cit. ⁶¹), teoretický popis 2018 (cit. ⁶²), používán vzácně |
| Magnetická CPL | dostupná, spíše ojedinělá | neznámá |
| Magnetická ROA | pozorovaná ⁶³ | pozorovaná pro absorbující vzorky ⁶⁴ i plyny ⁴³ |

i pomocí jiné chiroptické metody, vibračního cirkulárního dichroismu (VCD)³⁶. Vůči němu ROA nabízí větší rozsah vibračních frekvencí (např. 50–4500 cm⁻¹)¹⁷ a pohodlnější práci s vodnými roztoky. Ty jsou tradičně problematické v infračervené spektroskopii, tedy i pro VCD, neboť voda silně absorbuje infračervené záření. Ramanův signál vody je poměrně slabý. Naopak, výhodou VCD jsou menší nároky na čistotu vzorku. Fluorescenční pozadí v Ramanově spektru způsobené nečistotami může zcela znehodnotit ROA experiment, neboť ROA šum je zhruba úměrný odmocnině Ramanova signálu. VCD technika je také po experimentální a teoretické stránce jednodušší, a „přemíra“ informace v ROA spektru může být i rušivá. Typickým příkladem je sekundární struktura proteinů daná konformací hlavního peptidového řetězce. Ta se ve VCD projevuje specifickým tvarem pásů tzv. amidu I (z velké části valenční vibrace karbonylové skupiny, ~1650 cm⁻¹). V ROA je amid I méně specifický, a do spekter zasahují i postranní peptidové řetězce komplikující jejich interpretaci. Společnou nevýhodou VCD a ROA je potřeba velkého množství vzorku (zpravidla více než 1 mg) a velkých koncentrací (ideálně >10 mg ml⁻¹).

Oproti elektronovým chiroptickým metodám (ECD, ORD, CPL) vibrační spektra poskytují zpravidla více rozlišených pásů, tedy více nebo alespoň lépe čitelnou informaci. Také interpretace VOA spekter pomocí kvantově-mechanických výpočtů je jednodušší. Ty jsou notoricky pomalé a nespolehlivé pro excitované elektronové stavy, zatímco vibrační spektra zpravidla vyžadují jen popis základního elektronového stavu molekuly. Další výhodou VOA je „lokalita“ vibračních interakcí, výhodná pro určení struktury spekter. Elektronová spektra pro jednu a tu samou molekulu/skupinu daleko více závisí na okolí, např. na rozpouštědle.

Magnetické analogy chirálních spektroskopii jsou zajímavé v tom, že jsou univerzálně použitelné, tj. i nechirální molekuly dávají chirální signál. To může být důležité pro jistější identifikaci látek, přiřazení přechodů ke kvantovým stavům, a rozlišení pásů splývajících při použití metod necitlivých k polarizaci světla.

Když se vrátíme k vlastní ROA, můžeme rozlišit několik druhů experimentů. Spektrum S získáme vždy jako odezvu detektoru, $S(\omega) = I_R - I_L$, kde ω je Ramanův posun frekvence (zpravidla v cm⁻¹) a $I_{R/L}$ intenzity pro pravo/levotočivě polarizované světlo. Úhel mezi dopadajícím a analyzovaným paprskem může být různý, nejčastěji 0° (dopředný rozptyl), 90°, nebo 180° (zpětný rozptyl). Navíc vzorek může být ozařován nepolarizovaným světlem, a rozdíl $I_R - I_L$ detegován na výstupu (modulace cirkulární polarizace na výstupu – scattered circular polarization, SCP), nebo střídavě pravo- a levotočivým světlem, a detegována celková intenzita (kruhová polarizace na vstupu, incident circular polarization, ICP). Při kontrole vstupní (horní index) i výstupní (dolní index) polarizace můžeme měřit rozdíl ve fázi ($I_R^R - I_L^L$ kruhová polarizace, dual circular polarization, DCP) i opačnou kombinaci ($I_L^R - I_R^L$, DCP_{II}). Díky komercializaci se pod „ROA spektrem“ zpravidla míní SCP (180°) experiment, ale při srovnávání

různých pramenů je třeba druh spektra zkontrolovat. U jednotlivých druhů experimentů se liší i celková Ramanova intenzita, definovaná jako $I_R + I_L$.

Poměr ROA a Ramanových intenzit (normalizovaný rozdíl kruhově-polarizovaných intenzit, normalized circular intensity difference, CID) je zpravidla malý, CID ~10⁻⁴, a měření i na moderních přístrojích může být obtížné a zdlouhavé (hodiny, dny). Slabé signály mohou být přehlášeny artefakty. Pokud je to možné, je dobré ověřit, že optické antipody, enantiomery, dávají „zrcadlově obrácená“ spektra, tj. ROA pásy stejné intenzity ale opačného znaménka. Důležité je také uvědomit si, že šum v ROA signálu je přibližně úměrný odmocnině Ramanova signálu. Pokud je tedy např. pozadí v Ramanově spektru vysoké, typicky vlivem fluorescenčních nečistot nebo fluorescence zkoumané látky, snadno může překazit ROA experiment.

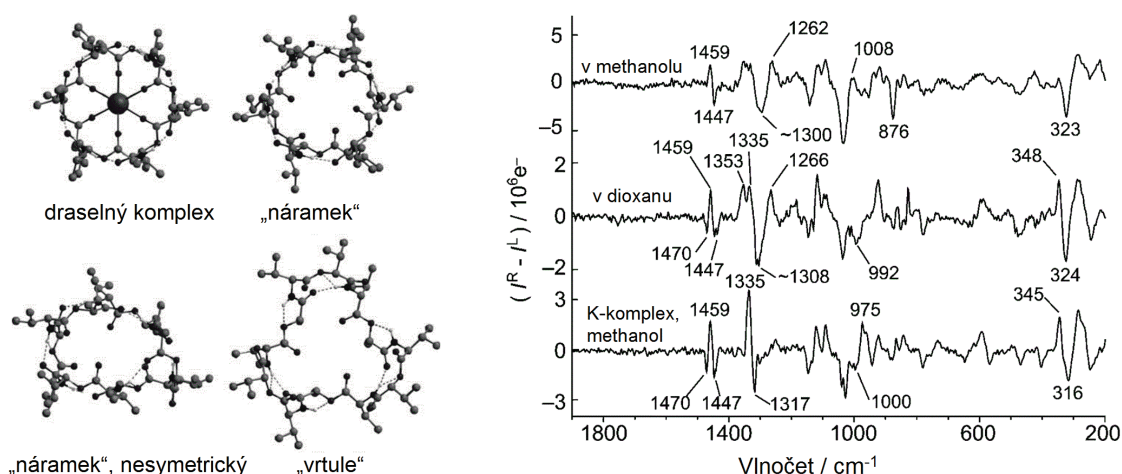
Pro experimentování s různými excitačními vlnovými délkami (λ) je důležité, že intenzita Ramanova signálu je úměrná λ^{-4} a u ROA je to dokonce λ^{-5} . V komerčním přístroji se pracuje s vlnovou délkou 532 nm. Pokud bychom prováděli měření s 785 nm laserem jako v laboratoři prof. Unna²⁷, signál by pak byl (785/532)⁵ ~7krát slabší. Naopak, ultrafialový ROA spektrometr prof. Barrona a Dr. Kapitána s vlnovou délkou 244 nm zesílí signál (532/244)⁵ ~50krát (cit.²⁶). V posledním případě ale může docházet k rozkladu vzorku a jiným parazitním jevům. V tomto smyslu je vlnová délka 532 nm rozumný kompromis.

Jako excitační zdroj se tedy používá výhradně monochromatické záření laseru. Podle klasické představy světlo molekulu polarizuje, indukuje v ní elektrické proudy, a molekula jako anténa se stává zdrojem Ramanova signálu, který se deteguje. Nahlíženo z jiné strany, můžeme si také představit, že molekula pohltí kvantum elektromagnetického záření, foton, a vypustí jiné. Pro simulace ROA spekter musíme spočítat polarizovatelnost molekuly a její vibrační energie, což je dnes úloha dobře zvládnutá v kvantově-chemických programech, např. v Gaussianu³⁷.

3. Příklady nerezonanční ROA spektroskopie

Nerezonanční ROA se rozumí spektroskopie vzorků neabsorbujících excitační laserové záření. Sem patří převážná většina dosavadních experimentů. Jako příklady použití uvádíme tři aplikace, určení konformerů valinomycinu, simulace spekter globulárních proteinů, a pokročilou analýzu ROA spekter.

Valinomycin je flexibilní molekula a např. NMR spektroskopie není schopna rozlišit signály jednotlivých konformací. ROA spektrum je prostý součet sub-spekter všech komponent ve směsi. NMR a ROA jsou jedny z mála metod vhodných ke studiu molekul v roztoku, a tento případ dobře dokládá „konkurenceschopnost“ optických metod. V naší práci³⁸ jsme zjistili, že v roztoku, stejně jako v krystalu, převládá nesymetrická konformace, kde část peptidového řetězce zaujímá tzv. β -turn (obr. 1). Tuto formu není možné přímo detegovat pomocí NMR. V ROA

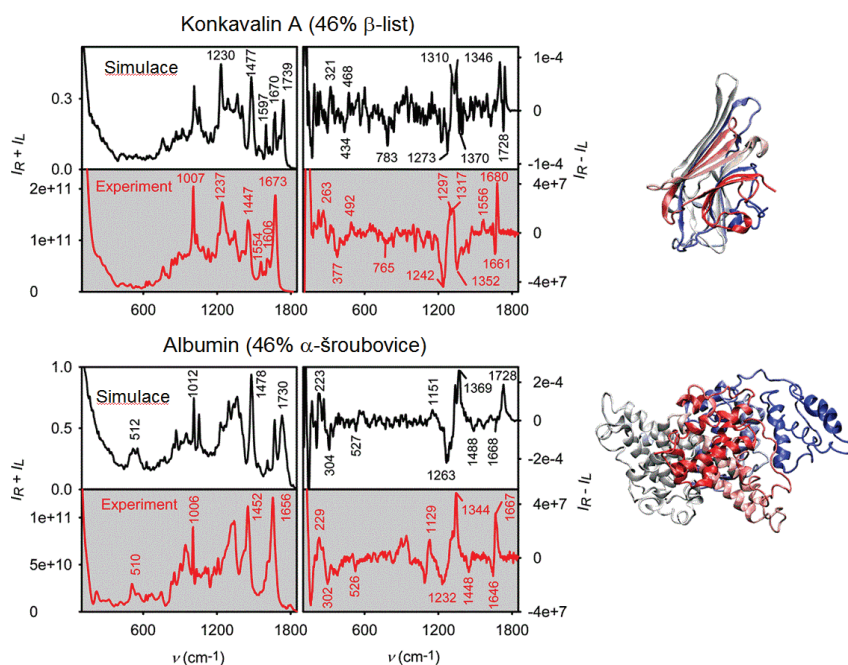


Obr. 1. Příklad konformerů valinomycinu, jeho ROA spektra měřená v methanolu a dioxanu, a komplex s draselnými ionty měřený v methanolu, podle cit.³⁸

spektrech je také dobře vidět sbalení molekuly do komplexu s draselnými ionty, zejména u pásů v okolí 1320 cm^{-1} .

Na globulárních proteinech byla z hlediska vývoje metodologie zajímavá především jejich velikost. Přímá simulace spekter kvantově-chemickými metodami nebyla možná. Proto jsme aplikovali metodu přenosu vibračních parametrů³⁹. Krystalová struktura byla známa; zkoumané proteiny jsme proto rozložili do menších fragmentů

o ~ 100 atomech, na kterých jsme pomocí dalších drobných výpočetních triků mohli s vysokou přesností spočítat silové pole a intenzitní parametry. Ty byly přeneseny zpět na původní protein, pro který tak bylo možné generovat Ramanovo i ROA spektrum. Z obr. 2 vidíme, že simulace poměrně věrně experiment reprodukuje. Např. jsou schopny zachytit rozdíly mezi strukturou proteinu založenou na β -listu (konkavalin A) a α -šroubovice (albumin). Podobná



Obr. 2. Ukázka shody simulovaných a experimentálních Ramanových a ROA spekter dvou globulárních proteinů, konkavalinu A a lidského sérového albuminu, podle cit.³⁹

přesnost simulací byla dosud možná jen u malých molekul. Trik s přenosem vibračních parametrů umožňuje posunout přesné simulace vibračních spekter k systémům o desítkách tisíc atomů, kde začíná být limitujícím faktorem diagonalizace silového pole.

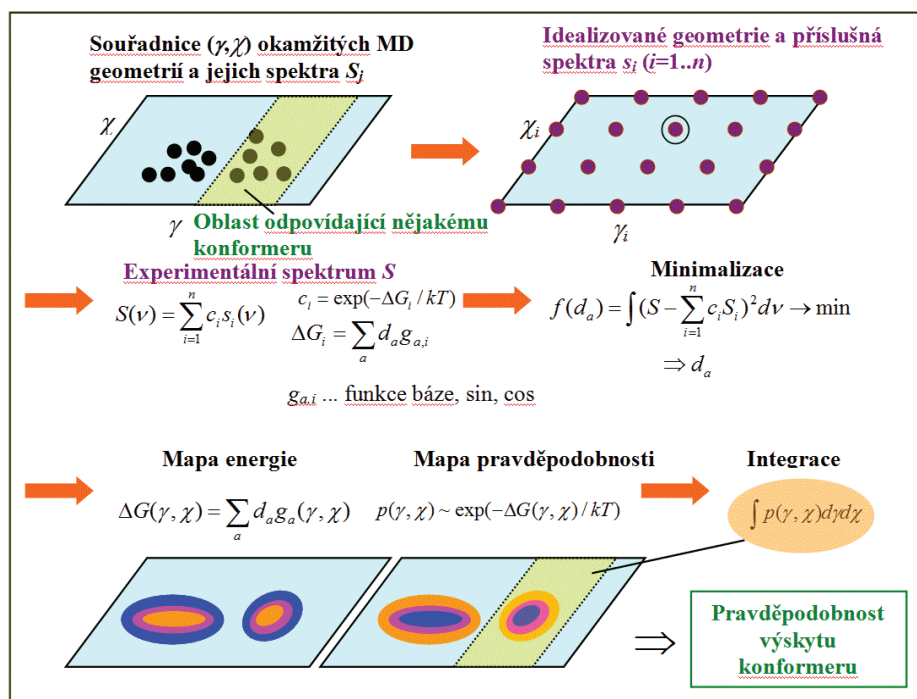
Prvotní simulace ROA, a obecně vibračních spekter, měly k realitě dost daleko. Rozdíl mezi experimentálními a vypočtenými frekvencemi často zabraňoval i základnímu přiřazení pozorovaných spektrálních pásů, velká chyba byla i v intenzitách. U tzv. biomolekul i jiných systémů přesné simulace spekter často ještě komplikuje jejich flexibilita a polarita. Ve vzorku je přítomno mnoho konformací, které silně interagují s rozpouštědlem, zpravidla s vodou. Modernější výpočetní postupy založené na spojení klasické a kvantové mechaniky (multi-scale methods) ale dokáží reálnou situaci zohlednit i pro tyto případy. Pokud pak věříme simulovaným spektrům, můžeme do nich rozložit spektra experimentální; koeficienty rozkladu pak přímo udávají zastoupení složek ve vzorku⁴⁰. Nedávno jsme na příkladu modelových nukleotidů tento postup ještě rozvinuli a rozkladem experimentálních spekter získali celou konformační mapu, tj. závislost volné energie na vybraných souřadnicích v molekule (obr. 3, cit.⁴¹).

4. Magnetická rezonanční měření v plynech

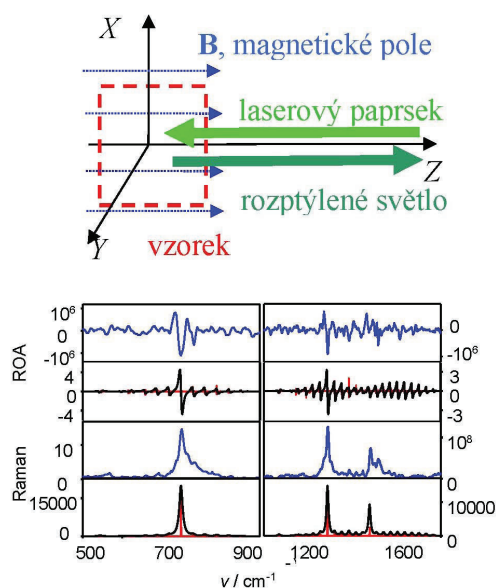
ROA měření v plynech jsou podstatně exotičtější než pro roztoky. Dosáhnout měřitelné koncentrace v plynu je obtížné a pro nativní ROA signál se to povedlo jen pro methyloxiran²⁴. Jeho signál byl srovnatelný s falešnými signály od stěny kvety. Abychom eliminovali artefakty, během měření jsme nechali plyn uniknout. Signál kvety, která neměnila polohu, byl stále stejný, a dal se tak lépe odečíst. Měření má význam pro kalibraci výpočetních metod, často aplikovaných ve vakuu, nebo pro zkoumání interakce s rozpouštědlem⁴². Methyloxiran s teplotou varu 34 °C je ovšem výjimečná chirální molekula.

Zajímavý byl také pokus, kdy se plynný NO₂ nacházel v magnetickém poli²³. NO₂ má lichý počet elektronů a je to tedy paramagnetická molekula. Magnetické pole silně štěpí jeho rotační hladiny. Navíc také tento oxid absorbuje excitační laserové záření, což všechno spolu s výběrovými pravidly pro rotačně-vibrační přechody vede k silnému ROA signálu (obr. 4), který bychom tak mohli označit jako (para)magnetickou rezonanční rotačně-rozlišenou ROA. Spektra tak odráží zajímavé vlastnosti molekuly, jako jsou jednotlivé složky polarizovatelnosti, které by bylo obtížné zjistit jinými metodami.

I tak byla experimentální ROA spektra NO₂ zatížena velkým šumem. První úvahy naznačovaly, že podobný výsledek nemůžeme očekávat u diamagnetických molekul.



Obr. 3. Schéma postupu při rozkladu experimentálních spekter do teoretických. Ve výpočetním modelu se snažíme pokrýt celý prostor vybraných souřadnic, následná analýza pak poskytne oblasti s největšími pravděpodobnostmi výskytu molekuly, podle cit.⁴¹



Obr. 4. Měření v magnetickém poli a ROA spektra plynného NO_2 , experiment (modře) a simulace (černě, s vyznačenými jednotlivými přechody), podle cit.²³

Vždyť jejich magnetický moment je zhruba 2000krát menší než u paramagnetických. Proto bylo překvapením, že diamagnetické plynné halogeny (Cl_2 , Br_2 , I_2) za stejných podmínek vykazovaly podobně silné ROA pásy⁴³. Vysvětlením bylo to, že u Ramanova rozptylu v rezonanci se silně uplatňují i excitované elektronové stavy molekul, a ty už u halogenů paramagnetické jsou. Ony „virtuální“ energetické hladiny, které se kreslí v učebních textech ozřejmujících Ramanův rozptyl, jsou v tomto případě velmi hmatatelné.

5. Chirální rozptyl v kombinaci s povrchovým Ramanovým zesílením

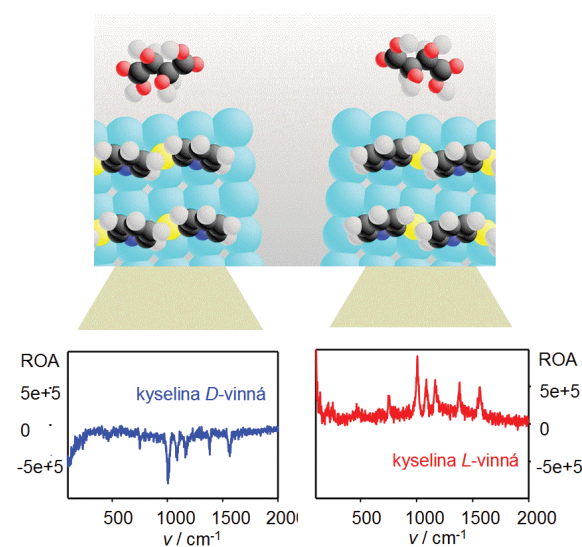
Ramanův signál molekul v blízkosti povrchů kovů (nejčastěji Ag, Au, Cu) a jiných materiálů může vzrůst až o několik řádů. Standardní zesílení se udávají v rozsahu 10^4 – 10^7 , některé prameny oznamují zesílení až $\sim 10^{12}$, kdy lze údajně zaznamenat signál jediné molekuly⁴⁴. Proto se mnoho pracovišť včetně naší laboratoře pokusilo prozkoumat podmínky, za kterých by se dala měřit i povrchově-zesílená ROA (SEROA, surface-enhanced ROA). Podle našeho teoretického modelu by to bylo možné⁴⁵, některé práce to však vylučují⁴⁶. Je pravda, že experimentální práce v tomto směru jsou často podezřelé, autoři se nenamáhají s ověřením pomocí měření s opačnými enantiomery nebo s vysvětlením naměřeného signálu. Odstrašujícím příkladem je SEROA „spektrum“ nechirálního adeninu⁴⁷.

Přesto jsme reprodukovatelné SEROA spektra získali, díky principu „velitel a vojáci“ (sergeant and soldiers). Chirální vinná kyselina sama poskytuje velice slabý povrchově-zesílený Ramanův signál. Pokud se ale na stříbrný povrch naváže merkaptopyridin, molekula se silným signálem, vinná kyselina ovlivní jejich orientaci, což vede k měřitelnému ROA signálu (obr. 5, cit.²¹). Enantiomery dávají opačné signály a metoda funguje pro různé „velitele“ (vinná kyselina, alanin, arginin) a „vojáky“ (2-merkaptopyridin, 4-merkaptopyridin).

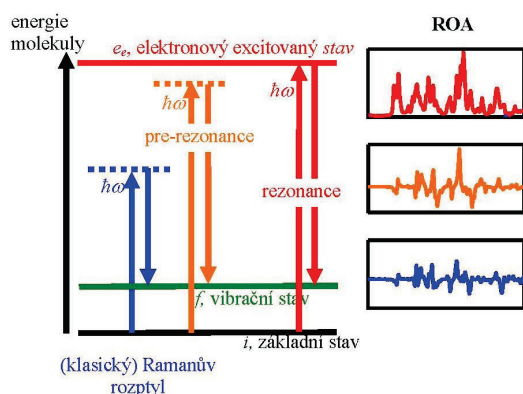
Naměřený SEROA signál tak jasně zachycuje molekulární chiralitu, ale je často jen úměrný Ramanovu spektru. To poněkud snižuje množství informace, která se z něj dá vyčíst. Také původ ROA intenzit není jasný, může se jednat o rezonanční ROA (koloidy silně absorbují laserové záření) nebo efekt pramenící v elektronovém cirkulárním dichroismu vzorku.

6. Rezonanční ROA a interference s cirkulárním dichroismem

Mimo zesílení na kovových površích Ramanův signál také neobyčejně vzroste za podmínek tzv. rezonance. Znamená to, že vzorek absorbuje excitační záření, energie fotonu záření je blízká nebo rovná rozdílu energií nějakých stavů v molekule. Pro excitační délku 532 nm zhruba uprostřed viditelného spektra k tomu zpravidla dochází u barevných vzorků. K zesílení ale může dojít i v tzv. prerezonančním případě, kdy se v blízkosti excitační frekvence nachází nějaký elektronový přechod (absorpční pás). Hranice mezi rezonancí a prerezonancí není nijak



Obr. 5. SEROA spektra 2-merkaptopyrimidinu na stříbrných koloidech za přítomnosti D- a L-vinné kyseliny, podle cit.²¹



Obr. 6. Zjednodušené schéma ROA experimentů. V případě prerezonance je signál větší, v rezonančním případě často převládá jedno znaménko. $\hbar\omega$ je excitační energie laseru

dána, intenzita Ramanova signálu může vzrůst jen o trochu, nebo až $1000\times$ (obr. 6).

Ještě zajímavější je, že také CID, poměr ROA a Ramanových intenzit, se zpravidla v rezonanci zvětší. Můžeme si to představit tak, že onen elektronový rezonující stav „předá“ svoji chiralitu (elektrický a magnetický moment) molekulové polarizovatelnosti, na které ROA intenzita závisí. V případě tzv. limitní rezonance s jedním elektronovým stavem (single electronic state, SES)⁴⁸ dokonce často dochází k tomu, že CID je úměrný poměru elektronového cirkulárního dichroismu a absorpce pro vlnovou délku excitačního záření. Tvary ROA a Ramanových spekter jsou pak až na eventuelní opačné znaménko identické.

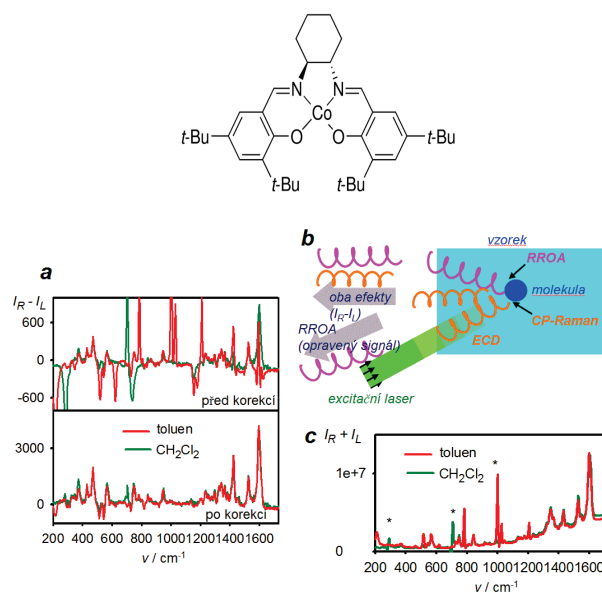
Jednoznaménková ROA, opačná než ECD, se často považuje za indikátor rezonance. Není to úplně přesné, ale např. v tzv. ROA indukované agregací (AIROA, aggregation induced ROA) to u karotenoidů a odvozených barviv funguje velice dobře. Molekuly karotenoidů jsou přibližně symetrické, a tedy nepříliš chirální, a jejich ROA spektra v roztoku jsou až neměřitelně slabá. Za jistých podmínek, např. když vzroste polarita rozpouštědla, agregují, jejich absorpční pás se posune „do rezonance“ s excitačním zářením, a objeví se silný jednoznaménkový ROA signál⁴⁹.

Mnoho experimentátorů se nicméně absorbujícím vzorkům raději vyhnulo. Vzorky se mohou neúměrně zahřívát, rozkládat, a fluorescence může přehlušit Ramanův a tedy i ROA signál. Neméně nepříjemné bylo to, že se při zaznamenávání ROA spekter často objevovaly zvláštní jevy. V roce 2019 jsme s prof. Y. Xu (Edmonton) publikovali studii, kde u roztoků barevného niklového komplexu byly vidět i ROA pásy nechirálních rozpouštědel⁵⁰. Tento „nevysvětlitelný“ úkaz jsme přiřkli tomu, že komplex polarizuje rozpouštědla ve svém okolí a předává jim tak svou chiralitu.

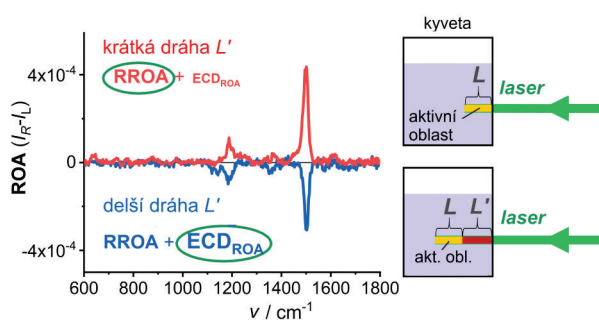
Tato teorie se sice ukázala jako v mnohém nesprávná, ale již po roce nás přivedla ke skutečné příčině: cirkulárnímu dichroismu³¹. ECD, rozdílná absorpce levo- a pravoto-

čivě polarizovaného světla, u absorbujících vzorků způsobí, že excitující laserové záření je mírně kruhově polarizované. To se účastní Ramanova rozptylu. Přitom se jeho polarizace mění, ale obecně zůstává nenulová. Rozptýlený Ramanův paprsek je také modifikován, pokud vzorek vykazuje cirkulární dichroismus i pro příslušné vlnové délky. Výsledné ROA spektrum, rozdíl intenzit pravo- a levotočivé polarizace, obsahuje tedy dvě složky: „skutečnou“ rezonanční vibrační ROA chirální molekuly a signál pramenící z kombinace ECD a polarizovaného Ramanova rozptylu („ECD-Raman“). Dobrou zprávou ale je, že při znalosti ECD a absorpčních spekter se dají obě složky separovat (obr. 7, cit.⁵¹). Tím se otevírá možnost měřit „skutečnou“ molekulární ROA v rezonanci.

ECD-Raman složku v totálním signálu měřeném na ROA spektrometru můžeme považovat za nežádoucí artefakt, ale i za způsob, jak alternativně zaznamenat cirkulární dichroismus molekul. Druhou možností se např. zabývala studie věnovaná komplexačním vlastnostem a přenosu chiralitu u komplexu vanadu⁵². Pro praktické použití je dobré uvědomit si, že u ECD-Ramanova efektu je poměr CID (na rozdíl od pravé ROA nebo RROA) závislý na koncentraci a délce kyvety, resp. optické dráze excitačního a rozptýleného paprsku. Zaostríme-li laser na přední stěnu kyvety (při zpětném rozptylu), tj. minimalizujeme-li optickou dráhu, ECD-Ramanova složka téměř vymizí, atd. Při studiu kobaltaminů, derivátů vitamínu B₁₂, některé látky dokonce vykazovaly opačné znaménka ROA a ECD-



Obr. 7. Měření chirálního kobaltového komplexu⁵¹. a) ROA získaná ve dvou rozpouštědlech, před a po korekci na ECD. Nekorigovaná spektra obsahují pásy rozpouštědel, po korekci získáme vibrační ROA vlastního komplexu. b) kombinace ECD, RROA a Ramanova rozptylu kruhově polarizovaného záření při měření barevných vzorků, c) Ramanova spektra



Obr. 8. ROA spektrum derivátu kobaltaminu závislé na poloze kyvety, podle cit.⁵³. Optickou dráhu můžeme zhruba rozdělit na část odkud se sbírá Ramanův signál (L) a část, kde dochází k cirkulárnímu dichroismu (L')⁵³

Ramanových pásů. Výsledné znaménko se pak dalo ladit posouváním vzorku (obr. 8)⁵³.

7. Cirkulárně polarizovaná luminiscence

Pokud tedy přijmeme myšlenku, že každý signál získaný na ROA spektrometru nemusí nutně souviset s molekulární vibrační ROA, nepřekvapí nás, že tak můžeme měřit i cirkulárně-polarizovanou luminiscenci (CPL) molekul. Z praktického hlediska se měření CPL na ROA nebo konvenčním CPL spektrometru liší. ROA spektrometr poskytuje silnější excitační záření, a tak je možné zaznamenat slabé luminiscenční signály, jinak neměřitelné. Také díky propracované detekci kruhově-polarizovaných složek záření je možné zaznamenat CPL s velmi malým CID poměrem. Na druhé straně, interval vlnových délek detegovaných na ROA spektrometrech je omezený a excitační frekvence je fixní. U spektrometru firmy Biotoools s excitační délkou 532 nm je rozsah Ramanových frekvencí zhruba 200–2400 cm^{-1} , což odpovídá 507–610 nm.

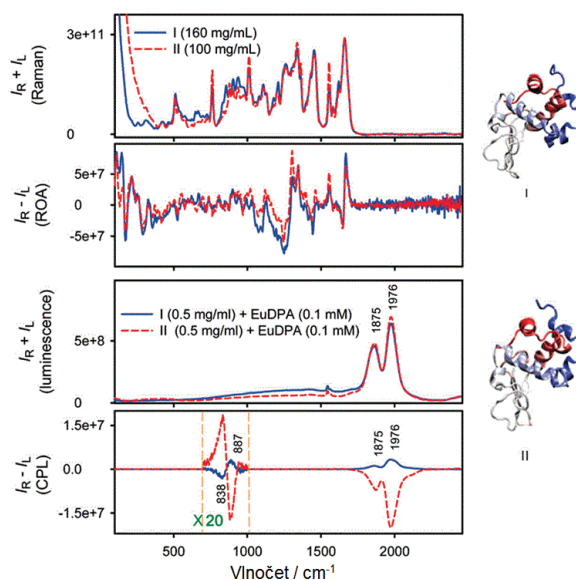
Podobně jako u ECD-Ramanova efektu, v prvotních studiích byly CPL a (skutečné) ROA pásy zaměřovány. Typickým příkladem jsou lanthanové komplexy, např. obsahující europium. U těch se totiž předpokládalo, že dojde k rezonančnímu zesílení, a tak luminiscence, která je zpravidla silnější než Ramanova intenzita, nevzbudila podezření⁵⁴. CPL a ROA pásy však lze ve spektru celkem dobře odlišit. Pokud je možné získat alespoň Ramanova spektra při různých excitačních vlnových délkách, pravé Ramanovy a ROA pásy „zůstanou na místě“, tj. jejich Ramanův posun odpovídající vibračním frekvencím se v Ramanově spektru nemění. CPL pásy zase „zůstanou na místě“ pokud jde o absolutní vlnovou délku, ale rozdíly vzhledem k různým excitačním délkám budou jiné, a tedy dojde k jejich posunu v Ramanově spektru. Jinou možností je měření tzv. stupně cirkularity (degree of circularity, DOC), který zjednodušeně řečeno říká, jak moc si molekula pamatuje polarizaci budícího záření. Měření je velmi

rychlé, srovnatelné s měřením Ramanova spektra. Zatímco pro molekulární ROA je DOC řádově jedna, pro CPL je DOC rovné nule.

Na možnost měření CPL pomocí ROA spektrometru jsme upozornili v případě komplexu obsahujícího cesium a europium³⁰. Ten byl zajímavý ještě neobyčejně vysokým poměrem CID, blízkým jedné. Molekula tak velice efektivně konvertuje jakékoliv záření do kruhově polarizovaného. I u jiných případů jsou hodnoty CID u CPL zpravidla vyšší než u ROA, což je dáno rozdílnou fyzikální podstatou obou jevů. Naplno se výhoda měření CPL na ROA spektrometru projevila v případě indukované chiralidy lanthanových komplexů. Ty v rozsahu měřitelných vlnových délek poskytují mnoho luminiscenčních pásů, na rozdíl od běžnějších organických luminoforů dobře rozlišitelných, s malou šířkou. Indukovaná CPL spektra jsou také neobyčejně citlivá^{55,56} na okolí, čehož lze využít k detekci molekul, jako jsou cukry nebo nukleové kyseliny. Srovnání ROA/Ramanových spekter dvou proteinů a CPL/luminiscenčních signálů komplexu $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]^{3-}$ v jejich přítomnosti je na obr. 9 (DPA je kyselina dipikolinová, pyridin-2,6-dikarboxylová). Ačkoliv se oba proteiny příliš neliší, rozdíly jsou patrné ve všech spektrech a nejvíce v indukované CPL.

8. Závěr

Ramanova optická aktivita je velice flexibilní metoda, poskytující unikátní informace o studovaných molekulách. Interpretace spekter je z velké části založená na



Obr. 9. Ramanova a ROA spektra lidského (I) a slepičího (II) lysozymu, a luminiscenční a CPL spektra komplexu $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]^{3-}$ měřená za jejich přítomnosti, vpravo struktura obou bílkovin, podle cit.⁵⁷

kvantově-chemických simulacích. Jak jsme se pokusili ukázat na uvedených příkladech, ROA je zpravidla používána ke konformačním studiím transparentních roztoků chirálních látek. V poslední době se také objevilo několik variací této techniky, každá přináší mnohé obtíže, ale také nové možnosti umožňující nám lépe pochopit svět molekul a jejich interakce se světlem.

Seznam zkratk

| | |
|-------------|---|
| CPL | circular polarized luminescence, cirkulárně polarizované luminiscence |
| CID | circular intensity difference, poměr ROA a Ramanova signálu |
| DOC | degree of circularity, stupeň cirkularity |
| DPA | dipikolinová kyselina |
| ECD/VCD/MCD | elektronový/vibrační-magnetický cirkulární dichroismus |
| ICP/SCP/DCP | incident/scattered/dual circular polarization, cirkulární polarizace na vstupu/výstupu/duální |
| MD | molekulová dynamika |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| ORD | optická rotační disperze |
| ROA | Ramanova optická aktivita |
| AIROA | aggregation-induced ROA, ROA indukovaná agregací |
| RROA | rezonanční ROA |
| SEROA | surface-enhanced ROA, povrchově zesílená ROA |
| VOA | vibrační optická aktivita |

LITERATURA

- Raman C. V.: *Indian J. Phys.* 2, 387 (1928).
- Raman C. V.: *Nature* 121, 619 (1928).
- Bhagavantam S., Venkateswaran S.: *Nature* 125, 237 (1930).
- Kastler A.: *Comp. Rend.* 191, 565 (1930).
- Perrin F.: *J. Chem. Phys.* 10, 415 (1942).
- Atkins P. W., Barron L. D.: *Mol. Phys.* 16, 453 (1969).
- Barron L. D., Buckingham A. D.: *Mol. Phys.* 20, 1111 (1971).
- Bosnich B., Moskovits M., Ozin G. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4750 (1971).
- Diem M., Fry J. L., Burrow D. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 253 (1973).
- Barron L. D., Bogaard M. P., Buckingham A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 603 (1973).
- Barron L. D., Hecht L., McColl I. H., Blanch E. W.: *Mol. Phys.* 102, 731 (2004).
- Nafie L.: *Vibrational optical activity: Principles and applications*. Wiley, Chichester 2011.
- Hecht L., Barron L. D., Gargaro A. R., Wen Z. Q., Hug W.: *J. Raman Spectrosc.* 23, 401 (1992).
- Bouř P., Baumruk V., Hanzlíková J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 1384 (1997).
- Tatarkovič M., Synytsya A., Šťovíčková L., Bunganič B., Miškovcová M., Petruželka L., Setnička V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1335 (2014).
- Buděšínský M., Daněček P., Bednářová L., Kapitán J., Baumruk V., Bouř P.: *J. Phys. Chem. A* 112, 8633 (2008).
- Michal P., Čelechovský R., Dudka M., Kapitán J., Vůjtek M., Berešová M., Šebestík J., Thangavel K., Bouř P.: *J. Phys. Chem. B* 123, 2147 (2019).
- Polavarapu P. L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4544 (2002).
- Haesler J., Schindelholz I., Riguet E., Bochet C. G., Hug W.: *Nature* 446, 526 (2007).
- Osinska K., Pecul M., Kudelski A.: *Chem. Phys. Lett.* 496, 86 (2010).
- Das M., Gangopadhyay D., Šebestík J., Habartová L., Michal P., Kapitán J., Bouř P.: *Chem. Commun.* 57, 6388 (2021).
- Zajac G., Kaczor A., Zazo A. P., Mlynarski J., Dudek M., Baranska M.: *J. Phys. Chem. B* 120, 4028 (2016).
- Šebestík J., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 9236 (2014).
- Šebestík J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 498 (2011).
- Merten C., Li H., Nafie L. A.: *J. Phys. Chem. A* 116, 7329 (2012).
- Kapitán J., Barron L. D., Hecht L.: *J. Raman Spectrosc.* 46, 392 (2015).
- Fujisawa T., Leverenz R. L., Nagamine M., Kerfeld C. A., Unno M.: *J. Am. Chem. Soc.* 139, 10456 (2017).
- Michal P., Hudecová J., Čelechovský R., Vůjtek M., Dudka M., Kapitán J.: *Symmetry* 14, 990 (2022).
- Habartová L., Bunganič B., Tatarkovič M., Zavoral M., Vondroušová J., Syslová K., Setnička V.: *Chirality* 30, 581 (2018).
- Wu T., Kapitán J., Mašek V., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 14933 (2015).
- Wu T., Li G., Kapitán J., Kessler J., Xu Y., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 21895 (2020).
- Ashton L., Barron L. D., Hecht L., Hyde J., Blanch E. W.: *Analyst* 132, 468 (2007).
- Helgaker T., Ruud K., Bak K. L., Joergensen P., Olsen J.: *Faraday Discuss.* 99, 165 (1994).
- Ruud K., Helgaker T., Bouř P.: *J. Phys. Chem. A* 106, 7448 (2002).
- Kessler J., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 3314 (2015).
- Keiderling T. A.: *Chem. Rev.* 120, 3381 (2020).
- Frisch M. a 73 spoluautorů, *Gaussian16*, Wallingford, CT 2016.
- Yamamoto S., Watarai H., Bouř P.: *ChemPhysChem* 12, 1509 (2011).
- Bouř P., Sopková J., Bednářová L., Maloň P., Keiderling T. A.: *J. Comput. Chem.* 18, 646 (1997).

40. Jungwirth J., Šebestík J., Šafařík M., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. B* 121, 8956 (2017).
41. Schrenková V., Para Kkadan M. S., Kessler J., Kapitán J., Bouř P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 25, 8198 (2023).
42. Crawford T. D., Ruud K.: *ChemPhysChem* 12, 3442 (2011).
43. Šebestík J., Kapitán J., Pačes O., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 3504 (2016).
44. Le Ru F. C., Etchegoin P. G.: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63, 65 (2012).
45. Novák V., Šebestík J., Bouř P.: *J. Chem. Theory Comput.* 8, 1714 (2012).
46. Etchegoin P. G., Galloway C., Le Ru E. C.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8, 2624 (2006).
47. Kneipp H., Kneipp J., Kneipp K.: *Anal. Chem.* 78, 1363 (2006).
48. Nafie L. A.: *Chem. Phys.* 205, 309 (1996).
49. Dudek M., Zajac G., Kaczor A., Baranska M.: *J. Phys. Chem. B* 120, 7807 (2016).
50. Li G., Kessler J., Cheramy J., Wu T., Poopari M. R., Bouř P., Xu Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 16495 (2019).
51. Wu T., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 13, 3873 (2022).
52. Machalska E., Hachlica N., Zajac G., Carraro D., Baranska M., Licini G., Bouř P., Zonta C., Kaczor A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23, 23336 (2021).
53. Machalska E., Zajac G., Wierzba A. J., Kapitán J., Andruniów T., Spiegel M., Gryko D., Bouř P., Baranska M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 21205 (2021).
54. Merten C., Li H., Lu X., Hartwig A., Nafie L. A.: *J. Raman Spectrosc.* 41, 1563 (2010).
55. Wu T., Průša J., Kessler J., Dračínský M., Valenta J., Bouř P.: *Anal. Chem.* 88, 8878 (2016).
56. Wu T., Bouř P., Andrushchenko V.: *Sci. Rep.* 9, 1068 (2019).
57. Wu T., Kessler J., Bouř P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 23803 (2016).
58. Lombardi R. A., Nafie L. A.: *Chirality* 21, E277 (2009).
59. Holzwarth G., Hsu E. C., Mosher H. S., Faulkner T. R., Moscowitz A.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, 251 (1974).
60. Hug W., Hangartner G.: *J. Raman Spectrosc.* 30, 841 (1999).
61. Devine T. R., Keiderling T. A.: *J. Phys. Chem.* 88, 390 (1984).
62. Keiderling T. A., Bouř P.: *Phys. Rev. Lett.* 121, 073201 (2018).
63. Barron L. D., Vrbancich J.: *J. Raman Spectrosc.* 14, 118 (1983).
64. Barron L. D.: *Nature* 257, 372 (1975).

P. Bouř (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Variability of the Raman Optical Activity Spectroscopy**

Spectroscopy of Raman optical activity (ROA) is rather rare because of its experimental demands and difficult interpretation of the spectra. Yet it is further developing and in the last decade we witnessed significant improvement of the experimental and theoretical methods. This brought about new knowledge regarding structure and behavior of molecules, and their interactions with light. We give a brief summary of the experience we and others obtained with this method. It appears that ROA spectroscopy gives unique information about molecules, suitable for determination of the absolute configurations, but also for studies of conformations and electronic structure.

Keywords: Raman optical activity, resonance, circularly-polarized luminescence, spectra simulations



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN: NEUROPEPTID S NEVHODNÝM JMÉNEM, ALE VHODNÝMI VLASTNOSTMI PRO LÉČBU OBEZITY, DIABETU 2. TYPU I ALZHEIMEROVY NEMOCI

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

BLANKA ŽELEZNÁ^a, ANDREA PAČESOVÁ^a, VERONIKA STRNADOVÁ^a, JAROSLAV KUNES^{a,b},
a LENKA MALETÍNSKÁ^a

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika, ^b Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 00 Praha 4, Česká republika
maletin@uochb.cas.cz

Došlo 2.10.23, přijato 2.11.23.

Ačkoli jedinců s obezitou neustále přibývá, dostupnost účinné neinvazivní léčby je stále malá. Slibnými prostředky pro léčbu obezity jsou anorexigenní neuropeptidy s působností v mozku. Jejich dopravu do mozku ale komplikuje jejich malá stabilita a omezená schopnost překonat hematoencefalickou bariéru.

Nedávno objevené anorexigenní neuropeptidy, jako peptid uvolňující prolaktin, představují nový směr ve vývoji antiobezitních látek. Neuropeptidy jsou uvolňovány a působí přímo v oblastech mozku regulujících příjem potravy, ale obecně neprocházejí hematoencefalickou bariérou po periferním podání. Nám se podařilo navrhnout a syntetizovat stabilní palmitoylované analogy tohoto neuropeptidu, které měly po periferním podání prodloužený akutní anorexigenní účinek v myších a potkanech. Opakované periferní podání palmitoylovaných analogů peptidu uvolňujícího prolaktin vedlo k dlouhodobému antiobezitnímu a antidiabetickému účinku u hlodavců s obezitou navozenou vysokotukovou dietou a s inzulinovou rezistencí. Dokázali jsme, že lipidizace by mohla být účinnou cestou, jak dosáhnout žádoucího centrálního účinku peptidu po jeho periferním podání pro léčbu obezity a vyplývajících komplikací, jako je diabetes 2. typu.

Vedle vysokého věku jsou pro Alzheimerovu nemoc rizikovými faktory diabetes 2. typu a obezita. Proto látky snižující koncentraci glukosy v krvi a/nebo s anorexigenními účinky jsou potenciálně neuroprotektivní. Naše skupina sledovala vztah mezi obezitou, diabetem 2. typu a patologickými jevy při Alzheimerově nemoci a zkoumala, zda by originální palmitoylované analogy peptidu uvolňujícího prolaktin mohly působit prospěšně proti neurodegeneraci v několika myších modelech Alzheimerovy nemoci. Ukázali jsme, že tyto lipidizované analogy jsou potenciálně neuroprotektivní látky, které v myších modelech Alzheimerovy nemoci zlepšují prostorovou paměť, zvyšují neurogenezi, synaptogenezi a potlačují neuroinflamaci a dva hlavní znaky Alzheimerovy nemoci, hyperfosforylaci proteinu tau a vznik plaků amyloidního β-peptidu.

Klíčová slova: peptid uvolňující prolaktin, PrRP, anorexigenní neuropeptid, lipidizace, leptin, obezita, inzulinová rezistence, prediabetes, Alzheimerova nemoc

Obsah

1. Úvod
2. Obezita a současná antiobezitika
3. Peptid uvolňující prolaktin a antiobezitní účinky jeho lipidizovaných analogů
4. Antidiabetické účinky lipidizovaného peptidu uvolňujícího prolaktin
5. Neuroprotektivní účinky lipidizovaného peptidu uvolňujícího prolaktin
6. Závěr

1. Úvod

Obezita, nadměrná tělesná hmotnost s přebytkem tukové tkáně, je důsledkem energetické nerovnováhy, kdy energetický příjem převyšuje energetický výdej. Obezita vzniká snáze u jedinců s dědičnou predispozicí k hromadění tukové tkáně při pozitivní energetické bilanci. Nadměrná tělesná hmotnost je definována na základě indexu tělesné hmotnosti (body mass index, BMI). Obezita s sebou přináší zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, poruch metabolismu lipidů a především prediabetu. Podle světové zdravotnické organizace zemřou každý rok více



RNDr. Lenka Maletínská, DSc. vystudovala Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy, obor biochemie. Po Ph.D. studiu na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR absolvovala dvě postdoktorandské stáže na Universite de Sherbrooke v Kanadě a UC Berkeley – Lawrence Berkeley Laboratories v USA. Od roku 2006 je školitelkou doktorského studijního programu Biochemie a patobiochemie na 1. lékařské fakultě UK. Od roku 2012 vede vědeckou skupinu na ÚOCHB se zaměřením na modifikované peptidy regulující příjem potravy a jejich úlohu v léčbě obezity, diabetu a neurodegenerace. Na základě výzkumu těchto peptidů podepsal ÚOCHB v roce 2017 licenční smlouvu s firmou Novo Nordisk.

než 4 miliony lidí v důsledku komplikací spojených s nadváhou či obezitou, a proto je nutné hledat účinnou neinvazivní terapii obezity¹.

2. Obezita a současná antiobezitika

V červnu 2013 byla Americkou lékařskou asociací obezita prohlášena za nemoc, která vyžaduje prevenci a léčbu. Pro farmakology a výrobce léků to byl nejen podnět k vývoji nových léků, ale i k rozšíření indikace léků proti diabetu 2. typu (T2D), které způsobovaly mírný úbytek tělesné hmotnosti. A tak již v prosinci 2014 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv a Evropská léčivá agentura schválily liraglutid, lék proti T2D pod názvem Victoza, ve vyšší dávce pro léčbu obezity pod názvem Saxenda. Liraglutid je peptidový agonista receptoru pro glukagon podobný peptid 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1), který podporuje sekreci inzulínu z pankreatu při zvýšené koncentraci glukózy v krvi. Vyšší dávka liraglutidu v Saxendě má anorexigenní účinek, tedy tlumí chuť k jídlu a navozuje pocit sytosti. Nevýhodou liraglutidu je nutnost podávat jej denně injekčně. Nový analog GLP-1 semaglutid, s komerčním názvem Ozempic, který se podává injekčně pouze jednou týdně pro léčbu T2D, se od roku 2017 podává ve vyšší dávce jako antiobezitikum Wegovy. Všechna zmíněná léčiva vyvinula a vyrábí dánská firma Novo Nordisk. Zcela novým antiobezitikem je tirzepatid, agonista receptorů pro inzulínotropní polypeptid závislý na glukóze (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) a pro GLP-1. Tirzepatid je produktem firmy Eli Lilly a slibuje ještě větší úbytky hmotnosti než Wegovy².

Pro farmakologické snížení příjmu potravy se nabízejí kromě analogů GLP-1 a GIP, hormonů produkovaných gastrointestinálním traktem, i analogy dalších anorexigenních, sytost navozujících peptidů, či antagonisté orexigenních peptidů, které naopak přirozeně stimulují chuť k jídlu. V periférii jsou to např. analogy peptidu YY (PYY) či cholecystokininu (CCK), které jsou také vylučovány ve střevě, nebo antagonisté orexigenního peptidu ghrelinu, kterému se též říká hormon hladu a který je vylučován v žaludku. V centrálním nervovém systému (CNS) jsou pak syntetizovány anorexigenní i orexigenní neuropeptidy, které působí na své receptory v mozkových centrech regulujících příjem potravy. Analogy těchto anorexigenních neuropeptidů mohou být nadějná cílená antiobezitika bez závažných vedlejších účinků³. Komplexní schéma

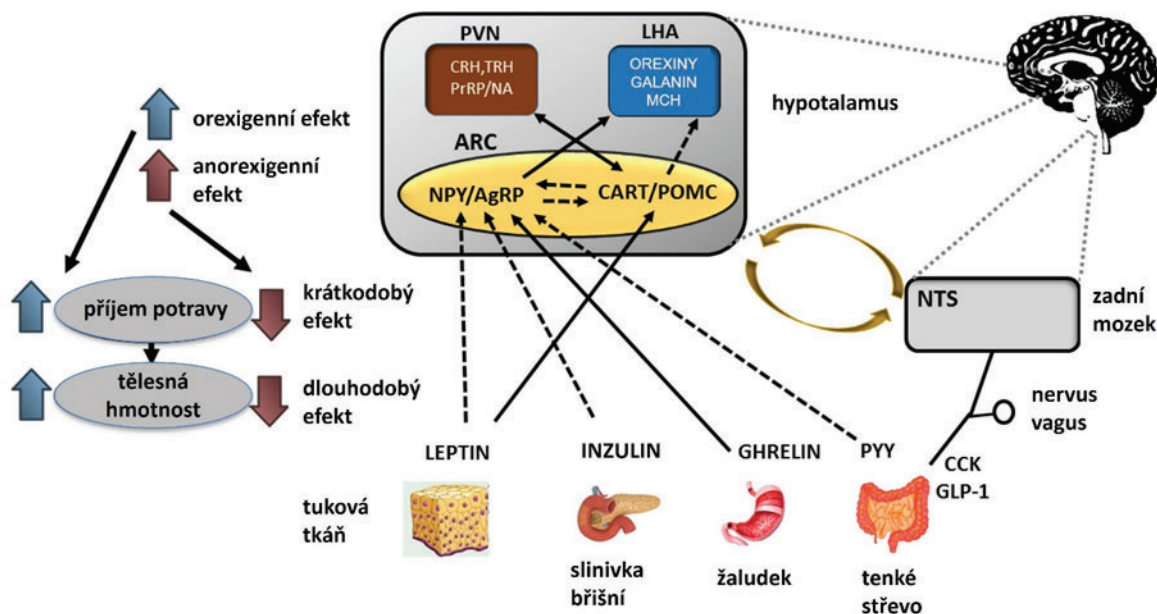
anorexigenních i orexigenních peptidů, které se fyziologicky účastní regulace příjmu potravy, jsou znázorněny na obr. 1. V roce 2013 proběhla klinická studie s analogem anorexigenního neuropeptidu α -melanocyty stimulujícího hormonu (α -MSH) vyvinutým ve firmě Novo Nordisk. Ačkoli absence α -MSH nebo MC4R, receptoru pro α -MSH, způsobuje u myši obezitu a potkani a miniprasata vykrmení vysokotukovou dietou po opakovaném podávání zmíněného analogu α -MSH zhubli, u jinak zdravých mužů s nadváhou se účinek substance na tělesnou hmotnost neprojevil⁴. I přes tyto počáteční nezdary patří analogy neuropeptidů na seznam potenciálních antiobezitik.

3. Peptid uvolňující prolaktin a antiobezitní účinky jeho lipidizovaných analogů

V naší laboratoři jsme před deseti lety začali zkoumat anorexigenní neuropeptid nazvaný jeho objeviteli peptid uvolňující prolaktin (prolactin-releasing peptide, PrRP)⁵. Uvolňování prolaktinu účinkem PrRP bylo v několika *in vivo* studiích vyloučeno, ale název peptidu zůstal.

PrRP je lineární peptid o 20 nebo 31 aminokyselinách. PrRP20 a PrRP31 mají srovnatelnou biologickou aktivitu i afinitu k receptoru označovanému jako GPR10. Vážou se i k receptoru pro neuropeptid FF (NPFF2R), ale s menší afinitou. GPR10 a NPFF2R se nacházejí v mozku v oblastech regulujících příjem potravy a jejich aktivace vede k anorexigennímu účinku^{6,7}. Velkou nevýhodou pro farmakologické využití PrRP i jiných neuropeptidů je vedle jejich malé stability v krvi hlavně nutnost jejich podání do mozku pro jejich anorexigenní účinek, neboť v přirozené formě neprocházejí po periferním podání hematoencefalickou bariérou.

Liraglutid a semaglutid jsou kvůli vyšší stabilitě v krvi lipidizovány, k modifikovanému peptidovému řetězci GLP-1 mají připojenou amidovou vazbou mastnou kyselinu⁸. Ve farmakologii se peptidy lipidizují proto, aby se v krvi navázaly na albumin, a tak se zvýšila jejich odolnost proti proteolýze a zpomalila se jejich jinak rychlá renální filtrace. Kromě toho lze předpokládat, že lipidizovaný peptid může projít z krve ke svým receptorům v hypotalamu takzvanými fenestrovanými částečně propustnými kapilárami nebo přes přenašeče v buňkách hematoencefalické bariéry. Abychom zvýšili stabilitu a dostupnost PrRP, stejně jako jeho propustnost do mozku, lipidizovali



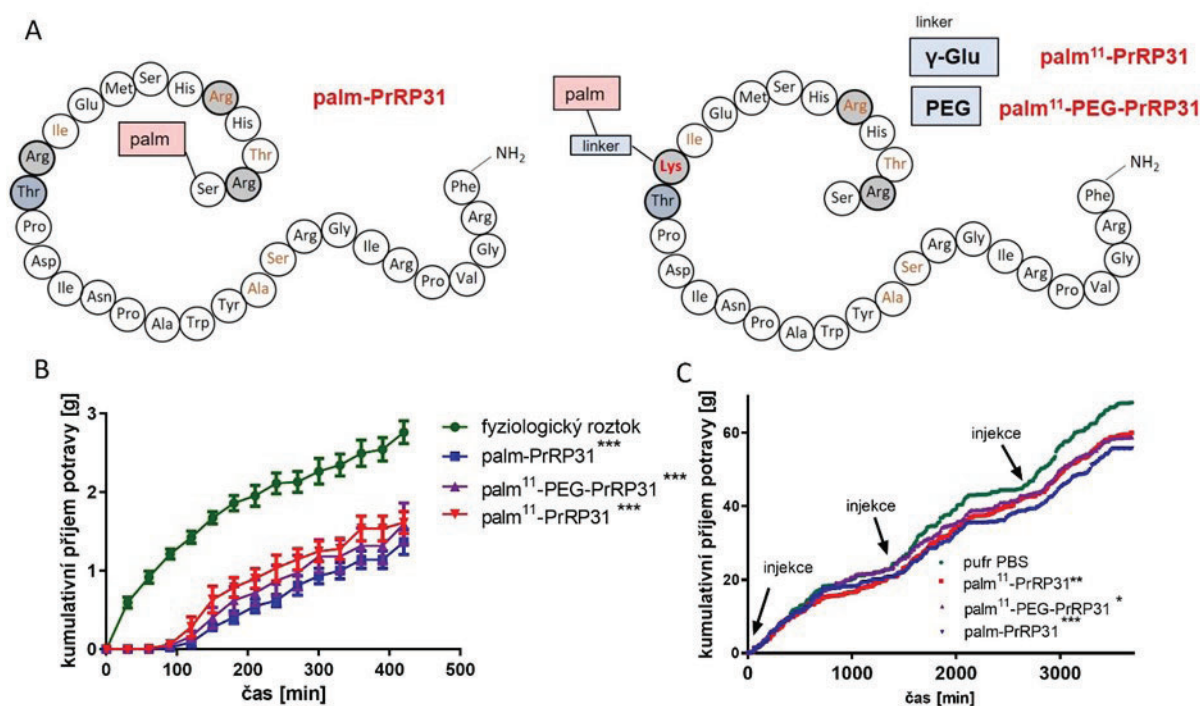
Obr. 1. Schéma vzájemných vztahů mezi centrálními a periferními faktory regulujícími příjem potravy (převzato z Mikulášková a spol.²²). Plné čáry ukazují stimulační účinek, čárkované čáry inhibiční účinek. PYY – peptid YY, PVN – paraventriculární jádro, LHA – laterální hypotalamická oblast, ARC – *nucleus arcuatus*, NTS – *nucleus solitarius*, CRH – kortikoliberin, TRH – thyrotropin uvolňující hormon, PrRP – peptid uvolňující prolaktin, MCH – hormon koncentrující melanin, NPY – neuropeptid Y, AgRP – peptid podobný agouti, CART – kokainem a amfetaminem regulovaný transkript, POMC – pro-opiomelanokortin, CCK – cholecystokinin, GLP-1 – glukagonu podobný peptid 1

jsme PrRP mastnými kyselinami různé délky⁹. PrRP31 jsme dali přednost před PrRP20 kvůli lepší rozpustnosti jeho lipidizovaných analogů. PrRP31 s kyselinou palmitovou připojenou na první aminokyselinu peptidového řetězce, palm-PrRP31, nebo jedenáctou aminokyselinu peptidového řetězce přes různé linkery, palm¹¹-PrRP31 či palm¹¹-PEG-PrRP31 (obr. 2A) se ukázaly jako nejúčinnější lipidizované analogy^{9,10}, neboť prokázaly afinitu k receptoru GPR10 a účinnost jeho aktivace v buňkách CHO-K1 stabilně transfekovaných tímto receptorem podobnou přirozenému PrRP31. Afinitu k receptoru NPFF2R a schopnost aktivovat tento receptor měly tyto palmitované analogy PrRP dokonce několikrát vyšší než přirozený PrRP31 (cit.¹¹). Tyto analogy jsou tudíž tzv. duální agonisté (signifikantně aktivní na dvou receptorech, GPR10 a NPFF2R). U těchto analogů byla také prokázána zvýšená stabilita v potkaní plazmě. Nejdůležitějším zjištěním však byla skutečnost, že subkutánní injekce palm-PrRP31, palm¹¹-PrRP31 či palm¹¹-PEG-PrRP31 hladovým myším (obr. 2B)^{9,10} nebo potkanům s volným přístupem k potravě (obr. 2C)¹² signifikantně snížila příjem potravy, zatímco přirozený PrRP takový účinek neměl. Zároveň se po subkutánním podání palm-PrRP31 nebo palm¹¹-PrRP31 v *nucleu arcuatu*, paraventriculárním jádru hypotalamu a v *nucleu solitariu*, oblastech regulujících příjem potravy, signifikantně zvýšila aktivace neuronů, která se

projevuje nárůstem proteinového produktu genu časné odpovědi *cFos* (cit.^{9,10,12}).

Když jsme analogy palm¹¹-PrRP31 podávali opakovaně několik týdnů myším s obezitou navozenou vysokotukovou dietou, která simuluje běžnou lidskou obezitu z nadměrného příjmu vysokoenergetické stravy, myši snížily příjem potravy (obr. 3A), tělesnou hmotnost (obr. 3B), množství tuku a krevní hladinu hormonu leptinu, produkovaného tukovými buňkami^{9,10}. Stejný efekt palmitovaného PrRP na snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti byl pozorován i u potkanů s obezitou navozenou vysokotukovou dietou¹³. Koncentrace leptinu v krvi se zvyšuje při sytosti a dává tak do mozku signál k produkci anorexigenních neuropeptidů. Na druhé straně je koncentrace leptinu v krvi úměrná množství tělesného tuku, a tak dochází u obézních jedinců navzdory přebytku leptinu k tzv. leptinové rezistenci.

Farmakologicky zajímavým zjištěním byl trvalý hmotnostní úbytek způsobený dvoutýdenním podáváním palm¹¹-PrRP31 myším s obezitou navozenou vysokotukovou dietou, který přetrval ještě dva týdny po ukončení léčby. Současně byla zachována i zvýšená signalizace leptinu v hypotalamu¹⁴. Takový účinek antiobezitika je významný vzhledem k tzv. jo-jo efektu, kvůli kterému může po ukončení léčby dojít k rychlému návratu k původnímu stavu.



Obr. 2. A/ Struktura nejúčinnějších palmitoylovaných analogů PrRP31 a jejich anorexigenní účinek B/ v hladových myších a C/ potkanech s volným přístupem k potravě po periferním podání (převzato z Mikulášková a spol.¹² a Pražienková a spol.¹⁰). Data byla vyhodnocována pomocí jednocestné analýzy rozptylu s následným Bonferroniho testem. Významnost byla * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ oproti fyziologickému roztoku či pufru PBS. Palm – palmitovaný, γ -Glu – kyselina gamma-glutamová, PEG – polyethylenglykol

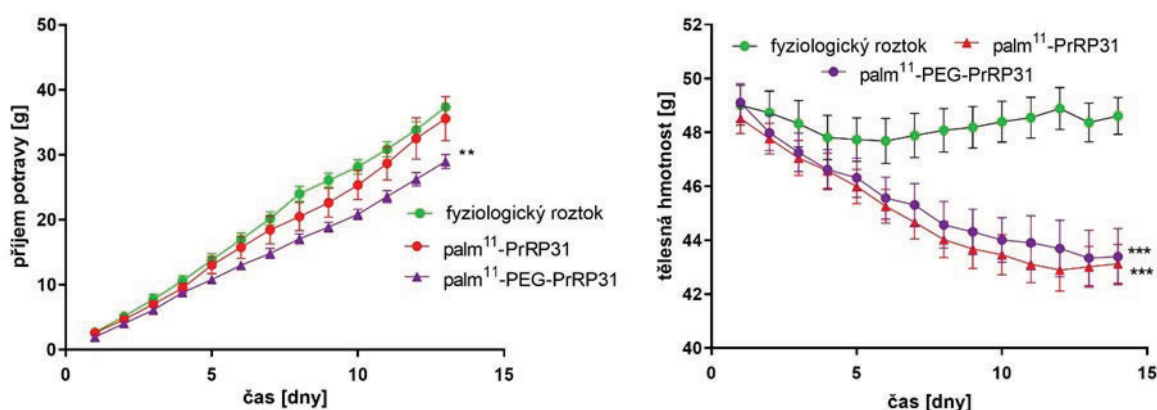
4. Antidiabetické účinky lipidizovaného PrRP

Kromě úbytku hmotnosti jsme zjistili i další významný účinek palmitovaného PrRP. Potkani s obezitou navozenou vysokotukovou dietou účinkem opakovaného podávání palmitovaného PrRP nejen snížili svou hmotnost, ale zlepšila se i jejich citlivost ke glukóze, tedy účinnost, s jakou se glukosa přenáší z krve do tkání, především svalů¹³. Chronické podávání palmitovaného PrRP zlepšilo citlivost ke glukóze i u potkanů SHROB (spontánně hypertenzních obézních nebo Koletského potkanů) s příznaky prediabetu, ale neovlivnilo jejich výraznou obezitu, která je důsledkem spontánní mutace genu leptinového receptoru¹⁵. U tzv. Zuckerových diabetických potkanů (ZDF), kteří jsou obézní kvůli jiné spontánní mutaci genu leptinového receptoru a mají rozvinutý T2D, dlouhodobě podávaný palmitovaný PrRP nevykázal ani antiobezitní, ani antidiabetický účinek¹³. Tělesnou hmotnost palmitovaný PrRP tedy snižuje, jen pokud může být aktivována leptinová signalizace, což je možné při běžné obezitě vzniklé v důsledku přejídání nebo konzumace vysokoenergetické stravy. Palmitovaný PrRP je účinný při prediabetu s mírnou hyperglykemií, kdy je přísun glukózy do tkání závislých na inzulínu (především svalů) snížen kvůli mírné inzulínové rezistenci.

Inzulínová rezistence má podobný princip jako rezistence leptinová. Ačkoli koncentrace inzulínu v krvi je vysoká, účinnost inzulínu je nízká a konečným výsledkem je zvýšená koncentrace glukózy v krvi a nedostatečný přísun glukózy do tkání. Ve svalech nedostatek glukózy znamená nedostatek substrátu pro výrobu zásobního glykogenu. Navíc inzulínová rezistence zapříčiňuje nadměrnou aktivaci enzymu GSK-3 (kinasa 3 glykogensynthasy), který je enzymem inzulínové signalizační dráhy v cílové buňce a který fosforyluje glykogensynthasu. Protože glykogensynthasa je fosforylací deaktivována, sníží se nakonec syntéza glykogenu ve svalech i nedostatečnou katalytickou účinností tohoto enzymu.

5. Neuroprotektivní účinky lipidizovaného PrRP

Inzulínová rezistence se projevuje nejen ve svalech, ale i v mozku, především v neuronech, kde rovněž umocňuje kinasovou aktivitu GSK-3, jejímž významným substrátem je strukturální protein tau. Tento protein se váže k mikrotubulům a přispívá tak ke stabilizaci neuronového cytoskeletonu. Protein tau je na několika desítkách míst fyziologicky fosforylován různými kinasami a defosforylován fosfatasami. GSK-3 naneštěstí fosforyluje protein



Obr. 3. Účinek analogů PrRP31 palmitovaných v pozici 11 u myši s dietou indukovanou obezitou na A/ příjem potravy a B/ hmotnost myši (převzato z Pražienková a spol.¹⁰). Data byla vyhodnocována pomocí jednocestné analýzy rozptylu s následným Bonferroniho testem. Významnost byla ******P < 0,01 a *******P < 0,001 oproti fyziologickému roztoku

tau právě na epitopech nezbytných pro jeho vazbu k mikrotubulům, a proto je její nadměrná aktivace nežádoucí¹⁶. Když se hyperfosforylovaný protein tau odpoutá od mikrotubulů, vytváří párová šroubovicová vlákna, a ta dále agregují v toxické neurofibrilární spleti, které se nacházejí u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Alzheimer's disease, AD).

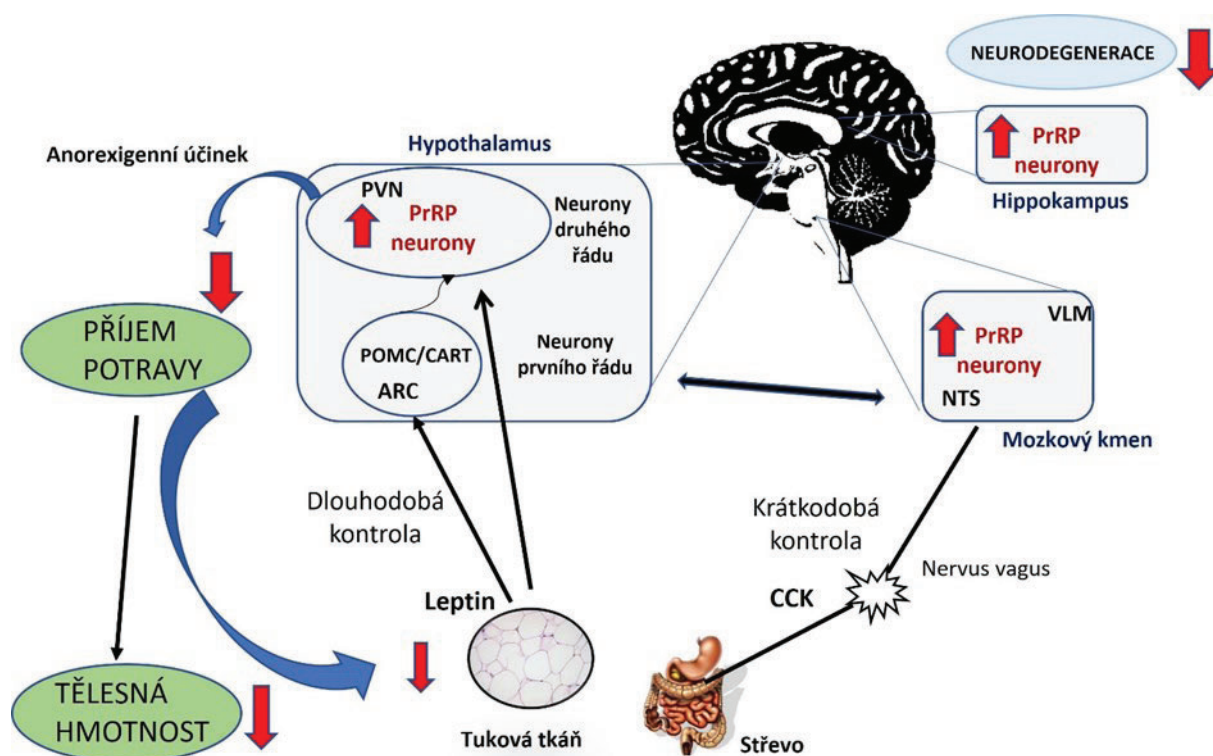
V poslední době se intenzivně studuje příčina častějšího výskytu AD u jedinců s T2D. Zuckerovi *fa/fa* potkani mají rozvinutou inzulinovou rezistenci, a proto jsme předpokládali, že jejich silná periferní inzulinová rezistence se projeví i v neuronech v mozku, kde by mohla vést k patologické hyperfosforylaci proteinu tau. Náš předpoklad se ukázal jako správný, Zuckerovi potkani měli sníženou aktivitu inzulinové signální dráhy v hipokampu, části mozku zásadní pro učení a paměť. Tato inzulinová rezistence v hipokampu je příčinou nadměrné aktivace GSK-3, kinasy fosforylující protein tau, a následné patologické hyperfosforylace tohoto proteinu. Tyto patologické jevy se očekávaně ještě zvýraznily ve vyšším stáří potkanů, neboť u AD je zásadním rizikovým faktorem stáří¹⁷.

Vhodným modelem s prediabetem a předpokládanou centrální inzulinovou rezistencí pro sledování účinků palmitovaného PrRP byly myši s tzv. obezitou navozenou glutamátem, která se navodí myším brzy po jejich narození opakovaným injikováním glutamátu sodného (monosodium glutamate, MSG), který výlučně v hypotalamu způsobí nadměrnou excitaci neuronů a následné léze. Ty jsou pak příčinou poruchy kontroly příjmu potravy a z ní plynoucí mohutné obezity a prediabetu. Nejdříve jsme prokázali, že tyto obézní prediabetické myši mají v hipokampu současně sníženou inzulinovou signalizaci i zvýšenou patologickou hyperfosforylaci proteinu tau. Po dvou týdnech subkutánního podávání palmitovaného PrRP půlročním myším s obezitou navozenou MSG jsme zjistili zlepšení inzulinové signalizace a snížení patologické fosforylace proteinu tau¹⁸.

Modelem patologické fosforylace proteinu tau jsou THY-Tau22 myši, které v neuronech CNS mají vložený gen lidského mutovaného proteinu tau náchylného k hyperfosforylaci na epitopech relevantních s AD. Dvouměsíční subkutánní infúze palmitovaného PrRP od sedmi měsíců věku zlepšila těmto myším prostorovou paměť v bludišti Y a snížila hyperfosforylaci hipokampálního proteinu tau na některých významných epitopech. Kromě toho se v hipokampu zvýšila koncentrace proteinu postsynaptické hustoty PSD95, takže se dá předpokládat zlepšení synaptické plasticity¹⁹. Mechanismus pozitivního účinku palmitovaného PrRP na tau patologii v tomto modelu ale zatím neznáme.

Kromě hyperfosforylovaného proteinu tau a jeho následných intracelulárních agregátů je známkou AD tvorba extracelulárních senilních plaků β -amyloidního peptidu (A β), který se vyštěpuje z amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Mutace v lidském APP a rovněž presenilinu 1 (PS1), které byly zjištěny u pacientů s časným začátkem AD, byly využity v myším modelu dvojité transgenické myši APP/PS1, u kterých jsou oba mutované proteiny produkovány v neuronech CNS. Presenilin je součástí γ -sekretasy, enzymu, který štěpí APP, a výše zmíněné mutace podporují štěpení APP na toxický A β . Dvouměsíční podávání palmitovaného PrRP APP/PS1 myším od sedmi měsíců věku snížilo v hipokampu výskyt A β plaků i aktivovaných mikroglíí a astrocytů, nositelů chronického zánětu. Zároveň se v hipokampu zvýšila koncentrace doublekortinu považovaného za ukazatel neurogenese²⁰. Navazující práce demonstrovala podobný účinek palmitovaného PrRP v mozečku, kde snižoval incidenci A β plaků i mikroglíí²¹. Mechanismus snížení neuroinflamace a zvýšení neurogenese účinkem palmitovaného PrRP je předmětem dalšího studia.

Palmitované analogy PrRP tedy potvrdily neuroprotektivní účinky v několika myších modelech neurodegenerace.



Obr. 4. Schéma potenciální úlohy PrRP a jeho analogů v regulaci příjmu potravy a neurodegeneraci a jejich interakce s leptinem a cholecystokininem (CCK) (převzato z Kuneš a spol.²³). ARC – *nucleus arcuatus*, NTS – *nucleus solitarius*, PVN – *paraventriculární jádro*, VLM – *ventrolaterální medula*. CART – kokainem a amfetaminem regulovaný transkript, POMC – *pro-opiomelanokortin*, PrRP – *peptid uvolňující prolaktin*

6. Závěr

Lipidizace anorexigenního neuropeptidu PrRP vedla ke stabilizaci peptidu a dále k možnosti centrálního účinku po periferním podání. Afinita k receptoru GPR10 zůstala zachována a afinita i aktivita na receptoru NPFF2R se významně zvýšila, takže můžeme látky považovat za duální agonisty, neboť oba receptory přispívají k biologickému účinku palmitovaného PrRP.

Palmitované analogy PrRP31 prokázaly silný anti-obezitní, antidiabetický i neuroprotektivní účinek v myších a potkaních modelech. Důležitou podmínkou jejich účinku je neporušená leptinová signální dráha v buňce. Schéma účinků palmitovaných analogů PrRP je na obr. 4. Látky mají tedy značný terapeutický potenciál a v roce 2017 byla podepsána licenční smlouva s firmou Novo Nordisk, kde probíhá další vývoj látek.

Tato práce byla podpořena Akademií věd České republiky (RVO:67985823 and RVO:61388963), projektem Národního programu obnovy CarDia (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104 – Funded by the Eu-

ropean Union – Next Generation EU) a výzkumným grantem od firmy Novo Nordisk.

LITERATURA

1. WHO: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1, staženo 27. 9. 2023.
2. Alkhezi O. S., Alahmed A. A., Alfayez O. M., Alzuman O. A., Almutairi A. R., Almohammed O. A.: *Obes. Rev.* 24, e13543 (2023).
3. van der Klaauw A. A.: *Clin. Chem.* 64, 173 (2018).
4. Royalty J. E., Konradsen G., Eskerod O., Wulff B. S., Hansen B. S.: *J. Clin. Pharmacol.* 54, 394 (2014).
5. Hinuma S. a 14 spoluautorů: *Nature* 393, 272 (1998).
6. Lawrence C. B., Celsi F., Brennan J., Luckman S. M.: *Nat. Neurosci.* 3, 645 (2000).
7. Ma L., MacTavish D., Simonin F., Bourguignon J. J., Watanabe T., Jhamandas J. H.: *Eur. J. Neurosci.* 30, 1585 (2009).
8. Knudsen L. B., Lau J.: *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 155 (2019).

9. Maletinska L. a 13 spoluautorů: *Int. J. Obes. (Lond.)* 39, 986 (2015).
10. Pražienková V. a 12 spoluautorů: *PLoS One* 12, e0183449 (2017).
11. Karnosova A., Strnadova V., Hola L., Zelezna B., Kunes J., Maletinska L.: *Int. J. Mol. Sci.* 22, (2021). doi: 10.3390/ijms22168904.
12. Mikulaskova B., Zemenova J., Pirmik Z., Prazienkova V., Bednarova L., Zelezna B., Maletinska L., Kunes J.: *Peptides* 75, 109 (2016).
13. Holubova M., Zemenova J., Mikulaskova B., Panajotova V., Stohr J., Haluzik M., Kunes J., Zelezna B., Maletinska L.: *J. Endocrinol.* 229, 85 (2016).
14. Holubova M., Hrubá L., Neprasova B., Majercikova Z., Lacinova Z., Kunes J., Maletinska L., Zelezna B.: *J. Mol. Endocrinol.* 60, 85 (2018).
15. Mikulaskova B., Holubova M., Prazienkova V., Zemenova J., Hrubá L., Haluzik M., Zelezna B., Kunes J., Maletinska L.: *Nutr. Diabetes* 8, 5 (2018).
16. Singh T. J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K.: *J. Neurochem.* 64, 1420 (1995).
17. Spolcova A., Mikulaskova B., Krskova K., Gajdosechova L., Zorad S., Olszanecki R., Suski M., Bujak-Gizycka B., Zelezna B., Maletinska L.: *BMC Neurosci.* 15, 111 (2014).
18. Spolcova A., Mikulaskova B., Holubova M., Nagelova V., Pirmik Z., Zemenova J., Haluzik M., Zelezna B., Galas M. C., Maletinska L.: *J. Alzheimer's Dis.* 45, 823 (2015).
19. Popelová A. a 11 spoluautorů: *J. Alzheimer's Dis.* 62, 1725 (2018).
20. Holubova M. a 11 spoluautorů: *Neuropharmacology* 144, 377 (2019).
21. Menger A., Hrubá L., Exnerova A., Holubova M., Popelova A., Zelezna B., Kunes J., Maletinska L.: *Curr. Alzheimer Res.* 18, 607 (2021).
22. Mikulaskova B., Maletinska L., Zicha J., Kunes J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 436, 78 (2016).
23. Kunes J., Prazienkova V., Popelova A., Mikulaskova B., Zemenova J., Maletinska L.: *J. Endocrinol.* 230, R51 (2016).

B. Železná, A. Pačesová, V. Strnadová, J. Kuneš, and L. Maletinská (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Prolactin-Releasing Peptide, a Peptide with an Improper Name, but Proper Biological Activity for Obesity, Type-2 Diabetes, and Alzheimer's Disease Treatment**

Obesity is an escalating epidemic, but an effective non-invasive therapy is still scarce. For the obesity treatment, anorexigenic neuropeptides represent promising

tools, but their delivery from the periphery to the brain is complicated because peptides have a low stability and limited ability to cross the blood-brain barrier.

Recently discovered anorexigenic neuropeptides, such as prolactin-releasing peptide, represent new trends in development of anti-obesity agents. They are released and acting directly in brain areas regulating food intake, but generally do not cross the blood-brain barrier if administered peripherally. We succeeded to design stable palmitoylated analogs of this neuropeptide with a prolonged acute anorexigenic effect after peripheral administration as shown in mice and rats. Repeated peripheral administration of the lipidized prolactin-releasing peptide analogs resulted in long-lasting anti-obesity and antidiabetic effects in rodent models of diet-induced obesity and insulin resistance. We proved that lipidation might be an effective way to transmit the desired effect to the central nervous system after peripheral administration, for a potential treatment of obesity and related complications such as type2 diabetes.

Besides the advanced age, type 2-diabetes and obesity were shown to be risk factors for Alzheimer's disease; therefore, compounds with glucose-lowering and/or anorexigenic properties were proposed to be neuroprotective. In our group, we studied a possible crosstalk between obesity, type-2 diabetes and Alzheimer's-like pathology. We also investigated if our novel palmitoylated analogs of prolactin-releasing peptide could have beneficial effect on neurodegeneration in several mouse models of Alzheimer's-like pathology and their age-matched wild type controls. We demonstrated that these lipidized analogs are potentially neuroprotective substances improving spatial memory, neurogenesis, synaptogenesis and attenuating neuroinflammation and two hallmarks of Alzheimer's disease, i.e., tau hyper-phosphorylation and β -amyloid plaques in different mouse models of Alzheimer's-like neurodegeneration.

Keywords: prolactin-releasing peptide, PrRP, anorexigenic neuropeptide, lipidation, leptin, obesity, insulin resistance, prediabetes, Alzheimer's disease

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Academy of Sciences (RVO:67985823 and RVO:61388963) and by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU. Novo Nordisk A/S supported the study with research funding.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

ROLE PERMEAČNÍCH TESTŮ *IN VITRO* V PREKLINICKÉM VÝZKUMU POTENCIÁLNÍCH LÉČIV

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

HELENA MERTLÍKOVÁ-KAISEROVÁ

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

Došlo 2.10.23, přijato 7.11.23.

Testy membránové permeability patří společně s testy metabolické stability a stanovením rozpustnosti mezi základní pilíře časných fází vývoje nových léčiv. Pro většinu terapeutických indikací je potřeba, aby látka na své cestě k cílové tkáni, receptoru, enzymu překonala i několik biologických bariér, aniž by se přitom extenzivně biotransformovala. K vyšetřování permeability je k dispozici řada nástrojů, své nezastupitelné místo zde mají buněčné testy. Nejčastěji se používají zjednodušené dvoukómpartmentové systémy, tzv. „Transwelly“, kde je na pomezí obou oddílů nosič s umělou lipidovou dvouvrstvou nebo monovrstvou těsně přiléhajících buněk. K dispozici jsou i mnohem sofistikovanější nástroje, kokultury více buněčných typů, případně 3D dynamické modely na čipu, jejich širšímu použití však brání časová i finanční náročnost. V základních testovacích cyklech, kde se pracuje s velkým množstvím látek, se proto nejčastěji uplatňuje Caco-2 nebo MDCK test.

Klíčová slova: ADME, permeabilita, absorpce, biologická dostupnost, Caco-2, hematoencefalická bariéra, MDCK

Obsah

1. Úvod
2. Výpočetní přístupy k predikci permeability
3. PAMPA – indikátor pasivního transportu
4. Caco-2 – predikce perorální biodostupnosti
5. Modely permeace přes hematoencefalickou bariéru
6. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích jsme byli svědky významného rozšíření miniaturizace a automatizace v procesu systematického vyhledávání bioaktivních látek, tzv. testování s vysokou propustností (High-Throughput Screening, HTS)¹. To, co bývalo doménou velkých farmaceutických firem, je dnes možné realizovat na řadě akademických pracovišť. V kombinaci se snadnou dostupností knihoven látek – ať už menších knihoven originálních látek, jakou je např. ÚOCHB knihovna čítající k dnešnímu dni okolo devíti tisíc látek nebo řádově větších komerčních knihoven – dochází průběžně k identifikaci velkého množství látek, které vykazují vysokou aktivitu vůči zvolenému zásahovému místu s cílem ovlivnit patofyziologické procesy v organismu. Vzniká tak potřeba vybrané molekuly dále filtrovat. Druhým krokem ve vývoji je obvykle ověření biologické aktivity nezávislou, tzv. ortogonální metodou, optimálně buněčnou (pokud nebyl buněčný test primární metodou). Výrazný pokles aktivity při přechodu na

vání s vysokou propustností (High-Throughput Screening, HTS)¹. To, co bývalo doménou velkých farmaceutických firem, je dnes možné realizovat na řadě akademických pracovišť. V kombinaci se snadnou dostupností knihoven látek – ať už menších knihoven originálních látek, jakou je např. ÚOCHB knihovna čítající k dnešnímu dni okolo devíti tisíc látek nebo řádově větších komerčních knihoven – dochází průběžně k identifikaci velkého množství látek, které vykazují vysokou aktivitu vůči zvolenému zásahovému místu s cílem ovlivnit patofyziologické procesy v organismu. Vzniká tak potřeba vybrané molekuly dále filtrovat. Druhým krokem ve vývoji je obvykle ověření biologické aktivity nezávislou, tzv. ortogonální metodou, optimálně buněčnou (pokud nebyl buněčný test primární metodou). Výrazný pokles aktivity při přechodu na



PharmDr. Helena Mertlíková-Kaiserová, Ph.D. je absolventkou Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kde rovněž získala doktorát. Během něj se věnovala problematice kardiotoxicity antracyklinových cytostatik a možnostmi její prevence pomocí nízkomolekulárních chelátorů železa. Část doktorského studia strávila na Maastrichtské univerzitě v Nizozemí. V roce 2007 získala Cenu ministra školství za mimořádné studijní výsledky a tvůrčí činnost v oboru Patobiochemie a xenobiochemie. Téhož roku nastoupila na ÚOCHB AVČR, kde začínala ve skupině prof. Holého a od roku 2010 je vedoucí samostatné vědecko-servisní skupiny Biochemická farmakologie, kde působí dodnes. Usiluje o poskytování kvalitní biologické podpory medicíně v rámci cílených programů lékového výzkumu, především se zaměřením do onkologie, virologie a neurovědy.

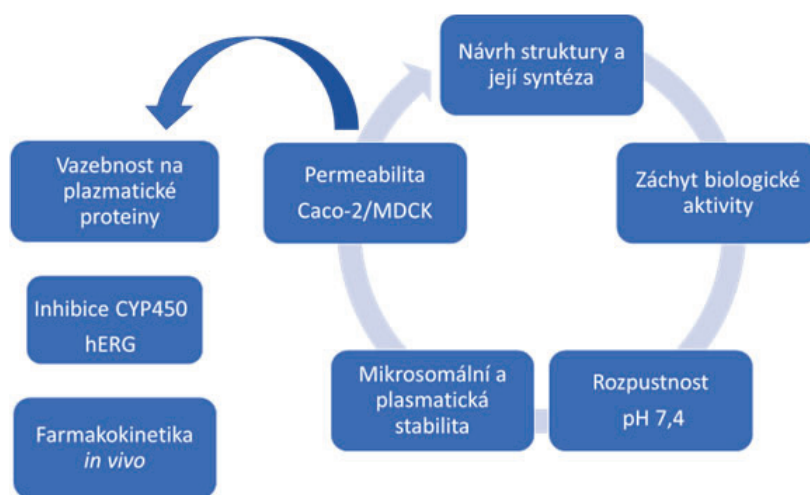
celobuněčnou úroveň může upozornit na látky s potenciálním problémem, jakým je např. extenzivní biotransformace nebo obtížný přístup látky přes membrány. Rozklíčování těchto mechanismů pouze na základě biologické aktivity není přímočaré a pro syntetické optimalizace struktury je nedostačující. Proto se do základního testovacího cyklu projektů lékového výzkumu (obr. 1) zařazuje baterie testů definujících chování látky v organismu, tj. Absorpci – Distribuci – Metabolismus – Eliminaci, zkráceně ADME (cit.²). Tyto metody zahrnují především metabolickou stabilitu, membránovou permeabilitu a rozpustnost, a to na úrovni *in vitro*. Použití experimentálních zvířat má být striktně vyhrazeno pro jednotky látek, které úspěšně prošly všemi předem stanovenými testy „ve zkumavce“. Soubor jednotlivých parametrů a jejich hraniční hodnoty jsou projektově specifické s ohledem na zamýšlený způsob podání, místo účinku, nutnost bioaktivační případných proléčiv apod. Obvykle jsou shrnuty v dokumentu označovaného jako CDTP (Candidate Drug Target Profile), kde je zohledněna nejen vlastní aktivita molekuly vůči zásahovému místu v primárním a sekundárním screeningu, ale také soubor žádaných vlastností ADME s ohledem na zamýšlený způsob podání (perorálně či parenterálně).

Absorpci látek podmiňují především vlastnosti definované v tzv. biofarmaceutickém klasifikačním systému (BCS)³, který třídí látky na základě rozpustnosti a permeability, případně také disoluce (uvolňování z léčivého přípravku) do čtyř tříd (I–IV), obr. 2. Tento systém slouží k predikci perorální biodostupnosti a umožňuje za podmínek definovaných v evropské normě ICH M9 (cit.⁴) vynechat bioekvivalenční studie *in vivo* za předpokladu, že existují robustní *in vitro* data dokládající výše uvedené vlastnosti substance. Optimální biologickou dostupnost a dobrou korelaci *in vitro* a *in vivo* účinku (IVIVC) lze

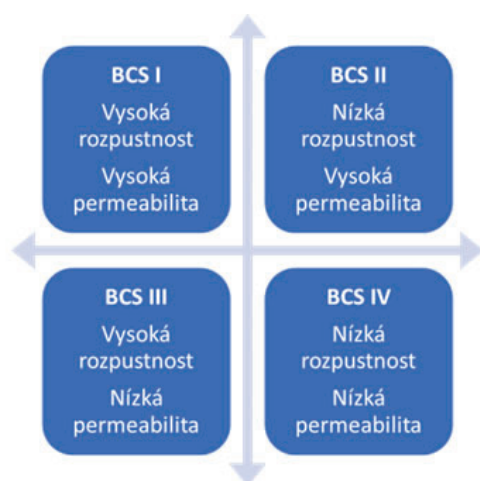
očekávat u látek zařazených ve třídě I, naproti tomu třída IV bude vykazovat nejmenší korelaci IVIVC. U tříd II–IV je možné zlepšení vlastností pomocí vhodné technologické formulace léčiva (např. liposomální enkapsulace, dispergace apod.).

Metabolickou stabilitu a rozpustnost je možné vyšetřovat poměrně rychle a s nízkými náklady, což je pro dynamické projekty lékového výzkumu naprosto zásadní. Rozpustnost ve vodných roztocích se v drtivé většině případů stanovuje tzv. kinetickou metodou (ze zásobního DMSO roztoku), která má proti fyziologicky relevantnější termodynamické rozpustnosti (z prášku) tu výhodu, že kromě rychlosti provedení spotřebovává významně menší množství testované látky⁵. Metabolická stabilita je charakterizována především stabilitou látky v jaterních mikrosomech a v plasmě^{6,7}. Díky dostupnosti kvalitních komerčních enzymových preparátů odpadá dříve běžná nutnost zdoluhavé izolace preparátů z živočišných tkání – převážně laboratorních myší a potkanů – a zvyšuje se výpočetní hodnota testů. Dále k ní přispívá i spojování vzorků z desítek jedinců (tzv. pooling), kdy výsledný směsný vzorek mnohem lépe reprezentuje reálnou populaci. Specializované firmy významně zvýšily širokou dostupnost dříve vzácného materiálu – dnes není problém za rozumnou cenu sehnat i lidské, opičí nebo psí mikrosomy, z jaterní, ale i střevní nebo ledvinové tkáně, přičemž testování na minimálně jednom nehlodavčím modelu je dnes běžně vyžadováno již v raných fázích vývoje. Podobné principy jsou uplatňovány i při hodnocení stability látek v plasmě. Je známo, že např. myší plasma má vyšší hydrolysovací aktivitu proti jiným species⁸.

V dalším textu bych se ráda soustředila především na testy sloužící k hodnocení schopnosti látek procházet přes biologické bariéry. Paleta permeačních testů je velice široká v závislosti na tom, zda sledujeme primárně absorpci



Obr. 1. Typizované schéma projektu lékového výzkumu v časně fázi, jehož základ tvoří opakování (iterace) několika základních testů



Obr. 2. Čtyři třídy biofarmaceutického klasifikačního systému založené na kombinaci rozpustnosti a permeability látek

látek ve střevě, přístup přes hematoencefalickou bariéru mozku nebo přechod přes kůži (transdermální terapeutické systémy). Drtivá většina těchto testů zahrnuje buněčné modely, mnohdy vyžadující i několikadenní přípravu. Jedná se tedy o pokročilejší, materiálově i časově náročnější testy. Jejich hodnota je však natolik vysoká, že bývají v některé své formě zařazovány již do velmi raných fází testování potenciálních léčiv.

2. Výpočetní přístupy k predikci permeability

Podobně jako pro řadu dalších parametrů, i pro vyšetřování permeability byly vyvinuty různé výpočetní přístupy, z nichž většina využívá kvantitativní vztahy mezi strukturou a permeabilitou (QSPR)⁹. Zásadním faktorem v těchto studiích je lipofilita, charakterizována rozdělovacím koeficientem oktanol-voda – logP. Prediktivní hodnota těchto modelů je významně závislá na struktuře konkrétní látky, což mírně snižuje jejich hodnotu pro praxi. Přesnější, ale výpočetně náročnější *in silico* techniky využívají molekulární dynamiku¹⁰, kdy umožňují věrně odhadnout pasivní permeační profil látek a obecně dobře korelují s empirickými testy typu PAMPA (viz níže). Popis aktivních transportních mechanismů sice výpočetní aplikace umožňují také, ale v praxi bývají často v rozporu s realitou pozorovanou experimentálně¹¹ a opatrnost při interpretaci softwarem generovaných dat z buněčných testů je rozhodně namístě. S dalším rozvojem umělé inteligence budou bezpochyby *in silico* modely postupně dále vylepšovány.

3. PAMPA – indikátor pasivního transportu

Nejjednodušší *in vitro* permeační test je založený na pasivní difuzi látky skrze uměle připravenou membránu usazenou na porézním filtru. PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) představuje dvoukompartimentový systém, zasazený obvykle do 96jamkové destičky, kdy se testovaná látka aplikuje do spodní donorové části a membrána s akceptorem se umístí přes ni a společně vytvoří tzv. sendvič. Inkubace může nebo nemusí zahrnovat míchání, to nicméně zabraňuje tvorbě nefyziologických koncentračních gradientů. PAMPA test ve své nejjednodušší podobě je tvořen kompartmenty o stejném pH a je oddělen jednoduchou membránou např. na bázi hexadekanu (bez přítomnosti fosfolipidů) nebo dodekanu, v němž je rozpuštěn diolelyfosfatidylcholin¹². Postupem času doznal i PAMPA test řady změn, ať už jde o sofistikovanější složení lipidové vrstvy (negativní náboj) nebo použití pufrů o různém pH v jednotlivých kompartmentech, což lépe vystihuje situaci v organismu. Kombinace specifických podmínek lipidového složení a pH dala vzniknout modifikacím, jako jsou PAMPA-GIT, PAMPA-HEB nebo skin-PAMPA, napodobující přístup přes střevní, hematoencefalickou, resp. kožní bariéru. Vysokou reproductivností mezi experimenty se vyznačují komerční předpřipravené zamražené destičky (např. Corning® Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System), které jsou po ekvilibraci při laboratorní teplotě připraveny rovnou k použití, což šetří čas a umožňuje větší flexibilitu v plánování experimentů.

Nespornou výhodou PAMPA proti buněčným testům je vysoká propustnost (throughput). Dále je to vyšší odolnost vůči rozpouštědlům, což umožňuje testování vyšších koncentrací látek. To je obzvláště výhodné v případech, kdy máme co do činění s obtížnějšími analyty. Jako příklad můžeme uvést mnohé látky steroidního charakteru, které typicky špatně ionizují při použití elektrospreje¹³, který je v současných hmotnostních spektrometrech nejčastěji využívaným iontovým zdrojem. Při použití testovacích koncentrací obvyklých v buněčných testech (jednotky μM), se v důsledku nedostatečné ionizace látek v akceptorovém kompartmentu snadno dostaneme pod detekční limit analytické metody.

Vzhledem k absenci proteinových transportérů ve všech těchto modelech neumožňuje PAMPA posouzení aktivního transportu, který může být v některých případech převažujícím způsobem vstupu látek do buňky. Mnohé látky mohou být naopak proteinovými přenašeči aktivně vypuzovány proti směru koncentračního gradientu ven z buňky. Přes to všechno představuje PAMPA užitečný test v případech, kdy je potřeba rychle a s nízkými náklady otestovat velké série látek.

4. Caco-2 test – predikce perorální biodostupnosti

Zlatým standardem v oblasti hodnocení membránové permeability zůstává Caco-2 test, který je hojně využíván i ve firemním farmaceutickém výzkumu. Uspořádání experimentu je ve své podstatě podobné jako v případě PAMPA testu. Na rozdíl od něj není donorová a akceptorová část systému oddělena umělou membránou, ale permeabilním nosičem označovaným též jako kultivační vložka (insert). Na ni je nanášena suspenze epiteliálních střevních buněk odvozených od adenokarcinomové buněčné linie Caco-2, jež za určitých podmínek vytvoří souvislou monovrstvu s charakteristickými vlastnostmi¹⁴. Teprve pak je tento tzv. „Transwell“ (obr. 3) kompletní. Použití neomezeně se dělicí buněčné linie umožňuje snadnou propagaci buněk v potřebném množství, chybí jí však fenotyp terminálně diferencovaných enterocytů. Po nanášení na nosič je proto nutné buňky volbou vnějších podmínek přimět k diferenciaci. Diferencovaná buňka se polarizuje, tzn. lze rozlišit její apikální část (A, fyziologicky směrem do střevního lumen) a bazolaterální část (B, fyziologicky směrem do krevního řečiště). Unikátní vlastnosti obou buněčných pólů pak umožňují sledovat transport látek v jednom i druhém směru (A-B, B-A). Pokud je transport ve směru B-A významně větší než A-B, signalizuje to, že testovaná látka je substrátem tzv. efluxních pump¹⁵, což je jedna z častých příčin nízké biodostupnosti látek po perorálním podání.

Diferenciační protokoly

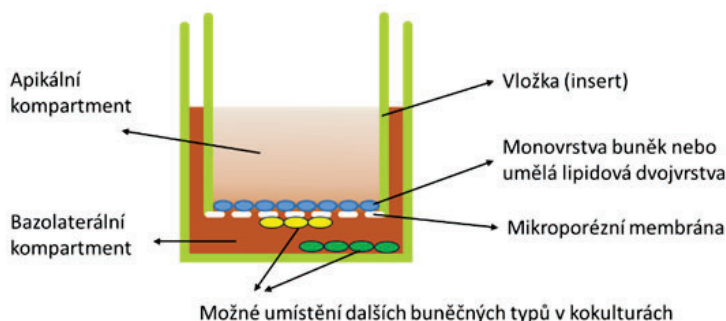
Caco-2 buňky lze diferencovat několika způsoby. Pokud buňky ponecháme dorůst do konfluency (tj. stavu, kdy je porostlá celá plocha kultivační nádoby), pak zhruba po 21 dnech diferencují spontánně. Nevýhodou tohoto přístupu je nutnost pravidelné výměny živného média v obou kompartmentech systému (3× do týdne). To s sebou nese kromě časové a finanční zátěže i zvýšené riziko kontaminace. Takto utvořená monovrstva je ale vysoce kvalitní a navzdory nepříznivému časovému hledisku je využívána i většinou komerčních firem. Aby se takto při-

pravené buňky využily na maximum, byly publikovány i snahy o recyklaci monovrstev po vymytí testovaných látek a jejich opětovné využití pro návazný experiment¹⁶. Jelikož je příprava buněk pro Caco-2 transportní experiment opravdu zdoluhavá, byly vyvinuty i uživatelsky příjemnější, zkrácené protokoly. Komerčně dostupným řešením je např. souprava BioCoat[®] HTS 1.0 μ m Caco-2 Assay System od firmy Corning. Kromě potřebného plastiku dostane uživatel i sadu médií vhodných pro nasazení buněk na inserty a pro následnou diferenciaci. Díky použití suplementu MITO+ patentovaného složení je dosaženo diferenciaci buněk do 3 dnů. Přestože existují publikace poukazující na srovnatelné výsledky 3denní zrychlené a 21denní spontánní diferenciaci¹⁷, řada laboratoří dává přednost standardnímu protokolu s odkazem na vyrovnanější výsledky takto provedených testů. Nevýhodou komerční soupravy je, že po přidání suplementu do diferenciacího média má toto kompletní médium garantovanou stabilitu pouze 3 týdny. Pro menší laboratoře s nižší propustností je obtížné médium během této doby spotřebovat. Postupně klesající množství růstových faktorů v médiu může být jednou z příčin variability.

Další možností zrychlené diferenciaci je inkubace Caco-2 buněk s nízkou (submikromolární) koncentrací puromycinu. Tento protokol byl popsán v roce 2013 Sevinem¹⁸ a diferenciaci zde trvá 6–7 dnů, což je stále velmi příznivá doba proti standardnímu postupu. Na rozdíl od komerčních souprav uvedených výše je puromycinová diferenciaci dostupnější. Limitujícím faktorem pak zůstává už jen cena plastiku, která ovšem také není zanedbatelná – částečně i díky omezenému počtu výrobců na trhu. Navzdory své jednoduchosti a rychlosti se puromycinová varianta protokolu příliš nerozšířila, i když minimálně jedna z evropských firem komerčně dodávajících ADME data, jej adoptovala.

Kvantitativní hodnocení permeace látek

Vlastní transportní experiment trvá zpravidla dvě nebo tři hodiny (někdy se provádí i časová závislost). Začíná aplikací roztoku látky o definované koncentraci do apikálního (donorového) kompartmentu, přičemž



Obr. 3. Obecné schéma Transwellového permeačního systému

v bazolaterálním (akceptorovém) kompartmentu je čistý transportní pufr. V čase 0 se z donoru ihned odebere vzorek pro pozdější stanovení počáteční koncentrace látky C_0 . Na konci inkubace se odebere vzorek z obou kompartmentů. Ve všech vzorcích se stanoví koncentrace parentní látky, nejčastěji metodou LC/MS. Výpočet permeačního koeficientu P_{app} je pak definován rovnicí:

$$P_{app} = (dQ/dt)/C_0 \cdot A$$

kde dQ/dt vyjadřuje rychlost průniku látky přes buňky, C_0 je koncentrace v donorovém kompartmentu v čase 0 a A je plocha filtru (monovrstvy). Efluxní index je pak vyjádřen poměrem $(P_{app} B-A) / (P_{app} A-B)$. Součástí výstupu každého permeačního testu je obvykle i informace o výtěžnosti (%). Ta je definována jako poměr celkové koncentrace látky na konci pokusu (v donoru i akceptoru) a počáteční koncentrace látky do pokusu vložené. Pokud je výtěžnost velmi nízká, může to signalizovat nízkou rozpustnost látek, jejich metabolizaci při průchodu buněčnou monovrstvou nebo adsorpci na plastik. Tyto procesy je možné dále vyšetřovat specifickými postupy, ale s výjimkou rozpustnosti se to rutinně nedělá. K výtěžnosti je ale dobré přihlídnout při interpretaci dat, kdy výrazně nízká hodnota poněkud oslabuje výpovědní hodnotu testu.

Kontrola kvality

V případě buněčných permeačních testů je mnohem víc než u jiných ADME testů důležitá kontrola kvality. Obvykle je víceúrovňová, jelikož i drobná nedokonalost buněčné monovrstvy bude mít zásadní vliv na hodnotu permeačního koeficientu (P_{app}). Dobrou laboratorní praxí je používat buňky v rozmezí určitých pasáží¹⁹ – hranice není jasně daná, některé laboratoře používají nižší pasáže, jiné vyšší, ale vždy platí, že pro konzistentní výsledky je dobré se držet pravidla, že zhruba po 20 pasážích se buňky obmění.

Po proběhlé diferenciaci Caco-2 buněk se zpravidla hodnotí transepiteliální odpor (tzv. TEER) v každé jednotlivé jamce. K tomuto účelu slouží speciální elektrody, z nichž jedna je zanořena do kapaliny v apikální části a druhá v bazolaterální části. Nepoškozená monovrstva se správně vytvořenými těsnými spoji (tight junctions) má vysoký odpor, tedy nízkou konduktivitu. Hodnota TEER zohledňuje také velikost plochy, na které buňky rostou, mezní hodnoty pro kvalifikaci jamky se v literatuře liší, případně nejsou uvedeny vůbec, výrobci souprav uvádějí jako minimum hodnoty 250–350 $\Omega \text{ cm}^2$. Dalším markerem integrity monovrstvy je míra permeace fluorescenční sondy typu Lucifer Yellow (LY), která za normálních okolností přes Caco-2 buňky neprochází. Pokud ano, je to známka paracelulárního transportu, tedy průchodu mezi-buněčným prostorem mezi buňkami²⁰. Tento test se nejčastěji provádí *ex post* po proběhlém transportním experimentu a zachytí tak i případné toxické účinky látek na buňky, které hodnoty permeačního koeficientu kompromitují. Výhodou je, že přístup LY je možné rychle a pohodlně měřit běžnými destičkovými čtečkami. Některé protokoly přidávají LY přímo do transportního experi-

mentu spolu s testovanými látkami, čímž se šetří čas a případné problémy se okamžitě vizualizují, na druhou stranu nelze zcela vyloučit interferenci s transportovanými látkami. Posledním krokem v kontrole kvality je zařazení alespoň dvou (lépe tří) referenčních látek, u nichž je permeační koeficient znám a naměřené hodnoty lze porovnat s tabelárními hodnotami. Obvykle se volí látka s nízkou propustností (např. atenolol, $P_{app} < 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) a látka s vysokou propustností (např. propranolol, $P_{app} > 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). V případě, vyšetřování obousměrného transportu se pak přidávají referenční látky s různě vysokými hodnotami efluxního indexu (např. chinidin, digoxin)¹³.

Navzdory obecným pokrokům v automatizaci a miniaturizaci, Caco-2 test ve svém nejobvyklejším formátu je ve většině laboratoří stále prováděn ve 24jamkovém formátu. Z velké části je to dáno tím, že 24jamkový formát umožňuje manuální měření TEER pomocí malého a cenově dostupného laboratorního ohmmetru. Měření v menších jamkách už vyžaduje speciální a nákladnější přístrojové vybavení (EVOMTM Auto, ECIS[®] TEER96). Výhodou je, že tyto systémy umožňují měření TEER v reálném čase. Obecně bývají data z větších jamek robustnější, mimo jiné i díky tomu, že mají menší tendenci k okrajovým efektům. Ne každá laboratoř zabývající se ADME profilováním má také k dispozici robotické dispenzační systémy, které eliminují lidský faktor při práci s vícejamkovými destičkami (záměna vzorků, poškození monovrstvy špičkou).

Navzdory snahám o standardizaci protokolů, Caco-2 test je příznačný značnou variabilitou mezi jednotlivými pracovišti²¹, což je dáno především rozdíly v kultivačních podmínkách (číslo pasáže, použitá média a suplementy...) a různými zdroji buněk.

5. Modely permeace přes hematoencefalickou bariéru

Mezi nejčastější řešené problémy při vývoji léčiv patří i otázka jejich prostupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Ať už jde o efekt žádoucí, pro centrálně působící léčiva nebo naopak nežádoucí, v případě sedativních účinků léčiv cílených na periferii (typicky např. antihistaminika 1. generace). HEB tvoří vysoce selektivní bariéru mezi kapilární vaskulaturou a mozkovou tkání. Jejím základem je vrstva endoteliálních buněk v kapilárním lumen, jež se odlišují od endoteliálních buněk na periférii tím, že k sobě těsně přiléhají a postrádají transcelulární póry, tzv. fenestrace. Endoteliální buňky jsou obklopeny vrstvou pericytů, kontraktálních buněk v kapilární bazální membráně a z mozkové strany jsou k bazální membráně připojeny výběžky astrocytů. Celý tento komplex tvoří tzv. neurovaskulární jednotku. Z výše uvedeného popisu je zřejmé, že jakýkoli *in vitro* model HEB jen obtížně vystihne komplexitu bariéry *in vivo*, přičemž kokultury více buněčných typů, a především pak dynamické modely typu orgány na čipu se situací *in vivo* přibližují nejvíce. Jde však o modely komplikované, fi-

nančně, časově i technicky náročné, proto si své místo v akademickém i průmyslovém lékovém výzkumu drží i podstatně jednodušší metody evaluace prostupu přes HEB. Limitace jednotlivých modelů je zapotřebí mít vždy na zřeteli při interpretaci dat.

MDCK test

Oblíbeným modelem je další z modifikací Transwellového systému, technicky velmi podobného Caco-2 testu. Namísto monovrstvy střevních epiteliálních buněk jsou však použity psi ledvinové epiteliální buňky (MDCK) – buďto ve variantě MDCK I pocházející z nízké pasáže nebo MDCK II z vysoké pasáže (liší se hodnotou TEER, která je výrazně vyšší u MDCK I)²². Navzdory svému původu se linie stala standardem ve screeningu látek (ne)prostupujících přes HEB. Nejčastěji se používá její částečně humanizovaná modifikace MDCK-MDR1 (cit.²³), kde je genetickou modifikací psi P-glykoprotein (P-gp) nahrazen jeho lidskou variantou. Vyšší úroveň exprese P-gp je jedním z hlavních rozdílů mezi Caco-2 a MDCK-MDR1, dalším rozdílem je těsnost bariéry (na níž usuzujeme z relativně vyšších hodnot P_{app} v Caco-2 modelu proti MDCK modelu). Jakýkoli *in vitro* model je však řádově propustnější než HEB *in vivo*. Existují studie poukazující na identické řazení látek dle permeability v modelech MDCK, Caco-2 i mozkových endoteliálních buněk^{24,25}. Pokud je tedy primárním cílem porovnání látek mezi sebou a nikoli absolutní hodnota P_{app} , nehraje volba konkrétního modelu velkou roli. Je obtížné najít v literatuře vědecké opodstatnění masového rozšíření MDCK testu jako optimálního modelu permeace přes HEB. Můžeme hypotetizovat, že za tím stojí především fakt, že s touto linií se dobře pracuje – diferenciace je rychlejší než v případě Caco-2 buněk (5 vs. 21 dní), buňky nevyžadují speciální média, a proto jde o metodu vhodnou pro screeningová pracoviště, kterými prochází velké množství látek, pro jejich rámcové rozřazení do jednotlivých permeačních kategorií.

Endoteliální buňky a jejich kokultury

Fyziologicky relevantnějším *in vitro* modelem HEB jsou buďto primární endoteliální buňky izolované z mozku laboratorních hlodavců nebo ještě lépe lidské mozkové mikrovaskulární buňky (hBMEC)²⁶. Jejich nevýhodou je omezená možnost propagace *in vitro* a z toho vyplývající vysoká cena. Z tohoto důvodu byla vytvořena řada imortalizovaných endoteliálních buněčných linií (lidských i zvířecích), jež si do značné míry ponechávají vlastnosti primárních kultur (markery těsných spojů, exprese přenašečů). Jejich nevýhodou je, že proti primokulturám jsou přece jen propustnější²⁷. Jelikož endoteliální buňky tvoří pouze jednu (byť klíčovou) součást HEB, vyšší hodnotu těmto modelům přidává kokultivace s dalšími buněčnými typy (astrocyty, pericyty). Ty mohou být umístěny buďto na spodní straně insertu nebo na dně akceptorové komůrky (obr. 3). Příslibem do budoucna je také možné širší využití

diferencovaných indukovaných pluripotentních buněk (iPSC)²⁸, které mohou být diferencovány jak do endoteliální, tak do astrocytární linie. Patrně i vzhledem k vysokým nákladům zatím není dostatek studií, které by (ko)kultury buněk odvozených od iPSC dostatečně validovaly.

Mikrofluidní čipy („HEB na čipu“)

Doposud popsané modely reprezentují statické 2D systémy. V posledních letech dochází k dramatickému rozvoji dynamických třídízených (3D) modelů typu mikrofluidních čipů²⁹. V mikrokapilárách čipů je mimikován tok krve a působení smykových sil na bariéru, která tímto upevňuje těsné spoje. Endoteliální buňky na čipech navíc mohou tvořit tubulární struktury kolem vnitřního povrchu kanálku. Do dnešní doby byla vyvinuta řada modifikací HEB na čipu a tyto jsou k dostání i komerčně. Pro rutinní testování permeace látek přes HEB tyto pokročilé modely nejsou příliš vhodné, jejich hlavní využití je a do budoucna zřejmě i bude v základním výzkumu různých patologií CNS (např. Alzheimerova choroba, poruchy angiogeneze)²⁷, případně pouze pro ověření permeability přes HEB pro úzkou skupinu látek v návaznosti na dříve provedené jednodušší testy.

Lékový výzkum je závodem o to, kdo bude první v cíli, v raných fázích tedy potřebuje především nástroje, které lze snadno začlenit do screenovací kaskády a urychlit tak proces identifikace „lead compound“ neboli molekuly s optimálními vlastnostmi dle vytyčeného CDTP. A to i za cenu značného zjednodušení přirozeně komplikovaného modelu.

6. Závěr

Všeobecné rozšíření *in vitro* permeačních testů, jakož i dalších ADME charakteristik a jejich zařazení do časných fází vývoje léčiv významně snížilo spotřebu laboratorních zvířat, jež byla v minulosti jediným relevantním modelem pro hodnocení biologické dostupnosti látek. Ani sebelepší *in vitro* test však nedokáže plně nahradit komplexitu celého organismu. Slouží pouze jako jakýsi předfiltr, který má z testů na zvířatech vyloučit látky, u nichž se dá předpokládat, že by *in vivo* selhaly. Teprve u látek, které prošly stanovenými *in vitro* testy s dobrým výsledkem, lze uvažovat o prvním podání zvířeti. Není výjimkou, že i takováto nadějná látka ve farmakokinetických, distribučních a/nebo toxicitních studiích *in vivo* selže, naší povinností však je těmto situacím v co možná největší míře aktivně předcházet a nepoužívat laboratorní zvířata předčasně a bezmyšlenkovitě.

Seznam zkratk

| | |
|--------|---|
| BMEC | endoteliální buňky mozkových kapilár |
| Caco-2 | buněčná linie odvozená od kolorektálního adenokarcinomu (epiteliální buňky) |

| | |
|--------|---|
| CDTP | cílový profil kandidátního léčiva, soubor předem vytyčených vlastností léčiva, kterých chceme dosáhnout a rozhodovacích kritérií |
| CNS | centrální nervový systém |
| CYP450 | cytochrom P450, hlavní enzymový systém podílející se na metabolismu léčiv |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| iPSC | indukované pluripotentní kmenové buňky; dediferencované buňky ze somatických buněk schopné volbou podmínek diferencovat na různé buněčné typy |
| hERG | draslíkový iontový kanál, častý cíl kardiotoxicky působících léčiv |
| LY | Lucifer Yellow, fluorescenční sonda |
| MDCK | (Madin-Darby) psi ledvinové epitelální buňky |
| MDR | mnohočetná léková rezistence, resp. membránové přenašeče, jejichž aktivita k ní vede |
| TEER | transepitelální elektrický odpor, parametr těsnosti buněčné monovrstvy |

Tato práce vznikla za institucionální podpory AVČR (RVO: 61388963) a programu TAČR Zéta TJ02000276. Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Evě Tloušťové, Ing. Alexandře Dvořákové, Dr. Karlu Chalupskému a Dr. Timoteji Strmeňovi za jejich nasazení v implementaci a odlaďování in vitro ADME testů na ÚOCHB AVČR.

LITERATURA

- Hansel C. S., Plant D. L., Holdgate G. A., Collier M. J., Plant H.: *Drug Discovery Today* 27, 2051 (2022).
- Thompson T. N.: *Curr. Drug Metab. J.* 215 (2000).
- Papich M. G., Martinez M. N.: *AAPS J.* 17, 948 (2015).
- Bransford P. a 11 spoluautorů: *Mol. Pharm.* 17, 361 (2020).
- Saal C., Petereit A. C.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 589 (2012).
- Fonsi M., Orsale M. V., Monteagudo E.: *J. Biomol. Screen* 13, 862 (2008).
- Reed G. A.: *Curr. Protoc. Pharmacol.* 75, 761 (2016).
- Bahar F. G., Ohura K., Ogihara T., Imai T.: *J. Pharm. Sci.* 101, 3979 (2012).
- Pham-The H., Gonzalez-Alvarez I., Bermejo M., Garrigues T., Le-Thi-Thu H., Cabrera-Perez M. A.: *Mol. Inform.* 32, 459 (2013).
- Bennion B. J. a 10 spoluautorů: *J. Phys. Chem. B* 121, 5228 (2017).
- Smidkova M., Dvorakova A., Tloust'ova E., Cesnek M., Janeba Z., Mertlikova-Kaiserova H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 664 (2014).
- Avdeef A., Tsinman O.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 43 (2006).
- Athanasiadou I., Angelis Y. S., Lyris E., Vonaparti A., Thomaidis N. S., Koupparis M. A., Georgakopoulos C.: *Bioanalysis* 4, 167 (2012).
- Krishna G., Chen K., Lin C., Nomeir A. A.: *Int. J. Pharm.* 222, 77 (2001).
- Press B.: *Methods Mol. Biol.* 763, 139 (2011).
- Pires C. L., Praca C., Martins P. A. T., Batista de Carvalho A. L. M., Ferreira L., Marques M. P. M., Moreno M. J.: *Pharmaceutics* 13, (2021).
- Yamashita S., Konishi K., Yamazaki Y., Taki Y., Sakane T., Sezaki H., Furuyama Y.: *J. Pharm. Sci.* 91, 669 (2002).
- Sevin E., Dehouck L., Fabulas-da Costa A., Cecchelli R., Dehouck M. P., Lundquist S., Culot M.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 68, 334 (2013).
- Siissalo S., Laitinen L., Koljonen M., Vellonen K. S., Kortejarvi H., Urtti A., Hirvonen J., Kaukonen A. M.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 548 (2007).
- Zhao W., Han L., Bae Y., Manickam D. S.: *J. Visualized Exp.* 150, e58900 (2019).
- Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H. Y., Fischer P. M., Gershkovich P.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114, 38 (2017).
- Dukes J. D., Whitley P., Chalmers A. D.: *BMC Cell Biol.* 12, 43 (2011).
- Wang Q., Rager J. D., Weinstein K., Kardos P. S., Dobson G. L., Li J., Hidalgo I. J.: *Int. J. Pharm.* 288, 349 (2005).
- Jin X. a 16 spoluautorů: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70, 188 (2014).
- Hellinger E. a 22 spoluautorů: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 340 (2012).
- Eigenmann D. E., Jahne E. A., Smiesko M., Hamburger M., Oufir M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2095 (2016).
- Eigenmann D. E., Xue G., Kim K. S., Moses A. V., Hamburger M., Oufir M.: *Fluids Barriers CNS* 10, 33 (2013).
- Delsing L., Herland A., Falk A., Hicks R., Synnergren J., Zetterberg H.: *Mol. Cell. Neurosci.* 107, 103533 (2020).
- Wan J., Zhou S., Mea H. J., Guo Y., Ku H., Urbina B. M.: *Chem. Rev.* 122, 7142 (2022).

H. Mertlíková-Kaiserová (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic): The Role of Permeation Assays in Preclinical Drug Discovery

Membrane permeability assays – together with metabolic stability and solubility assays – belong to the essential tools of early drug discovery process. In most therapeutic indications, a drug needs to pass several biological barriers to exert its desired effect to a target tissue, receptor, enzyme, without significant decay. There are numerous models available allowing us to evaluate compounds permeability, with cellular assays being particularly useful. Most frequently, these assays are based on

a „Transwell“ system, where two compartments are separated by a filter bearing either artificial membrane or a monolayer of tightly connecting cells. More sophisticated permeability assays have been developed during the last decade, e.g., co-cultures of relevant cell types or 3D microfluidics on a chip. However, their high costs and time-consuming preparation prevent their widespread use. In basic drug development screening cycles Caco-2 and MDCK assays remain the gold standard.

Keywords: ADME, permeability, absorption, bio-availability, Caco-2, blood-brain barrier, MDCK

Acknowledgements

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO: 61388963) and Technology Agency of the Czech Republic (#TJ02000276). My sincere thanks go to Ing. Eva Tloušťová, Ing. Alexandra Dvořáková, Dr. Chalupský and Dr. Strmeň for their enthusiasm and help while implementing and tuning the in vitro ADME assays at IOCB ASCR.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

URČENÍ POLOH NÁSOBNÝCH VAZEB V LIPIDECH POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE. ČÁST II

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika
josef.cvacka@uochb.cas.cz

Došlo 7.8.23, přijato 14.10.23.

Tento text je druhou částí přehledového článku o pokrocích hmotnostní spektrometrie při charakterizaci dvojných a trojných vazeb v acylových řetězcích lipidů metodami LC-MS a přímou ionizací kapalných vzorků za atmosférického tlaku. Je věnován využití epoxidace, tvorbě aduktů vznikajících z acetonitrilu při chemické ionizaci za atmosférického tlaku, fotodisociačním reakcím a technikám disociace iontů po interakci s elektrony.

Klíčová slova: dvojná vazba, epoxidace, fotodisociace, fragmentace, hmotnostní spektrometrie, lipidy, strukturní analýza, trojná vazba

Obsah

1. Epoxidace dvojných vazeb
2. Adukty vytvořené při chemické ionizaci za atmosférického tlaku v přítomnosti acetonitrilu
3. Fotodisociace nenasyčených lipidů
4. Disociace nenasyčených lipidů indukovaná elektrony
5. Závěr

1. Epoxidace dvojných vazeb

Metody založené na epoxidaci dvojných vazeb byly původně vyvinuty pro GC-MS (cit.¹). Později byly upraveny i pro analýzy v kapalně fázi, čímž se jejich použitelnost rozšířila na netěkavé lipidy, jako jsou např. glycerofosfolipidy. Epoxidace lze provádět chemickou derivatizací před MS analýzou²⁻⁵, nízkoteplotní plazmou⁶⁻⁸ nebo elektrochemickými reakcemi^{9,10}. Pro šetrnou epoxidaci dvojných vazeb se často používá kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (*m*-CPBA)^{2,3}. Reakce s *m*-CPBA je rychlá, probíhá s vysokým výtěžkem a minimem vedlejších produktů. Epoxidovou skupinu lze štěpit pomocí kolizně indukované

disociace (CID) za vzniku charakteristické dvojice fragmentů odpovídajících alkenu a aldehydu, které se liší o 15,9949 Da (schéma 1). Kromě diagnostických produktových iontů jsou pozorovány fragmenty odpovídající ztrátě polární části lipidu nebo ztrátě acylového řetězce. Produkty epoxidace lze v závislosti na struktuře lipidu detekovat v kladném nebo záporném módu elektrosprejové ionizace (ESI). Epoxidace pomocí *m*-CPBA byla využita při analýze mastných kyselin, fosfolipidů a lysofosfolipidů². Pozici dvojných vazeb v glycerofosfolipidech lze určit v záporném ionizačním módu pomocí MS³ (cit.³). V MS² jsou vytvořeny záporně nabitě ionty epoxidovaných mastných kyselin, jejichž následné štěpení v MS³ kroku poskytuje fragmenty určující polohu dvojných vazeb. U analýzy polynenasycených mastných kyselin je třeba optimalizovat reakční podmínky tak, aby se zabránilo epoxidaci dvou nebo více dvojných vazeb, protože spektra vícenásobně epoxidovaných látek se obtížně interpretují. Zang a spol.⁴ představili kyselinu peroctovou (PPA) jako alternativní derivatizační činidlo pro epoxidaci dvojných vazeb. V porovnání s *m*-CPBA se reakční směs po použití PPA lépe čistí. Dalším alternativním epoxidacím činidlem je kyselina chlorzlatitá. Při ESI v přítom-

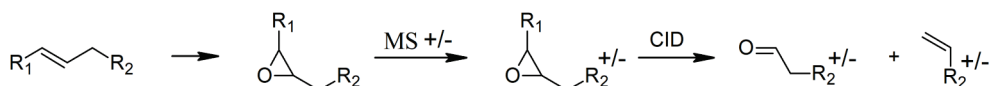


Schéma 1. Epoxidace, ionizace a CID epoxidovaných lipidových iontů

nosti kyseliny chlorozlatité dochází k epoxidaci dvojných vazeb a tvorbě diagnostických aldehydových iontů⁵.

Elektrochemické metody nebo metody využívající plasmu obvykle nevedou k neúplné epoxidaci. Výhodou je však jejich jednoduchost, rychlost a možnost uspořádání on-line. Epoxidace pomocí nízkoteplotní plazmy vyvinutá pro nenasyčené mastné kyseliny⁶ byla později aplikována na všechny hlavní třídy fosfolipidů⁸. Epoxidaci lze rovněž provádět přímo v iontovém zdroji pro ESI, pokud je sprejovací jehla udržována při záporném napětí dostatečně vysokém k vytvoření korónového výboje⁷. Kromě epoxidace vznikají i peroxidované formy lipidů, jejichž fragmentační spektra lze rovněž využít pro lokalizaci dvojných vazeb. Elektrochemickou epoxidací nenasyčených lipidů lze řídit pomocí napětí vloženého na emitor během elektrosprejové ionizace⁹. NanoESI s neinertními kovovými elektrodami lze využít k epoxidaci nenasyčených mastných kyselin v krevní plazmě¹⁰.

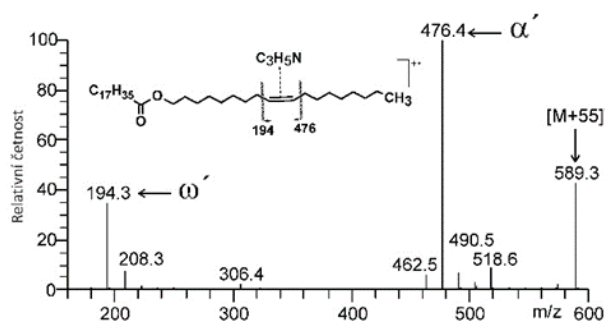
2. Adukty vytvořené při chemické ionizaci za atmosférického tlaku v přítomnosti acetonitrilu

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je vhodná pro méně polární a nepolární lipidy, které jsou pomocí ESI obtížně ionizovatelné. Při APCI se uplatňuje řada chemických procesů, které jsou primárně využívány k ionizaci analytů. Některé z těchto reakcí lze však s výhodou využít pro chemickou derivatizaci nenasyčených lipidů. Příkladem jsou reaktivní ionty vznikající z acetonitrilu, které se mohou adovat na dvojnou a trojnou vazbu lipidů. Reakční produkty poskytují fragmentační spektra, která jsou vhodná pro lokalizaci násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů.

V klasické chemické ionizaci (CI) při použití acetonitrilu jako reakčního plynu vzniká (1-methylenimino)-1-ethenyl ($\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{C}=\text{CH}_2$). Tato látka reaguje s nenasyčenými sloučeninami za vzniku aduktů $[\text{M} + 54]^+$, které poskytují fragmenty charakterizující polohu dvojnou vazby^{11,12}. Reakce se obvykle provádí v hmotnostních spektrometrech s iontovou pastí s vnitřní ionizací, kde zmíněné reaktivní ionty vznikají iontově-molekulovou reakcí mezi $\text{C}_2\text{H}_2\text{N}^+$ a neutrálním acetonitrem^{13,14}. Diagnostické fragmenty jsou pozorovány buď ve spektrech $\text{MS}^{13,15-17}$, nebo ve spektrech MS^2 po kolizní aktivaci aduktů $[\text{M} + 54]^+$ (cit.¹⁸⁻²⁶). Adukty $[\text{M} + 54]^+$ lze generovat za atmosférického tlaku pomocí APCI-MS s využitím helia jako nebulizačního plynu²⁷. Při APCI za běžných podmínek s dusíkem jako nebulizačním plynem vznikají odlišné ionty. Namísto iontu se sudým počtem elektronů $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^+$ vzniká

radikálový kation $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^{+\cdot}$, který reaguje s nenasyčenými lipidy. Reakční produkty typu $[\text{M} + 55]^{+\cdot}$ pak při kolizní aktivaci poskytují intenzivní fragmentové ionty, které umožňují charakterizovat polohu dvojnou či trojnou vazby. Experimenty a teoretické výpočty naznačují, že adukty lipidů s dvojnou vazbou jsou deriváty 2-methyl-1-pyrrolinu, které vznikají (3+2) cykloadiční reakcí s *N*-methylidem acetonitrilu ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}^{\cdot}=\text{N}^+=\text{CH}_2$), viz schéma 2. Při CID se tyto deriváty štěpí otevřením kruhu a následnou eliminací alkylového radikálu. Vznikají dva diagnostické fragmenty, které představují štěpení na každé straně původní dvojnou či trojnou vazby (obr. 1). Fragment alfa obsahuje lipidovou funkční skupinu, zatímco fragment omega charakterizuje druhou část řetězce s koncovou methylovou skupinou. Výhodou určování poloh dvojných a trojných vazeb pomocí acetonitrilu v APCI je jednoduchost této metody. Jedinou podmínkou je přítomnost acetonitrilu v iontovém zdroji, kterou lze snadno zajistit prostřednictvím mobilních fází obsahujících acetonitril. Metoda byla použita k objasnění struktury mnoha nenasyčených lipidů, včetně methylesterů kyseliny stearové (FAME, cit.^{28-31,35}), hydroxy-FAME³², voskových esterů²⁸, dioldiesterů³³ nebo triacylglycerolů³⁴.

Adukty odvozené od acetonitrilu lze využít pro lipidy s různým uspořádáním dvojných či trojných vazeb. Jestliže jsou nenasyčené vazby v řetězci od sebe relativně daleko, každá z nich poskytuje intenzivní diagnostické fragmenty. Pokud jsou však dvě nebo více násobných vazeb blízko sebe, fragmenty odpovídající štěpení před první a za poslední násobnou vazbou bývají ve spektru intenzivnější. Tyto fragmenty jsou užitečné pro odvození uspořádání dvojných a trojných vazeb v polynenasycených řetězcích. Vychází se ze skutečnosti, že hmotnost polynenasycených



Obr. 1. CID MS^2 spektrum aduktů $[\text{M} + 55]^{+\cdot}$ vzniklého reakcí oleylstearátu (WE 18:1 (*n*-9)-18:0) s *N*-methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Přepracováno podle cit.²⁸

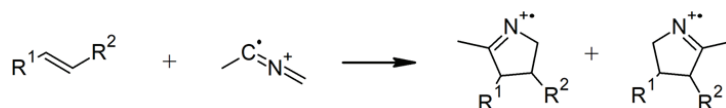


Schéma 2. Předpokládané schéma reakce dvojnou vazby s *N*-methylidem acetonitrilu v APCI zdroji

cené části řetězce se liší pro různá uspořádání násobných vazeb. Například uspořádání s dvěma dvojnými vazbami oddělenými methylenovou skupinou („methylene-interrupted“) odpovídá oblasti zahrnující první až poslední dvojnou vazbu elementárnímu složení C_5H_6 , zatímco u dvou konjugovaných dvojných vazeb je to C_4H_4 . Proto lze uspořádání násobných vazeb odhalit porovnáním hodnoty parametru MBR (multiple bond region) vypočteného z hmotností nejintenzivnějších fragmentů a prekursoru se seznamem teoretických MBR hodnot³⁵. Obvykle jsou detekovány i fragmenty indikující jednotlivé dvojně vazby v polynenasyceném systému, které jsou užitečné pro potvrzení lokalizace všech násobných vazeb. Dvojně a trojně vazby lze rozlišit pomocí satelitních iontů, které vznikají fragmentací na vzdálenějších vazbách uhlík–uhlík. Satelitní ionty u dvojně vazby jsou výrazně méně intenzivní než diagnostické ionty a liší se od nich o 14 Da. Naopak satelitní ionty trojně vazby jsou obvykle velmi intenzivní. Od diagnostických fragmentů se liší o +15 Da, takže je lze ve spektrech snadno najít³⁵ (obr. 2).

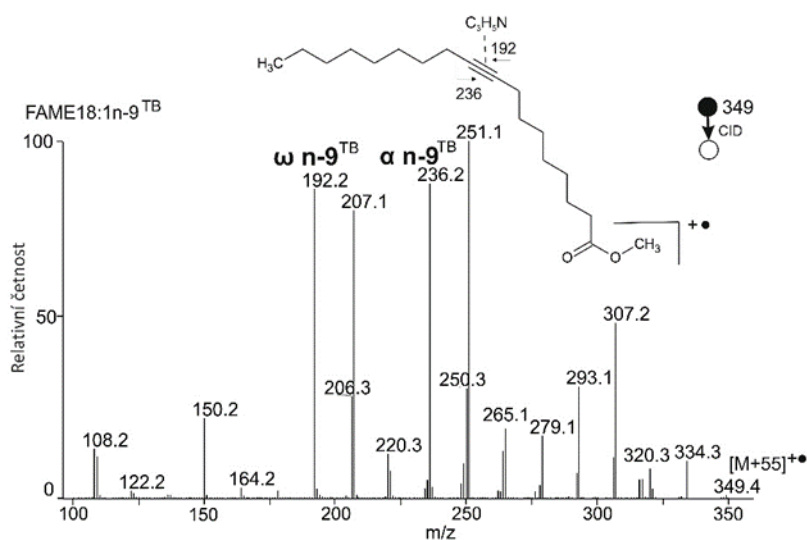
Nenasycené vazby ve složených lipidech mohou být přítomny ve dvou nebo více řetězcích. Další fragmentace diagnostických iontů nesoucích funkční skupinu (alfa fragmenty) pomáhá určit, kde se nenasycená vazba v molekule nachází. Například dvojná vazba v mononenasycených voskových esterech může být přítomna v kyselinové nebo alkoholové části. Pokud se z alfa fragmentu při MS^3 odštěpuje mastná kyselina, nachází se dvojná vazba v alkoholové části. Naopak, pokud se odštěpuje alkohol, je dvojná vazba součástí kyselinového řetězce²⁸. S rostoucím počtem alifatických řetězců v molekulách lipidů^{33,34} jsou interpretace spekter náročnější. V případě triacylglycerolů³⁴ jsou spektra jednoznačně interpretovatelná pro molekuly s jedním nenasyceným řetězcem, nebo dvěma či tře-

mi identickými nenasycenými řetězci. Protože se každá násobná vazba projevuje diagnostickými a satelitními ionty, mohou být hmotnostní spektra triacylglycerolů velmi komplexní. Pokud řetězce obsahují dvojně vazby ve stejné poloze od koncového methyly, jsou příslušné fragmenty ve spektrech intenzivnější a signály ve spektrech lze snáze korelovat se strukturou (obr. 3). Pokud se pro relativně velké lipidy, jako jsou triacylglyceroly nebo 1,2-diol diestery, používá hmotnostní spektrometr s iontovou pastí, mohou být hmotnosti omega fragmentů pod spodním limitem hmotnostního rozsahu analyzátoru. Ačkoli omega fragmenty nejsou nezbytné pro stanovení polohy dvojných vazeb, jsou užitečné pro potvrzení navržených struktur. Proto je pro fragmentaci aduktů výhodnější používat přístroje s kolizní celou.

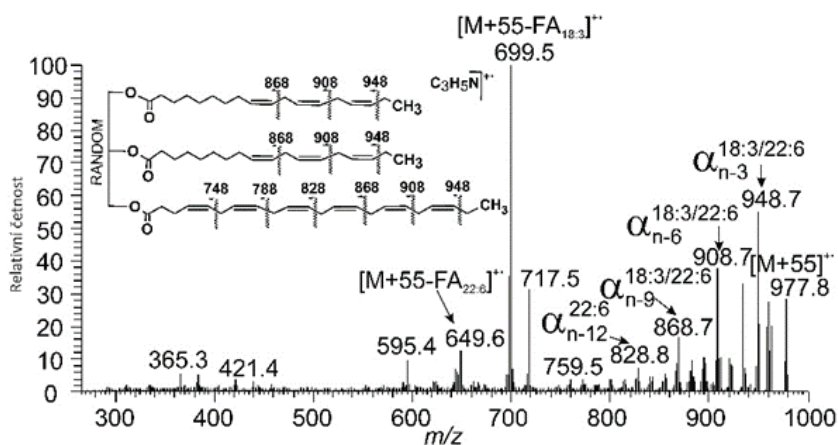
V APCI dochází k reakci nabitých acetonitrilových částic (iontů) s neutrální molekulou lipidu. Tento přístup se tak principiálně liší od metod využívajících ESI, které jsou založeny na modifikacích lipidových iontů neutrálními reaktanty (např. při ozonem indukované disociaci (OzID) nebo Paternò-Büchiho reakci). Adukt odvozené od acetonitrilu jsou vynikajícím nástrojem pro lokalizaci dvojných a trojných vazeb v neutrálních lipidech a vhodné doplňují portfolio metod založených na ionizaci elektro-sprejem.

3. Fotodisociace nenasycených lipidů

První studie fotodisociace malých iontů spadají do 70. let 20. století^{36,37}. V posledních letech se fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD) stala důležitou metodou pro strukturální analýzu lipidů a dalších biologických molekul³⁸. UVPD spektra lipidů obsahují specifické fragmenty,



Obr. 2. CID MS^2 spektrum aduktu $[M + 55]^+$ vzniklého reakcí methylesteru kyseliny stearové (FAME 18:1 $n-9^{TB}$) s N -methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Přepřacováno podle cit.³⁵



Obr. 3. CID MS² spektrum aduktu $[M + 55]^{+}$ vzniklého reakcí di- α -linolenin-dokosahexaenoinu (TG 18:3 (*n*-3)_18:3 (*n*-3)_22:6 (*n*-3)) s *N*-methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Přepracováno podle cit.³⁴

kteří umožňují určit polohy násobných vazeb, methylových větvení, hydroxylových skupin, cyklopropanových modifikací nebo *sn*- pozice acylových řetězců v acylglycerolech. UV záření může aktivovat disociační mechanismy prostřednictvím excitovaných stavů, nebo vyvolat radikálově řízenou disociaci (radical-driven dissociation, RDD). Schopnost UVPD rozlišit *cis/trans* izomery dvojných vazeb je však omezená kvůli izomerizaci dvojných vazeb po absorpci UV fotonu³⁹.

UV záření může vyvolat RDD vytvořením radikálových iontů z molekul se sudým počtem elektronů. Metody založené na této myšlence vyvinula skupina S. J. Blanksbyho^{40–43} a R. R. Juliana⁴⁴. Lipidy lze derivatizovat buď nekovalentně^{40,44}, nebo kovalentně^{41–44} činidly obsahujícími aryl-jodovou vazbu štěpitelnou UV zářením za vzniku radikálů. Po interakci prekurzoru s fotony o vlnové délce 266 nm se odštěpuje jodový radikál za vzniku radikál-kationtu a sekundárních fragmentů. Nevalentní komplexy mohou vznikat s 4-jodobenzoátem nebo 4-jodanilinem (glycerofosfolipidy, sfingomyeliny a triacylglyceroly)⁴⁰, nebo 4-jodobenzoyl-18-crown-6 etherem (fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny)⁴⁴. Následná CID fragmentů s lichým počtem elektronů vede k radikálově řízenému štěpení vazby uhlík–uhlík podél acylového řetězce, což se projevuje sérií ztrát alkylového radikálu nebo alkenů. Vzdálenost mezi sousedními píky je u jednoduchých vazeb 14 Da, zatímco vzdálenost mezi píky 12 Da identifikuje místo dvojných vazeb. Kovalentní deriváty mastných kyselin lze vytvořit esterifikací 4-jodobenzylalkoholem⁴¹. Po ozáření produktu UV zářením o vlnové délce 266 nm eliminují sodné adukty těchto derivátů atomární jod. Následná CID iontů $[M + Na - I]^{+}$ poskytuje fragmenty nesoucí informace o poloze dvojných vazeb. Výrazně vyšší účinnosti fotofragmentace se dosahuje u *N*-(2-aminoethyl)-4-jodobenzamidových (NIBA) derivátů mastných kyselin⁴³, které vykazují téměř úplnou konverzi prekurzorového iontu $[M + Na]^{+}$ na kationtový radikál

$[M + Na - I]^{+}$. Deriváty pro RDD lze rovněž navrhnout tak, aby se maximalizovala intenzita prekurzorových iontů. Toho lze docílit zavedením permanentního náboje, jako je tomu u derivátů 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-ia (4-I-AMPP⁺)⁴².

U výše popsaných RDD metod se využívá UV záření k tvorbě radikálových iontů, které po migraci radikálového místa poskytují diagnostické fragmenty. Pro strukturální analýzu lipidů má však také velký význam UVPD, která vyvolává fragmentace přímo z excitovaných stavů. Skupiny J. S. Brodbeltové a G. E. Reida zkoumaly UVPD lipidů při vlnové délce 193 nm, kdy dochází ke vzniku charakteristických iontů vhodných pro lokalizaci dvojných vazeb v acylových řetězcích⁴⁵. Fotoexcitované ionty podléhají 1,2-eliminacím³⁹ (schéma 3). Obě vazby uhlík–uhlík sousedící s dvojnou vazbou se štěpí a vznikají dva produktové ionty lišící se o 24,000 Da (hmotnost dvou atomů uhlíku) (obr. 4). Tento způsob fragmentace je nezávislý na poloze a typu náboje. Pro UVPD lipidů v pozitivním módu lze použít jak protonované molekuly^{39,45}, tak adukty s lithiem^{39,46,47}, sodíkem^{45–47} nebo draslíkem^{46,47}. Fragmentace aduktů alkalických kovů poskytuje intenzivnější diagnostické produktové ionty, pravděpodobně v důsledku menší pohyblivosti iontu kovu ve srovnání s protonem³⁹. Diagnostické fragmenty dvojných vazeb se tvoří také ze záporně nabitých prekurzorů^{48,49}, např. u jedno- i dvojná-

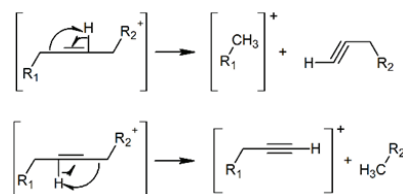
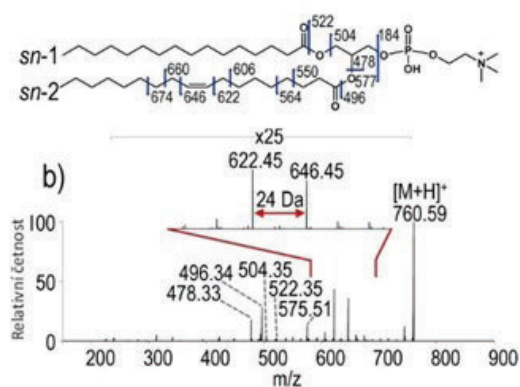


Schéma 3. Reakce dvojných vazeb vyvolané absorpcí UV fotonu vedoucí ke vzniku dvou produktových iontů lišících se o 24 Da



Obr. 4. UVPD (193 nm)-MS² fosfatidylcholinu PC 16:0/18:1 (9Z). Přepřacováno podle cit.⁴⁵

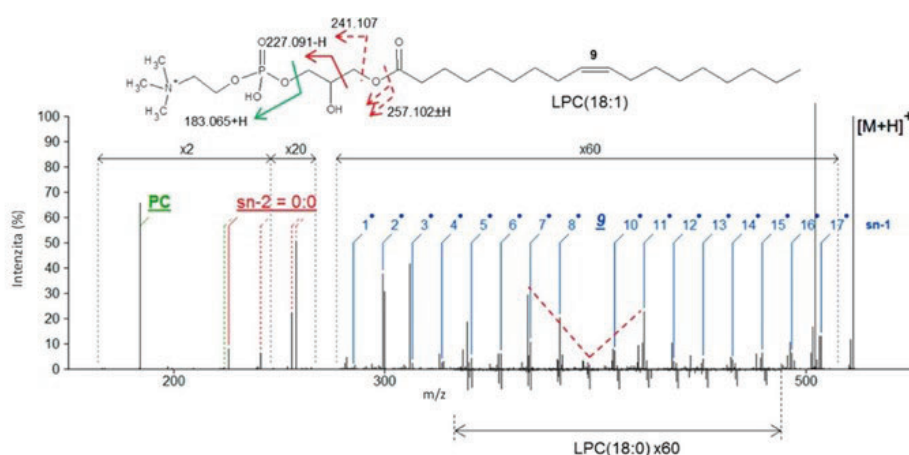
sobně deprotonovaných kardiolipinů⁴⁸. Vzhledem ke složité struktuře těchto lipidů je k lokalizaci dvojných vazeb na všech acylových řetězcích nutná fragmentace ve dvou krocích (CID/UVPD). U fosfolipidů lze k určení poloh dvojných vazeb využít záporně nabitě prekurzory. Zatímco se kyseliny fosfatidové, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny a fosfatidylinositoly deprotonují snadno, záporně nabitě ionty fosfatidylcholinů lze získat po přidavku mravenčanu. Všechny fosfolipidy pak v UVPD poskytují dvojice diagnostických fragmentových iontů^{49,50}. UVPD lze využít k určení poloh dvojných vazeb i v polynenasycených acylových řetězcích, protože každá násobná vazba poskytuje zmíněné diagnostické ionty. Intenzity diagnostických iontů je možné použít k určení relativních koncentrací polohových izomerů dvojných vazeb ve směsích⁴⁶. Navzdory omezené citlivosti lze UVPD použít také ve spojení s kapalinovou chromatografií^{49–51}. Nedávno byly metodou RPLC-UVPD kvantifikovány fosfolipidy obsahující izomerní polynenasycené mastné kyseliny⁵¹.

UVPD v komerčně dostupných hmotnostních spektrometrech pracuje při 193 nm. Tyto přístroje lze využít obdobným způsobem jako laboratorní prototypy spektrometrů využívající fotony o vlnové délce 193 nm, protože i při této vlnové délce dochází k překryvu s absorpčními pásy nenasycených lipidů. UVPD při 213 nm v kombinaci s vysokoenergetickou kolizně indukovanou disociací (HCD) v MS³ umožňuje např. kompletní strukturní analýzu esterů hydroxymastných kyselin (FAHFA)⁵². Pro UVPD se také používá záření vyšších vlnových délek, jako je 266 nm. Energie fotonů však již není dostatečně vysoká na to, aby došlo k jejich absorpci na dvojných vazbách⁵³.

4. Disociace nenasycených lipidů indukovaná elektrony

Disociace organických iontů po jejich interakci s elektrony má bohatou historii sahající až do konce 70. let 20. století. První fragmentace organických iontů pomocí elektronů byly prováděny v celách pro iontovou cyklotronovou rezonanci pomocí techniky známé jako EIEIO (electron impact excitation of ions from organics)⁵⁴. Zájem o elektrony indukovanou fragmentaci jednonásobně nabitých iontů se v poslední době zvýšil v důsledku uvedení nového komerčního hmotnostního spektrometru Q-TOF s EID (cit.⁵⁵). Jako fragmentační cela je zde použita radiofrekvenční iontová past, která umožňuje nezávislé manipulace s elektrony a ionty⁵⁶.

Využití EID lze v analýze nenasycených lipidů demonstrovat na příkladu fosfolipidů, které lze pomocí této fragmentační techniky velmi podrobně charakterizovat⁵⁷. Protonované prekurzory fragmentují za vzniku iontů charakteristických pro polární funkční skupiny fosfolipidů. Dále dochází k regioizomerně specifické ztrátě acylových řetězců a štěpení vazeb uhlík–uhlík v alifatických řetězcích. Fragmentacemi alifatického řetězce vznikají ionty se sudým a lichým počtem elektronů, které tvoří série iontů



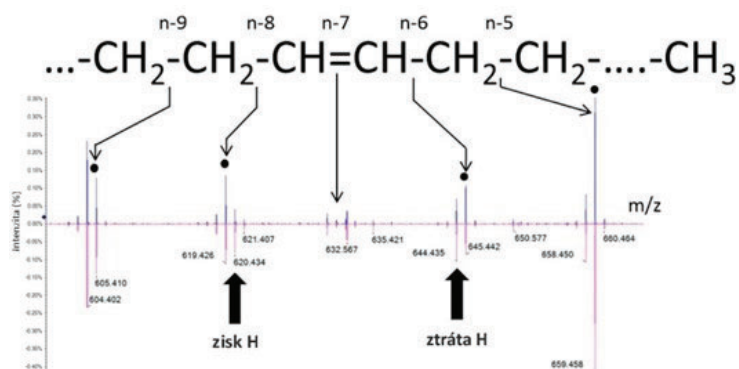
Obr. 5. EID (10 eV)-MS² spektrum lysosfosfatidylcholinu LPC 18:1 (9Z) ve srovnání s částí EID spektra LPC 18:0. Přepřacováno podle cit.⁵⁷

lišících se o 14 Da. Pokud je v řetězci přítomna dvojná vazba, intenzity fragmentů určující pozici dvojných vazby tvoří profil ve tvaru písmene V (obr. 5). Pro interpretaci spekter lipidů s vyšším počtem dvojných vazeb byl navržen automatický dekonvoluční program⁵⁷.

Interakce s vysokoenergetickými elektrony (>20 eV) v ICR cele⁵⁸ umožňují podrobnější pohled na fragmentaci fosfatidylcholinů. Štěpení vazeb uhlík–uhlík v nasycených diacylfosfatidylcholinech formálně vede ke ztrátě alkanu. U nenasyčených fosfatidylcholinů jsou pozorovány produktové ionty s lichým počtem elektronů, které odpovídají homolytickému štěpení řetězců, a ionty se sudým počtem elektronů odpovídající neutrální ztrátě alkanů. Kromě lokalizace polohy dvojných vazeb nabízejí EID fragmenty také rozlišení stereoisomerů⁵⁹. *Cis/trans* geometrie ovlivňuje intenzitu fragmentů sousedních vazeb uhlík–uhlík. *Trans* izomery vykazují zvýšené intenzity dvou iontů se sudým počtem elektronů lišících se o 24,000 Da, tj. pík „ztráty vodíku“ v místě (n–X–1) a pík „zisku vodíku“ v místě (n–X+1) (obr. 6).

Lokalizace dvojných vazeb pomocí EID byla dosud využita pro charakterizaci lipidů několika tříd, včetně fosfolipidů⁵⁷, sfingolipidů⁶⁰ a triacylglycerolů⁶¹. Na počátku byla účinnost EID poměrně nízká, což vyžadovalo průměrování signálu po relativně dlouhou dobu, a délka sběru dat omezovala použití EID ve spojení s kapalinovou chromatografií. Nedávný technologický pokrok však zlepšil účinnost EID ve spektrometru typu QqTOF (cit.⁶³). Zvýšená citlivost nyní umožňuje provádět strukturální lipidomiku založenou na EID ve spojení s kapalinovou chromatografií. Alternativní možnost separace komplexních vzorků lipidů při spojení s EID nabízí diferenční iontová mobilita (DMS)^{59–62}.

Disociace s přenosem náboje (charge transfer dissociation, CTD) je aktivační technika, která generuje spektra podobná spektrům EID (cit.⁶⁴). Při této metodě interagují analyzované ionty s vysokoenergetickými (keV) ionty helia. Rozsáhlé štěpení podél acylových řetězců lipidů poskytuje spektra s diagnostickými fragmenty pro lokalizaci dvojných vazeb.



Obr. 6. EID MS² spektra fosfatidylcholinu PC 18:1 (*n-9,cis*)/18:1 (*n-9,cis*) (nahore) a fosfatidylcholinu PC 18:1 (*n-9,trans*)/18:1 (*n-9,trans*) (dole). Přepřacováno podle cit.⁵⁹

5. Závěr

V posledních letech jsme svědky rychlého rozvoje metod strukturální analýzy lipidů. Nové postupy jsou často založeny na využití nových derivatizačních reakcí a netradičních způsobech aktivace iontů. Vývoj v oblasti strukturální analýzy je poháněn technologickými novinkami v hmotnostní spektrometrii a dostupností přístrojů se stále se zlepšujícími parametry. Molekuly lipidů tak lze charakterizovat podrobněji a identifikovat je na nižších koncentračních úrovních a ve složitějších vzorcích. Jedním z klíčových požadavků na nové metody je jejich jednoduchá integrace do lipidomických pracovních postupů, což vyžaduje snadnou a jednoznačnou interpretaci spekter a kompatibilitu s chromatografií. Interpretace spekter složitějších lipidů nebo spekter s rozsáhlou fragmentací (např. EID, UVPD) může být velmi náročná. Lipidomické přístupy se proto neobejdou bez rychlých a spolehlivých počítačových programů pro automatické vyhodnocování dat.

Práce byla podpořena projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

LITERATURA

- Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom.* (Chichester) **11**, 127 (2005).
- Feng Y., Chen B., Yu Q., Li L.: *Anal. Chem.* **91**, 1791 (2019).
- Kuo T. H., Chung H. H., Chang H. Y., Lin C. W., Wang M. Y., Shen T. L., Hsu C. C.: *Anal. Chem.* **91**, 11905 (2019).
- Zhang H., Xu M., Shi X., Liu Y., Li Z., Jagodinsky J. C., Ma M., Welham N. V., Morris Z. S., Li L.: *Chem. Sci.* **12**, 8115 (2021).
- Luo K., Chen H., Zare R. N.: *Analyst* **146**, 2550 (2021).

6. Zhao Y., Zhao H., Zhao X., Jia J., Ma Q., Zhang S., Zhang X., Chiba H., Hui S.-P., Ma X.: *Anal. Chem.* **89**, 10270 (2017).
7. Takashima S., Toyoshi K., Yamamoto T., Shimozawa N.: *Sci. Rep.* **10**, 12988 (2020).
8. Cao W., Ma X., Li Z., Zhou X., Ouyang Z.: *Anal. Chem.* **90**, 10286 (2018).
9. Tang S., Cheng H., Yan X.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 209 (2020).
10. Chintalapudi K., Badu-Tawiah A. K.: *Chem. Sci. J.* **11**, 9891 (2020).
11. Van Pelt C. K., Carpenter B. K., Brenna J. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1253 (1999).
12. Michaud A. L., Lawrence P., Adlof R., Brenna J. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 363 (2005).
13. Moneti G., Pieraccini G., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **33**, 1148 (1998).
14. Oldham N. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1694 (1999).
15. Moneti G., Pieraccini G., Dani F., Turillazzi S., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **32**, 1371 (1997).
16. Moneti G., Pieraccini G., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 1354 (1999).
17. Oldham N. J., Svatos A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 331 (1999).
18. Van Pelt C. K., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **71**, 1981 (1999).
19. Van Pelt C. K., Huang M. C., Tschanz C. L., Brenna J. T.: *J. Lipid Res.* **40**, 1501 (1999).
20. Michaud A. L., Diau G. Y., Abril R., Brenna J. T.: *Anal. Biochem.* **307**, 348 (2002).
21. Michaud A. L., Yurawecz M. P., Delmonte P., Corl B. A., Bauman D. E., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **75**, 4925 (2003).
22. Saba A., Mazzini F., Raffaelli A., Mattei A., Salvadori P.: *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4867 (2005).
23. Lawrence P., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **78**, 1312 (2006).
24. Gomez-Cortes P., Tyburczy C., Brenna J. T., Juarez M., de la Fuente M. A.: *J. Lipid Res.* **50**, 2412 (2009).
25. Alves S. P., Tyburczy C., Lawrence P., Bessa R. J., Brenna J. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 1933 (2011).
26. Kroiss J., Svatos A., Kaltenpoth M.: *J. Chem. Ecol.* **37**, 420 (2011).
27. Xu Y., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **79**, 2525 (2007).
28. Vrkoslav V., Hakova M., Peckova K., Urbanova K., Cvacka J.: *Anal. Chem.* **83**, 2978 (2011).
29. Vrkoslav V., Cvacka J.: *J. Chromatogr. A* **1259**, 244 (2012).
30. Barthelemy M., Elie N., Pellissier L., Wolfender J. L., Stien D., Touboul D., Eparvier V.: *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
31. Sorres J., Hebra T., Elie N., Leman-Loubiere C., Grayfer T., Grellier P., Touboul D., Stien D., Eparvier V.: *Molecules* **27**, 1182 (2022).
32. Kaluzikova A., Vrkoslav V., Harazim E., Hoskovec M., Plavka R., Budesinsky M., Bosakova Z., Cvacka J.: *J. Lipid Res.* **58**, 1579 (2017).
33. Subcikova L., Hoskovec M., Vrkoslav V., Cmelikova T., Hakova E., Mikova R., Coufal P., Dolezal A., Plavka R., Cvacka J.: *J. Chromatogr. A* **1378**, 8 (2015).
34. Hakova E., Vrkoslav V., Mikova R., Schwarzova-Peckova K., Bosakova Z., Cvacka J.: *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 5175 (2015).
35. Horka P., Vrkoslav V., Kindl J., Schwarzova-Peckova K., Cvacka J.: *Molecules* **26**, 6468 (2021).
36. Vanderhart W. J.: *Mass Spectrom. Rev.* **8**, 237 (1989).
37. Tecklenburg R. E., Russell D. H.: *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 405 (1990).
38. Brodbelt J. S., Morrison L. J., Santos I.: *Chem. Rev.* **120**, 3328 (2020).
39. Ryan E., Nguyen C. Q. N., Shiea C., Reid G. E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1406 (2017).
40. Pham H. T., Ly T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* **84**, 7525 (2012).
41. Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 805 (2013).
42. Narreddula V. R., Boase N. R., Ailuri R., Marshall D. L., Poad B. L. J., Kelso M. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* **91**, 9901 (2019).
43. Narreddula V. R., McKinnon B. I., Marlton S. J. P., Marshall D. L., Boase N. R. B., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* **146**, 156 (2021).
44. Pham H. T., Julian R. R.: *Int. J. Mass Spectrom.* **370**, 58 (2014).
45. Klein D. R., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **89**, 1516 (2017).
46. Fang M. X., Rustam Y., Palmieri M., Sieber O. M., Reid G. E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 2339 (2020).
47. Williams P. E., Klein D. R., Greer S. M., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 15681 (2017).
48. Macias L. A., Feider C. L., Eberlin L. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **91**, 12509 (2019).
49. Klein D. R., Blevins M. S., Macias L. A., Douglass M. V., Trent M. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **92**, 5986 (2020).
50. Blevins M. S., James V. K., Herrera C. M., Purcell A. B., Trent M. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **92**, 9146 (2020).
51. Macias L. A., Garza K. Y., Feider C. L., Eberlin L. S., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 14622 (2021).
52. Buenger E. W., Reid G. E.: *Eur. J. Mass Spectrom.* **26**, 311 (2020).
53. Waldchen F., Becher S., Esch P., Kompauer M., Heiles S.: *Analyst* **142**, 4744 (2017).
54. Cody R. B., Freiser B. S.: *Anal. Chem.* **51**, 547 (1979).
55. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Hager J. W., Thomson B. A.: *Anal. Chem.* **87**, 785 (2015).
56. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S., Hager J. W., Thomson B. A.: *Mass Spectrom.*

- 6, A0058 (2017).
57. Campbell J. L., Baba T.: *Anal. Chem.* 87, 5837 (2015).
58. Jones J. W., Thompson C. J., Carter C. L., Kane M. A.: *J. Mass Spectrom.* 50, 1327 (2015).
59. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *Anal. Chem.* 89, 7307 (2017).
60. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 858 (2016).
61. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 2015 (2016).
62. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S., Ikeda K.: *J. Lipid Res.* 59, 910 (2018).
63. Baba T., Ryumin P., Duchoslav E., Chen K. Q., Chelur A., Loyd B., Chernushevich I.: *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 32, 1964 (2021).
64. Li P. F., Jackson G. P.: *J. Mass Spectrom.* 52, 271 (2017).

Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Location of Double or Triple Bonds in Lipids Using Mass Spectrometry, Part II**

This text is the second part of a review article on advances in mass spectrometry for characterizing double and triple bonds in lipid acyl chains by LC-MS and direct ionization of liquid samples at atmospheric pressure. It is devoted to epoxidation, forming adducts from acetonitrile during atmospheric pressure chemical ionization, photodissociation, and electron-ion reaction-based dissociations.

Keywords: double bond, fragmentation, epoxidation, lipids, mass spectrometry, photodissociation, structural analysis, triple bond

Acknowledgments

This work was supported by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

STRUKTURNÍ BIOLOGIE V ANTIVIROVÉM VÝZKUMU NA PŘÍBĚŽÍCH KINAS LIPIDŮ, PROTEINU STING A VIROVÝCH METHYLTRANSFERAS

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

EVŽEN BOUŘA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika
boura@uochb.cas.cz

Došlo 30.10.23, přijato 20.11.23.

Tento článek se zaměřuje na roli strukturní biologie ve vývoji malých molekul, sloužících jako ligandy proteinů, které by mohly být v budoucnosti využity jako léky. Pro získávání strukturních informací o proteínech jsou využívány experimentální metody, které následně umožňují virtuální screening rozsáhlých knihoven látek. Nalezené ligandy jsou dále experimentálně ověřovány, přičemž strukturní biologie hraje klíčovou roli v jejich dalším zdokonalení. Cílem je vyvinout ligand s vysokou afinitou a specifitou, který by se mohl stát účinným léčivem. Následuje optimalizace těchto látek z hlediska chemie a farmakologie. Celý tento proces je ilustrován na příkladech z nedávné minulosti, jako jsou kinasy lipidů, stimulator interferonových genů (STING) a virové methyltransferasy.

Klíčová slova: antivirotika, kinasa lipidů, STING, methyltransferasa, virus

Obsah

1. Úvod
2. Lipidové kinasy
3. Virové methyltransferasy modifikující čepičky RNA
3.1. Inhibitory koronavirových methyltransferas
4. STING, vrozená imunita a poxviry
4.1. Poxviróvé methyltransferasy a jejich inhibitory
5. Budoucí vývoj

1. Úvod

Strukturní biologie hraje stále větší roli v návrhu léčiv. Krystalografie, kryo-elektronová mikroskopie (kryo-EM) a nukleární magnetická rezonance (NMR) se využívají k získávání struktur biomakromolekul, zejména proteinů a jejich komplexů. Tyto experimentálně získané struktury se dále používají ve virtuálním prohledávání velkých knihoven látek, které často obsahují desítky milio-

nů sloučenin, za účelem nalezení vhodných kandidátů ovlivňujících (nejčastěji inhibujících) funkci cílového proteinu. Aktivity takto nalezených látek jsou poté experimentálně ověřovány a látky jsou dále chemicky a farmakologicky optimalizovány. Tento postup představuje základ pro racionální návrh nových léčiv.

Zde se zaměříme na roli strukturní biologie ve zdokonalování ligandů za účelem získání užitečných chemických nástrojů nebo sloučenin charakterizovaných vysokou afinitou a specifitou, které budou vhodnými kandidáty na budoucí léčiva. Tento proces bude ilustrován medicínskými významnými příklady, jako jsou kinasy lipidů, které jsou nezbytné pro replikaci určitých virů, stimulator interferonových genů (STING), který je klíčovým hráčem vrozené imunity, a virové methyltransferasy, které viry používají k oklamání vrozené imunity. Vysoce specifické ligandy pro tyto proteiny byly nedávno vyvinuty na ÚOCHB i s pomocí strukturní biologie.



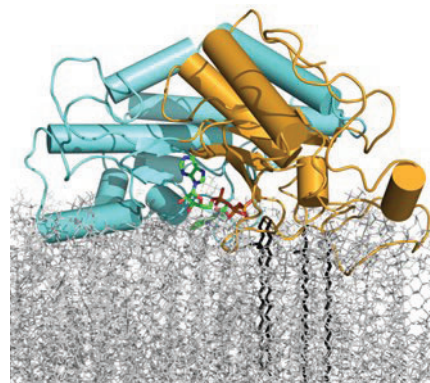
Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D. vystudoval obor fyzikální chemie a obor molekulární biologie a genetiky na přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, kde v roce 2008 získal i titul Ph.D. pod vedením profesora Obšila. Čtyři roky pracoval na americkém Národním ústavu zdraví (NIH) v Bethesda, kde se věnoval mimo jiné výzkumu buněčného transportu a viru HIV pomocí metod strukturní biologie, jako je makromolekulární krystalografie. Od roku 2012 vede skupinu zaměřující se na výzkum RNA virů a vývoj léčiv na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR. Publikoval přes 100 prací v odborných časopisech.

2. Lipidové kinasy

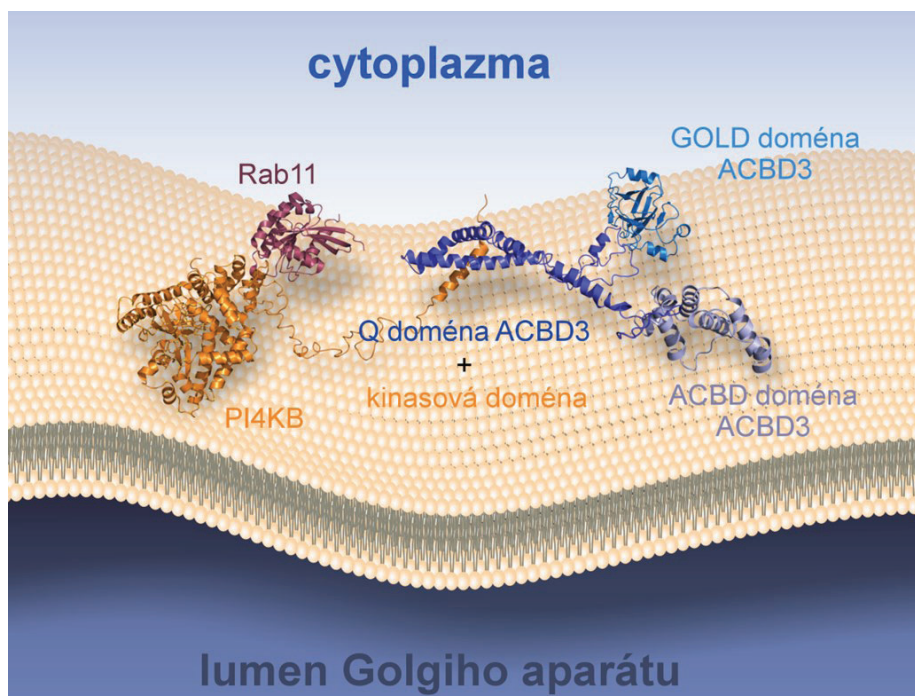
Lipidové kinasy jsou zodpovědné za tvorbu fosforylovaných lipidů z jejich nefosforylovaných nebo méně fosforylovaných prekurzorů, čímž mění chemické složení a náboj cílové membrány. Kromě toho slouží fosforylační stav některých lipidů, jako jsou fosfatidylinositolfosfáty (PIP), jako „biologická adresa“ pro danou membránu, která je rozhodující pro řízení kritických buněčných procesů. Modulaci fosforylačního stavu PIP řídí kinasy lipidů řadu buněčných dějů, včetně buněčného růstu, diferenciacce a vnitrobuněčného transportu. Kromě toho se tyto kinasy podílejí na regulaci dynamiky membrán a transportu vezikulů. PIP jsou klíčové lipidy produkované třídou kinas lipidů zvaných fosfatidylinositolkinasy. Některé PIP také fungují jako druzí poslové při přenosu signálu. Jak již bylo uvedeno výše, nejdůležitější funkcí PIP je schopnost pomáhat definovat identitu různých buněčných membrán. Zde je uvedeno několik příkladů: plazmatická membrána je bohatá na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂), endosomy na fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) a membrána Golgiho aparátu na fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P) (podrobný přehled viz cit.¹). Tyto PIP vznikají působením specifických kinas. PI4P je produkovan fosfatidylinositol-4-kinasami (PI4K) na povrchu membrány (obr. 1). Lidé mají čtyři tyto enzymy: i) PI4KA, která produkuje PI4P na plazmatické membráně, kde je PI4P dále fosforylován na PIP₂; ii) PI4KB, která je zodpovědná za syntézu ~50 % zásob PI4P na membránách Golgiho systému; iii) PI4K2A, která syntetizuje zbylých 50 % PI4P Golgiho

systemu a také produkuje PI4P na endosomech při jejich zrání; iv) PI4K2B, která je po většinu času v neaktivní formě v cytosolu a její fyziologická role je stále nejasná^{2,3}.

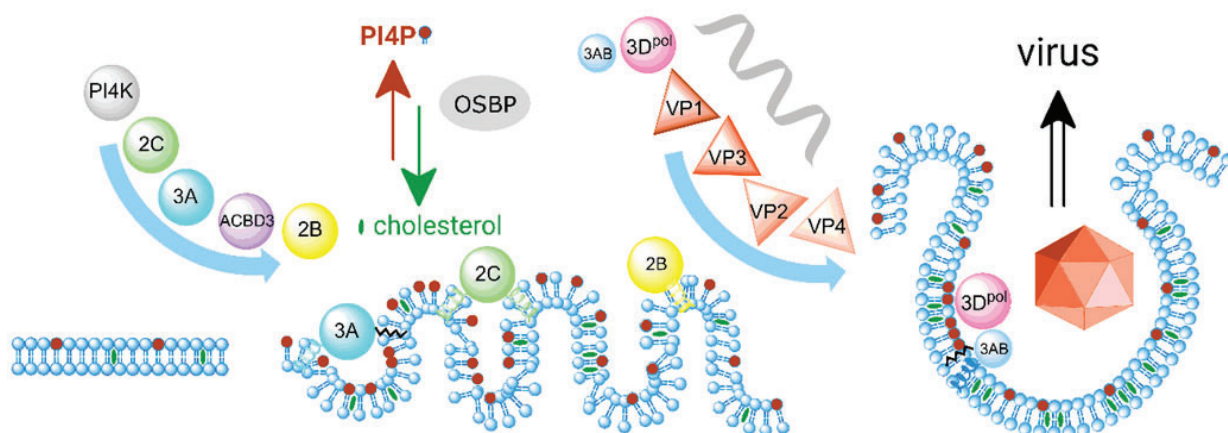
Mnoho lékařsky významných virů, jako je virus hepatitidy C (HCV) a mnoho různých virů ze skupiny pikornavirů, např. enteroviry, poliovirus (virus dětské obrny), coxsackieviry nebo rhinoviry, „zneužívá“ PI4K, protože ke své replikaci vyžadují membrány bohaté na PI4P. Ukázalo se, že téměř všechny tyto viry využívají PI4KB, s výjimkou několika kmenů HCV, které využívají PI4KA (cit.^{5,6}). Tato skutečnost postavila PI4K do centra vědecké



Obr. 1. **Struktura PI4K2A na membráně.** Kinasa je zakotvena na lipidové dvojvrstvě. Kotvící zbytky kyseliny palmitové jsou modelovány. ATP se nachází v blízkosti membránových N- a C-laloků, které jsou zbarveny oranžově, resp. azurově



Obr. 2. **Proteinový komplex kotvící PI4KB na membránu.** Model založený na strukturních datech (Klima a spol.)⁴



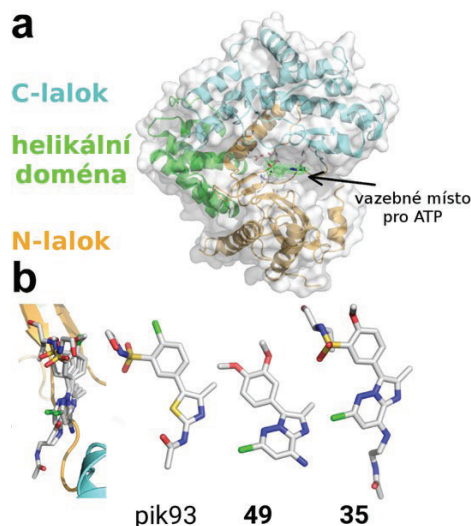
Obr. 3. **Schéma místa virové replikace.** Různé virové proteiny remodelují membránu a rekrutují PI4KB, což vede ke vzniku membrány bohaté na PI4P a cholesterol. Následně virová polymerasa, 3D^{pol}, syntetizuje nové molekuly RNA, které jsou pak zabaleny do virionů

ho zkoumání a struktury těchto enzymů byly brzo dostupné^{7–11}. Byla charakterizována také architektura heterokomplexů kinas PI4KB. Ta tvoří komplex s proteinem ABCD3, který sídlí v Golgiho aparátu¹² a je důležitý pro membránovou lokalizaci PI4KB – ACBD3 připoutává PI4KB k membráně Golgiho aparátu. Doména Q (bohatá na glutamin) ACBD3 se váže na N-koncový helix PI4KB s nanomolární afinitou⁴. Později se ukázalo, že PI4KB vytváří vysoce flexibilní heterokomplex PI4KB:Rab11:ACBD3 (obr. 2) a při fosforylaci PI4KB zahrnuje komplex také protein 14-3-3 (cit.^{13,14}). Je zajímavé, že interakce s 14-3-3 je konzervována od kvasinek až po člověka¹⁵.

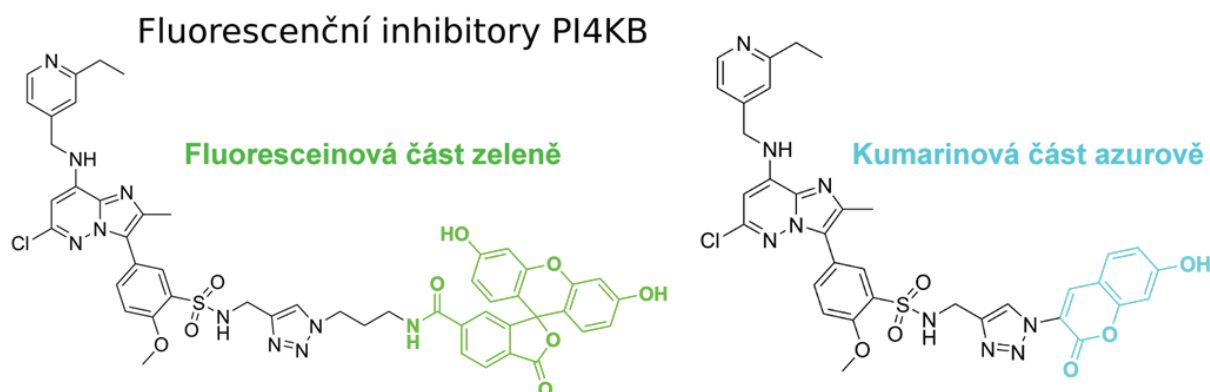
Pikornaviry manipulují s těmito komplexy založenými na PI4KB. Stačí jim k tomu malý protein 3A. Tento protein 3A interaguje s ACBD3 a je schopen rekrutovat kinasu PI4KB na membránu (+RNA viry se vždy replikují na membránové organele, obr. 3)^{12,16}. Strukturální analýza ukázala, že proteiny 3A z různých pikornavirů se omotávají kolem GOLD domény proteinu ACBD3. Jelikož 3A má transmembránový helix, dochází k ukotvení ACBD3 na cílové membráně a následnému navázání PI4KB. Předpokládalo se, že enzymový produkt PI4KB, lipid PI4P, specificky rekrutuje virové polymerasy¹⁷. Později se však ukázalo, že za vazbou virových polymeras na membránu nestojí konkrétně PI4P, ale spíše záporný náboj obecně¹⁸. Další významnou vlastností PI4P je jeho schopnost být vyměněn za jiný lipid, např. fosfatidylserin (PS)^{19–22} nebo cholesterol²³. Tento příklad ilustruje další důvod, proč některé viry „unášejí“ PI4KB. Konkrétně se jedná o viry, které vyžadují pro svou replikaci membránu s vysokým obsahem cholesterolu²⁴.

Když byla PI4KB identifikována jako cíl pro vývoj antivirových, začalo hledání jejích inhibitorů. Široce používaný pik93 je nanomolárním inhibitorem PI4KB, avšak postrádá selektivitu a inhibuje i jiné kinasy, například PI3K. Na základě informací publikovaných o vysoce účinném inhibitoru T-00127-HEV1 jsme spoluvinuli selektivní sloučeniny proti PI4KB (cit.²⁵). Tyto sloučeniny již

vykazovaly aktivitu v submikromolárním rozmezí v enzymových testech *in vitro* a v mikromolárním rozmezí proti coxsackieviru B3 (CVB3), lidskému rhinoviru (HRV) a viru hepatitidy C genotypu 1b (HCV 1b)²⁶. Důležitá je skutečnost, že krystalové struktury jak pik93, tak sloučeniny **49** (cit.²⁶) vázané na PI4KB byly k dispozici^{7,26}. Tyto strukturální informace byly využity a byly navrženy hybridní sloučeniny, jako je např. **35** (obr. 4) nesoucí vlastnosti obou mateřských sloučenin, tedy pik93 a **49** (obr. 4). Funkční a strukturální charakterizace odhalila, že způsob



Obr. 4. **PI4KB a její inhibitory.** a) Kinasová doména PI4KB se skládá z N-koncového laloku (oranžová) a C-koncového laloku (azurová), které jsou v těsném kontaktu se šroubovicovou doménou (zelená). Vazebné místo pro ATP se nachází mezi N- a C-koncovým lalokem. b) Zleva doprava: superpozice inhibitorů pik93, **49** a **35** v místě vazby ATP; struktury PIK93, **49** a **35**. Barevně rozlišeno podle atomů, přičemž uhlík je bílý, dusík modrý, síra žlutá a kyslík červený



Obr. 5. **Fluorescenční inhibitory PI4KB.** K vysoce specifickému inhibitoru PI4KB byly kovalentně připojeny fluorofory fluorescein (znázorněno zeleně) nebo kumarin (znázorněno modře)

vazby se podle očekávání podobá způsobu vazby pik93 a sloučeniny **49** (obr. 4). Zároveň byla potvrzena aktivita v jednociferném nanomolárním rozsahu v enzymových testech a silná ($EC_{50} < 100$ nM pro všechny sloučeniny) antivirová aktivita proti CVB3, HRV1 a HCV 1b (cit.²⁷). Důležitým poznatkem je, že tyto sloučeniny prokázaly výjimečnou specifitu vůči PI4KB, přičemž neukázaly žádnou reziduální aktivitu proti celému spektru lidského kinomu, tedy vůči všem kinasám přítomným v lidských buňkách²⁷.

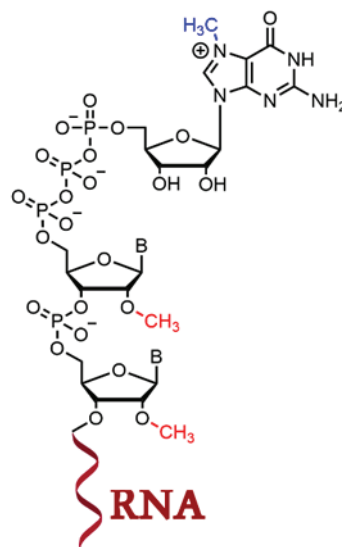
Dalším významným využitím, které strukturní informace umožňují, je specifická úprava studovaných molekul. Krystalové struktury PI4KB s několika inhibitory odhalily pozice uvnitř inhibitoru, kam lze připojit funkční skupinu, aniž by došlo k narušení vazby ligandu. V tomto případě byl k sulfonamidové části připojen fluorofor (obr. 5), čímž vzniklo specifické fluorescenční značení PI4K, které lze použít ke stanovení hodnot K_d *in vitro* nebo při zobrazování živých buněk²⁸.

3. Virové methyltransferasy modifikující čepičky RNA

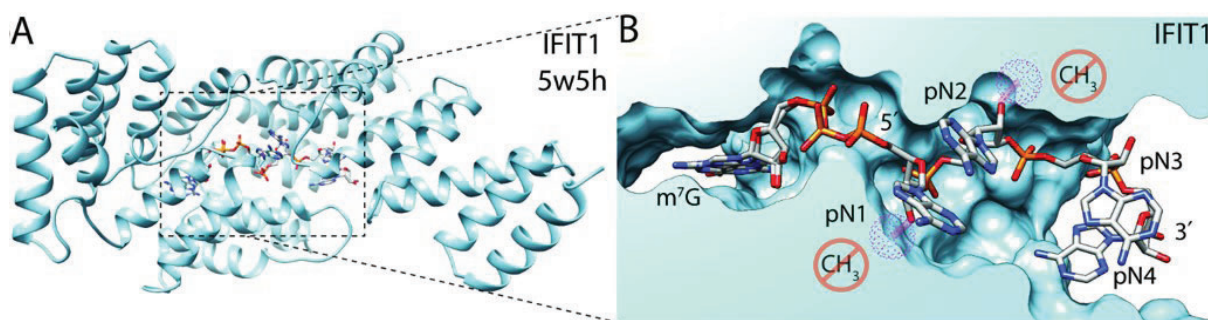
Lidská mRNA nese na svém 5' konci tzv. čepičku. Tato čepička je chemicky tvořena *N*7-methylovanou guaninovou bází, která je spojena s 5' koncem RNA pomocí trifosfátového mostu. Tato struktura se označuje jako cap-0 (z anglického cap – čepička). U vyšších eukaryot, včetně člověka, může být ribosový kruh prvního a druhého nukleotidu RNA methylován také v 2' poloze ribosy, čímž vzniká cap-1 (první ribosový kruh methylováný) a cap-2 (první a druhý kruh methylováný) (obr. 6). Tyto čepičky RNA jsou důležité pro stabilitu RNA, export RNA z buněčného jádra a jsou také nezbytné pro účinnou translaci RNA (cit.²⁹). Nedávno byly popsány další vzácné nekanonické čepičky, jako jsou NAD nebo dinukleosidové polyfosfáty^{30,31}, ale jejich biologický význam, zejména u virů, je třeba ještě určit^{32,33}.

Methylace RNA-čepiček byla alespoň částečně objevena díky virům³⁴. Brzy se ukázalo, že téměř všechny rodiny virů musí chránit 5' konec své RNA. Ne všechny viry však čepičku používají; například pikornaviry kovalentně připojují svůj protein 3B (známý také jako Vpg, viral protein genome-linked), který slouží jako primer – přesněji řečeno proteinový primer – pro syntézu pozitivního (+) i negativního (–) vlákna RNA (cit.³⁵).

Podobně jako u člověka je i u virové RNA (vRNA) čepička významná pro translaci virové RNA, přinejmenším u některých virových rodin a v určitých fázích virové infekce. Dalším významným důvodem pro opatření vRNA čepičkou je nutnost obrany úspěšného viru proti vrozené imunitě³⁷. Ve skutečnosti existuje mnoho receptorů pro



Obr. 6. **RNA opatřená methylovanou čepičkou.** Methylová skupina na guaninové bázi je zvýrazněna modře, methylové skupiny na prvním a druhém ribosovém kruhu jsou zvýrazněny červeně. B značí bázi



Obr. 7. Rozpoznávání neúplně methylované čepičky RNA zprostředkované proteinem IFIT1. a) Krystalová struktura IFIT1 s RNA cap-0 založená na PDB ID 5w5h. b) Detail vazebného místa IFIT1 s vyznačením pozic, kde by methylované kruhy ribosy vytvářely sterické kolize. Převzato a upraveno z Nencka a spol.³⁶

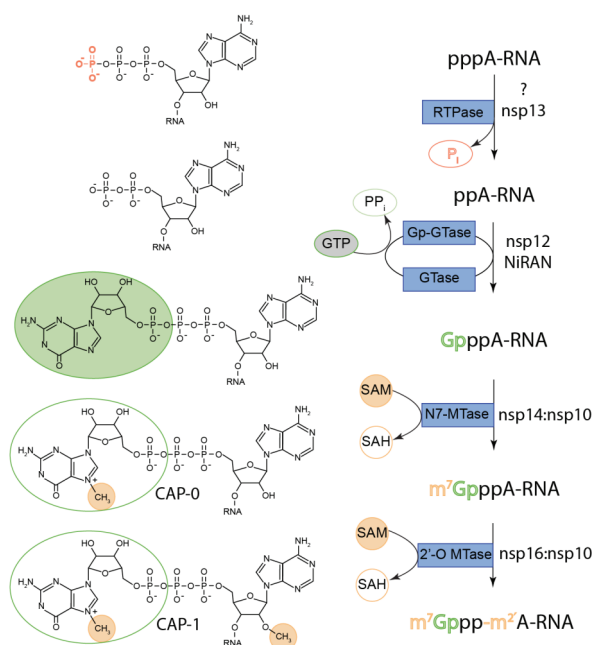
rozpoznávání pathogenních vzorů (PRR, z angl. pathogen recognition receptor), které mohou detekovat vRNA, včetně RNA bez čepičky či RNA s neúplnou čepičkou. Například interferonem indukované proteiny s tetra-riko-peptidovými repeticemi (IFIT) rozpoznávají vRNA a vážou se na ni³⁸ a inhibují tak translaci a replikaci viru (obr. 7). Dalším příkladem je RIG-I (z angl. retinoic acid-inducible gene I), který je kritickým PRR ve vrozeném imunitním systému, odpovědný za detekci vRNA. RIG-I je aktivován v přítomnosti dvouvláknové RNA a spouští signální kaskádu, která vede k produkci interferonů typu I a prozánětlivých cytokinů, což je nezbytné pro účinnou protivirovou imunitní odpověď³⁹.

Některé viry, zejména virus chřipky, „kradou“ RNA čepičky z buněčných RNA a vážou je na vRNA (cit.⁴⁰). Většina virů, včetně nebezpečných rodin virů s pandemickým potenciálem, jako jsou flaviviry, poxviry a koronaviry, však má vlastní enzymy pro syntézu čepiček a enzymová dráha jejich syntézy je podobná lidské (obr. 8). Mezi tyto enzymy patří *N7*- a *2'-O*-methyltransferasy (MTasy) a mohou být kovalentně spojeny s polymerasou⁴¹ nebo s ní kolokalizovat⁴². Proto je pravděpodobné, že inhibice virových MTas by učinila virus zranitelným vůči vrozené imunitní odpovědi, což by mohlo vést k odstranění viru nebo přinejmenším k asymptomatické infekci.

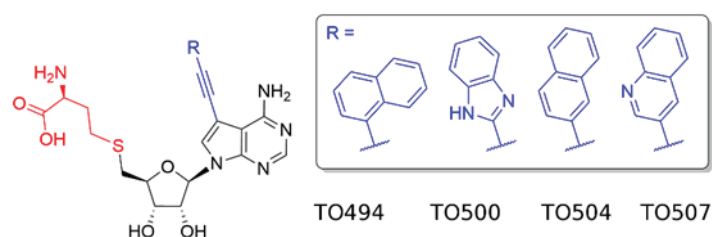
3.1. Inhibitory koronavirových methyltransferas

Koronaviry, včetně nechvalně známého SARS-CoV-2, mají dvě RNA MTasy: nsp14, která methyluje guaninovou bázi v poloze *N7* za vzniku cap-0, a nsp16, která v komplexu se svým aktivačním proteinem nsp10 methyluje první ribosový kruh počátečního nukleotidu RNA, což vede ke vzniku cap-1. Oba tyto enzymy jsou považovány za slibné cíle pro antivirotika, což vedlo k významnému pokroku v návrhu inhibitorů od začátku pandemie COVID-19 v naší i dalších laboratořích^{33,43–58}. Významnou roli sehrála strukturální biologie. Použili jsme homologní model SARS-CoV-2 nsp14, který vykazuje velkou podobnost se SARS-CoV nsp14 (v té době ještě nebyla k dispozici krystalová struktura SARS-CoV-2 nsp14), což vedlo k objevu nových derivátů *S*-adenosylhomocysteinu (SAH) s modifikacemi na adeninové nukleobázi. Tyto sloučeniny byly syntetizovány a testovány *in vitro*, přičemž byl odhalen jejich pozoruhodný inhibiční potenciál v jednociferném nanomolárním rozsahu vůči výše zmiňovanému enzymu. Naše modely interakcí těchto inhibitorů s nsp14 účinně vysvětlují, jak aromatická složka v poloze 7 u analogů SAH přispívá k jejich aktivitě⁵⁰ (obr. 9).

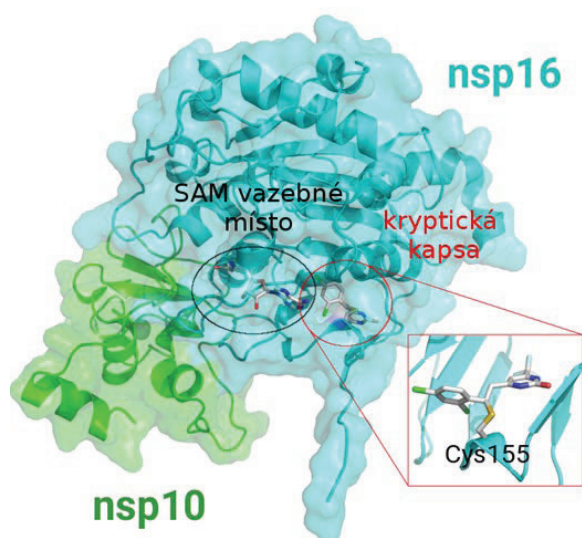
Podobně výpočetní studie naznačila existenci kryptických kapes v koronavirové MTase nsp16 (cit.⁵⁸). Nejprve byla pomocí vysoce výkonného screeningu identifikována sloučenina **5a**, která byla následně krystalizována



Obr. 8. Syntéza čepičky RNA u koronavirů. Převzato a upraveno z Nencka a spol.³⁶



Obr. 9. Inhibitory MTasy SARS-CoV-2 nsp14 odvozené od SAH (z angl. *S*-Adenosyl-*L*-homocysteine). Velké aromatické substituenty v poloze 7-deaza jsou zvýrazněny modře, aminokyselinová část je zvýrazněna červeně



Obr. 10. Kryptická kapsa v proteinu SARS-CoV-2 nsp16. Vazebné místo *S*-adenosylmethioninu a kryptická kapsa jsou zvýrazněny. Detailní pohled na kryptickou kapsu ukazuje kovalentní vazbu mezi malou inhibiční sloučeninou **5a** a zbytkem Cys155

s komplexem nsp16/nsp10. Pozoruhodné je, že byla pozorována v kapse v těsné blízkosti aktivního místa enzymu (obr. 10). S využitím této strukturní informace byly vyvinuty deriváty, které rovněž působily jako alosterické inhibitory⁵⁹.

4. STING, vrozená imunita a poxviry

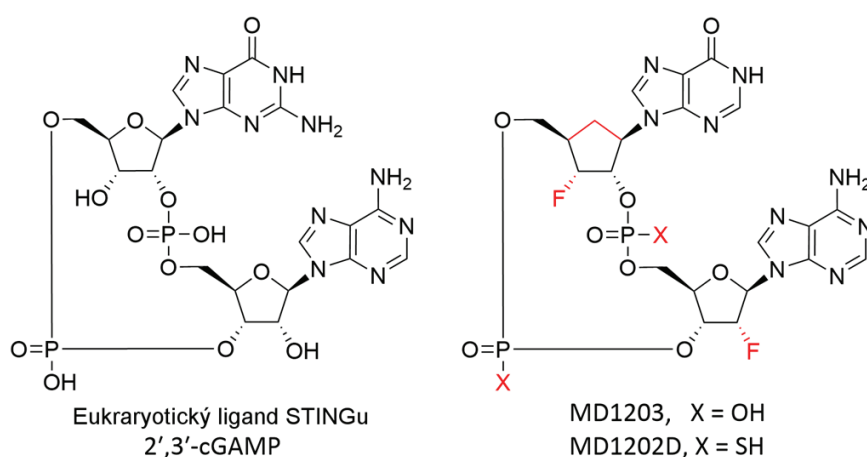
V poslední době se na všech kontinentech rychle rozšířil nový virus opičích neštovic neboli mpox virus (MPXV)⁶⁰. Tato epidemie pravděpodobně souvisí s ukončením očkování proti pravým neštovicím, které bylo účinné nejen proti pravým neštovicím, ale i proti jiným poxvirům, což zabránilo celosvětovému šíření MPXV. Nicméně rychlé šíření viru MPXV ukazuje, jak snadno může vznik-

nout nová pandemie, která by ohrozila naše životy i světovou ekonomiku.

Poxviry jsou DNA viry, které se replikují v cytoplazmě. Jejich rozsáhlý genom kóduje celý mechanismus replikace DNA a zpracování RNA, včetně mechanismu pro modifikaci virové RNA čepičkou^{61,62}. DNA by se v cytoplazmě neměla vyskytovat a její přítomnost v ní svědčí o infekci DNA virem. Dvouvláknová (dsDNA) je detekována cGAS-STING signální drahou. Protein cGAS (syntasa cyklického GMP-AMP nebo cGAMP) detekuje dsDNA a syntetizuje cyklický dinukleotid cGAMP, který aktivuje protein STING (stimulátor interferonových genů)⁶³. To následně vede k expresi interferonem indukovaných genů, což v buňce vyvolá antivirový stav. Jako protiváhu této dráze kódují poxviry neobvyklou nukleasu zvanou poxin, která rychle degraduje cGAMP (cit.^{64,65}). V poslední době bylo na ÚOCHB vyvinuto mnoho agonistů STING (cit.⁶⁶⁻⁷⁴), z nichž některé jsou odolné vůči štěpení poxinem (obr. 11).

4.1. Poxirové methyltransferasy a jejich inhibitory

Poxirové MTasy jsou rovněž považovány za *bona fide* cíle pro léčiva. Krystalová struktura 2'-*O*-MTasy MPXV, VP39, odhalila dutinu v těsné blízkosti adeninové báze *S*-adenosylmethioninu (SAM), kterou lze využít k přípravě účinných inhibitorů⁷⁵. Byly použity dva přístupy: i) vyhledávání inhibitorů VP39 ve velké knihovně látek a ii) návrh inhibitorů založený na krystalové struktuře VP39. Oba přístupy přinesly submikromolární inhibitory, které využívaly tuto dutinu, a je zajímavé, že některé z těchto inhibitorů, např. TO507 (obr. 9), měly stejnou chemickou strukturu jako nanomolární inhibitory proti SARS-CoV-2 MTase nsp14 (cit.⁷⁵). Tyto výsledky ilustrují, že stejná sloučenina může cílit na různé enzymy (*N7*-a 2'-*O*-MTase) z nepříbuzných virů. Všechny tyto inhibitory obsadily vazebné místo pro SAM a tudíž nemohou ovlivňovat vazbu RNA na enzym VP39 (cit.⁷⁶). Pokusy s živým virem v naší laboratoři na úrovni biologického zabezpečení stupně 3 ukázaly, že tyto sloučeniny účinně blokují replikaci viru MPXV (cit.⁷⁷).



Obr. 11. **Ligandy STING.** Vlevo: přirozený ligand cGAMP. Vpravo: Příklad ligandů připravených na ÚOCHB, které jsou odolné vůči štěpení poxinem

5. Budoucí vývoj

Strukturální biologie bude mít při navrhování inhibitorů i nadále zásadní význam. Očekává se však významný posun směrem k *in silico* metodám díky pokroku v oblasti umělé inteligence (AI). AlphaFold 2 již vyniká v předpovídání struktury proteinů a v blízké budoucnosti se očekává nástup AI, která dokáže přesně předpovídat vazbu ligandů. Takové umělé inteligence by byly přínosné zejména tam, kde je generování experimentálních krystalových struktur velmi náročné. Například zatímco identifikace inhibitorů virových polymeras, ať už jakoukoli metodou, je poměrně přímočará^{78–81}, získání jejich krystalové struktury může být velmi náročné, protože je třeba připravit krystaly ternárního komplexu, který obsahuje také RNA a její sekvence musí být optimalizována. V takových situacích jsme se dříve často spolehnali na modely odvozené z počítačových simulací⁸².

Dalším příkladem jsou vnitřně neuspořádané proteiny, nebo takové, které obsahují dobře složené domény propojené neuspořádanými segmenty, jako je například koronavirový protein N. Strukturální biologie je schopna tyto proteiny charakterizovat, často pomocí kombinace metod, jako je rozptyl rentgenového záření pod malým úhlem (SAXS) a počítačových simulací⁸³ – jak bylo nedávno ukázáno na proteinu N (cit.⁸⁴) – což vede k získání tisíců strukturálních modelů. Tyto struktury jsou následně seskupeny do několika skupin, neboli klastrů. V této oblasti by umělá inteligence mohla hrát neocenitelnou roli, a to identifikací klastru vhodného pro vazbu léčiva a návrhem sloučeniny, která by byla schopna „uzamknout“ protein v fyziologicky neaktivní konformaci.

Stejně jako v mnoha jiných vědních oborech se očekává, že AI změní a zdokonalí tradiční postup navrhování léčiv na základě struktury. Ničemně experimentální struk-

tury budou vždy nezbytné k ověření výsledků *in silico*; nikdo by se nepouštěl do nákladného vývoje léků pouze na základě předpovědi umělé inteligence s 90 až 95% přesností.

Tento výzkum byl financován z projektu Národního ústavu virologie a bakteriologie (program EXCELES, č. projektu LX22NPO5103) – financovaného Evropskou unií – Next Generation EU. Děkujeme také RVO: 61388963.

LITERATURA

1. Balla T.: *Physiol. Rev.* 93, 1019 (2013).
2. Balla A., Balla T.: *Trends Cell Biol.* 16, 351 (2006).
3. Boura E., Nencka R.: *Exp. Cell Res.* 337, 136 (2015).
4. Klíma M. a 14 spoluautorů: *Sci. Rep.* 6, 23641 (2016).
5. Altan-Bonnet N., Balla T.: *Trends Biochem. Sci.* 37, 293 (2012).
6. McPhail J. A., Burke J. E.: *Traffic* 24, 131 (2023).
7. Burke J. E., Inglis A. J., Perisic O., Masson G. R., McLaughlin S. H., Rutaganira F., Shokat K. M., Williams R. L.: *Science* 344, 1035 (2014).
8. Baumlova A. a 10 spoluautorů: *EMBO Rep.* 15, 1085 (2014).
9. Klíma M., Baumlova A., Chalupska D., Hrebabecky H., Dejmek M., Nencka R., Boura E.: *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 71, 1555 (2015).
10. Dornan G. L., Dalwadi U., Hamelin D. J., Hoffmann R. M., Yip C. K., Burke J. E.: *J. Mol. Biol.* 430, 3129 (2018).
11. Lees J. A. a 10 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13720 (2017).
12. Sasaki J., Ishikawa K., Arita M., Taniguchi K.:

- EMBO J. 31, 754 (2012).
13. Chalupska D., Eisenreichova A., Rozycki B., Rezabkova L., Humpolickova J., Klima M., Boura E.: J. Struct. Biol. 200, 36 (2017).
 14. Chalupska D., Rozycki B., Humpolickova J., Faltova L., Klima M., Boura E.: Sci. Rep. 9, 567 (2019).
 15. Eisenreichova A., Klima M., Boura E.: Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun. 72, 799 (2016).
 16. Greninger A. L., Knudsen G. M., Betegon M., Burlingame A. L., Derisi J. L.: J. Virol. 86, 3605 (2012).
 17. Hsu N. Y. a 13 spoluautorů: Cell 141, 799 (2010).
 18. Dubankova A., Humpolickova J., Klima M., Boura E.: Sci. Rep. 7, 17309 (2017).
 19. Chung J., Torta F., Masai K., Lucast L., Czapla H., Tanner L. B., Narayanaswamy P., Wenk M. R., Nakatsu F., De Camilli P.: Science 349, 428 (2015).
 20. Eisenreichova A., Rozycki B., Boura E., Humpolickova J.: Front. Mol. Biosci. 8, 747601 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.747601>.
 21. Eisenreichova A., Klima M., Anila M. M., Koukalova A., Humpolickova J., Rozycki B., Boura E.: Cells 12, 1974 (2023). <https://doi.org/10.3390/cells12151974>.
 22. Eisenreichova A., Humpolickova J., Rozycki B., Boura E., Koukalova A.: Biochimie 215, 42 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.09.003>.
 23. Antonny B., Bigay J., Mesmin B.: Annu. Rev. Biochem. 87, 809 (2018).
 24. Ishikawa-Sasaki K., Nagashima S., Taniguchi K., Sasaki J.: J. Virol. 92, (2018). <https://doi.org/10.1128/jvi.01952-17>.
 25. Arita M., Kojima H., Nagano T., Okabe T., Wakita T., Shimizu H.: J. Virol. 85, 2364 (2011).
 26. Mejdrova I. a 16 spoluautorů: J. Med. Chem. 58, 3767 (2015).
 27. Mejdrova I. a 18 spoluautorů: J. Med. Chem. 60, 100 (2017).
 28. Humpolickova J., Mejdrova I., Matousova M., Nencka R., Boura E.: J. Med. Chem. 60, 119 (2017).
 29. Ramanathan A., Robb G. B., Chan S. H.: Nucleic Acids Res. 44, 7511 (2016).
 30. Hudecek O., Benoni R., Reyes-Gutierrez P. E., Culka M., Sanderova H., Hubalek M., Rulisek L., Cvacka J., Krasny L., Cahova H.: Nat. Commun. 11, 1052 (2020).
 31. Mattay J.: Wiley Interdiscip. Rev.: RNA 13, e1730 (2022).
 32. Potuznik J. F., Cahova H.: mBio 11, (2020). <https://doi.org/10.1128/mbio.02131-20>.
 33. Benoni R., Krafcikova P., Baranowski M. R., Kowalska J., Boura E., Cahova H.: Viruses 13, 1722 (2021).
 34. Abdelaziz O. S., Waffa Z.: Rev. Med. Virol. 30, e2118 (2020).
 35. Paul A. V., Wimmer E.: Virus Res. 206, 12 (2015).
 36. Nencka R., Silhan J., Klima M., Otava T., Kocek H., Krafcikova P., Boura E.: Nucleic Acids Res. 50, 635 (2022).
 37. Nelemans T., Kikkert M.: Viruses 11, 961 (2019).
 38. Franco J. H., Chattopadhyay S., Pan Z. K.: Viruses 15, 342 (2023).
 39. Thoresen D., Wang W., Galls D., Guo R., Xu L., Pyle A. M.: Immunol. Rev. 304, 154 (2021).
 40. De Vlugt C., Sikora D., Pelchat M.: Viruses 10, 641 (2018).
 41. Dubankova A., Boura E.: Antiviral Res. 169, 104536 (2019).
 42. Horova V., Landova B., Hodek J., Chalupsky K., Krafcikova P., Chalupska D., Duchoslav V., Weber J., Boura E., Klima M.: Viruses 13, 1487 (2021).
 43. Aggarwal A., Kottur J.: Res. Sq. (2022). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1370473/v1>.
 44. Ahmed-Belkacem R. a 12 spoluautorů: J. Med. Chem. 65, 6231 (2022).
 45. Ahmed-Belkacem R., Sutto-Ortiz P., Guiraud M., Canard B., Vasseur J. J., Decroly E., Debart F.: Eur. J. Med. Chem. 201, 112557 (2020).
 46. Bobileva O. a 13 spoluautorů: ACS Med. Chem. Lett. 12, 1102 (2021).
 47. Dostalík P., Krafcikova P., Silhan J., Kozic J., Chalupska D., Chalupsky K., Boura E.: J. Virol. 95, (2021). <https://doi.org/10.1128/jvi.00463-21>.
 48. Kasprzyk R., Spiewla T. J., Smietanski M., Golojuch S., Vangeel L., De Jonghe S., Jochmans D., Neyts J., Kowalska J., Jemielity J.: Antiviral Res. 193, 105142 (2021).
 49. Krafcikova P., Silhan J., Nencka R., Boura E.: Nat. Commun. 11, 3717 (2020).
 50. Otava T. a 11 spoluautorů: ACS Infect. Dis. 7, 2214 (2021).
 51. Pearson L. A., Green C. J., Lin D., Petit A. P., Gray D. W., Cowling V. H., Fordyce E. A. F.: SLAS Discov. 26, 749 (2021).
 52. Rosas-Lemus M., Minasov G., Shuvalova L., Inniss N. L., Kiryukhina O., Brunzelle J., Satchell K. J. F.: Sci. Signaling 13, (2020). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abe1202>.
 53. Devkota K. a 19 spoluautorů: SLAS Discov. 26, (2021). <https://doi.org/10.1177/24725552211026261>.
 54. Khalili Yazdi A., Li F., Devkota K., Perveen S., Ghiabi P., Hajian T., Bolotokova A., Vedadi M.: SLAS Discov. 26, 757 (2021).
 55. Klima M. a 13 spoluautorů: Protein Science 31, e4395 (2022).
 56. Li F. a 14 spoluautorů: Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. 1867, 130319 (2023).
 57. Rona G. a 16 spoluautorů: Cell Death Differ. 29, 285 (2022).
 58. Vithani N., Ward M. D., Zimmerman M. I., Novak B., Borowsky J. H., Singh S., Bowman G. R.: Biophys. J. 120, 2880 (2021).
 59. Inniss N. L. a 23 spoluautorů: ACS Infect. Dis. 2023, 1918 (2023). <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00203>.
 60. Antinori S., Casalini G., Giacomelli A., Rodriguez-Morales A. J.: Infez. Med. 31, 269 (2023).

61. Yang Z., Gray M., Winter L.: *Cell Biosci.* 11, 96 (2021).
62. Meade N., DiGiuseppe S., Walsh D.: *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* 10, e1515 (2019).
63. Hopfner K. P., Hornung V.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 501 (2020).
64. Eaglesham J. B., Pan Y. D., Kupper T. S., Kranzusch P. J.: *Nature* 566, 259 (2019).
65. Duchoslav V., Boura E.: *Arch. Virol.* 168, 192 (2023).
66. Dejmk M. a 12 spoluautorů: *Eur. J. Med. Chem.* 259, 115685 (2023).
67. Dejmk M. a 15 spoluautorů: *Structure* 30, 1146 (2022).
68. Novotna B. a 13 spoluautorů: *Biochemistry* 60, 3714 (2021).
69. Novotna B. a 19 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 62, 10676 (2019).
70. Pimkova Polidarova M. a 17 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 64, 7596 (2021).
71. Smola M., Birkus G., Boura E.: *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* 75, 593 (2019).
72. Smola M. a 10 spoluautorů: *Angew. Chem.* 60, 10172 (2021).
73. Vavrina Z., Gutten O., Smola M., Zavrel M., Aliakbar Tehrani Z., Charvat V., Kozisek M., Boura E., Birkus G., Rulisek L.: *Biochemistry* 60, 607 (2021).
74. Vavrina Z. a 15 spoluautorů: *J. Med. Chem.* 65, 14082 (2022).
75. Silhan J., Klima M., Otava T., Skvara P., Chalupska D., Chalupsky K., Kozic J., Nencka R., Boura E.: *Nat. Commun.* 14, 2259 (2023).
76. Skvara P., Chalupska D., Klima M., Kozic J., Silhan J., Boura E.: *Antiviral Res.* 216, 105663 (2023).
77. Zgarbova M., Otava T., Silhan J., Nencka R., Weber J., Boura E.: *Antiviral Res.* 218, 105714 (2023).
78. Dejmk M., Konkolova E., Eyer L., Strakova P., Svoboda P., Sala M., Krejцова K., Ruzek D., Boura E., Nencka R.: *Viruses* 13, 1585 (2021).
79. Konkolova E., Dejmk M., Hrebabecky H., Sala M., Boserle J., Nencka R., Boura E.: *Antiviral Res.* 182, 104899 (2020).
80. Konkolova E. a 11 spoluautorů: *Molecules* 27, 1894 (2022).
81. Milisavljevic N. a 14 spoluautorů: *ACS Infect. Dis.* 7, 471 (2021).
82. Sebera J., Dubankova A., Sychrovsky V., Ruzek D., Boura E., Nencka R.: *Sci. Rep.* 8, 11132 (2018).
83. Rozycki B., Boura E.: *J. Phys.: Condens. Matter* 26, 463103 (2014).
84. Rozycki B., Boura E.: *Biophys. Chem.* 288, 106843 (2022).

E. Bouřa (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*): **Structural Biology in Antiviral Research – A Story Illustrated by the Tales of Lipid Kinases, STING and Viral Methyltransferases**

This article focuses on the role of structural biology in the development of small molecules that serve as protein ligands, which could potentially be used as drugs in the future. Experimental methods are utilized to obtain structural information about proteins, which then allow for virtual screening of extensive libraries of substances. The discovered ligands are further experimentally verified, with structural biology playing a crucial role in their refinement. The goal is to develop a ligand with high affinity and specificity, which could become an effective medicine. This is followed by the optimization of these substances from a chemical and pharmacological standpoint. The entire process is illustrated with examples from the recent past, such as lipid kinases, the stimulator of interferon genes (STING), and viral methyltransferases.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: antivirals, lipid kinase, STING, methyltransferase, virus

Acknowledgements

This research was funded by the project the National Institute Virology and Bacteriology (Programme EXCELES, Project No. LX22NPO5103) – Funded by the European Union – Next Generation EU. RVO: 61388963 is also acknowledged.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

Rektor Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vyhláší, ve smyslu § 49 odst. 5 a 6 Zákona 111/1998 Sb., přijímací řízení pro akademický rok 2024/2025 do následujících doktorských studijních programů uskutečňovaných na fakultách VŠCHT Praha:

Fakulta chemické technologie

Studijní programy:

Chemie a chemické technologie
Chemie a technologie materiálů
Chemie
Bioinformatika
Konzervační vědy v péči o hmotné kulturní dědictví
Léčiva a biomateriály

Studijní programy typu double degree (dvojitý diplom)
ve spolupráci se zahraničními vysokými školami:

Chemie a chemické technologie
Chemie a technologie materiálů
Chemie

Fakulta technologie ochrany prostředí

Studijní programy:

Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Energie a paliva

Studijní program typu double degree (dvojitý diplom)
ve spolupráci se zahraničními vysokými školami:

Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Studijní programy:

Mikrobiologie
Biotechnologie
Chemie a technologie potravin
Biochemie a bioorganická chemie
Potraviny a přírodní produkty
Biotechnologie léčiv

Studijní programy typu double degree (dvojitý diplom)
ve spolupráci se zahraničními vysokými školami:

Biotechnologie
Biochemie a bioorganická chemie

Fakulta chemicko-inženýrská

Studijní programy:

Chemické a procesní inženýrství
Chemie
Molekulární chemická fyzika a sensorika
Měření a zpracování signálů v chemii
Léčiva a biomateriály

Studijní programy typu double degree (dvojí diplom)
ve spolupráci se zahraničními vysokými školami:

Chemické a procesní inženýrství
Chemie

Všechny doktorské studijní programy typu double degree (dvojí diplom) ve spolupráci se zahraničními vysokými školami jsou uskutečňovány prezenční formou.

Všechny ostatní doktorské studijní programy jsou uskutečňovány formou prezenční nebo kombinací prezenční a distanční formy.

Standardní doba studia v DSP je čtyři roky. V doktorských studijních programech uskutečňovaných v českém jazyce může student studovat s podporou stipendia po celou standardní dobu studia v prezenční formě.

Všechny inzerované doktorské studijní programy s výjimkou programu Konzervační vědy v péči o hmotné kulturní dědictví jsou akreditovány rovněž pro uskutečňování v anglickém jazyce.

Přihlášky ke studiu v předepsaném formuláři včetně povinných příloh, uvedených na webových stránkách VŠCHT Praha (studuj.vscht.cz), a doplněné posudkem zdravotní způsobilosti ke studiu ve zvoleném oboru dizertační práce podávejte nejpozději **do 15. dubna 2024**.

Pro studijní programy typu double degree je vyhlášen první termín pro podávání přihlášek **do 29. února 2024**.

SOUTĚŽ

na logo Školy hmotnostní spektrometrie – 2. kolo

Sekce hmotnostní spektrometrie SSJMM vyhlašuje soutěž na **návrh loga** Školy hmotnostní spektrometrie.

Škola hmotnostní spektrometrie:



Výuková akce pořádaná Spektroskopickou společností Jana Marka Marci určená pro začínající i zkušené odborníky v oblasti hmotnostní spektrometrie.

Podmínky soutěže:

- Použitá grafika musí mít jasnou souvislost s hmotnostní spektrometrií (např. spektrum, píky, elektrosprej, kvadrupól apod.). Grafiku (její vhodnost pro logo, souvislost s hmotnostní spektrometrií apod.) lze během přípravy návrhu konzultovat se Zadavatelem.
- Název lze použít ve formě „Škola hmotnostní spektrometrie“, „Škola MS“, nebo (nejméně preferovaná varianta) „MS Škola“.
- Nebudou použity barevné přechody.
- Pokud bude návrh v barevném provedení, bude zpracována i černobílá verze.
- Logo musí být univerzálně použitelné v různých velikostech (web, tašky, propagační předměty...).

Logo by podle účastníků 24. Školy MS mělo být:

Jednoduché, minimalistické, zapamatovatelné, srozumitelné, rozpoznatelné, nadčasové, elegantní, výstižné – na první pohled související s hmotnostní spektrometrií, barevné, ale ne příliš.

Formát:

Návrh bude odevzdán v elektronické podobě ve formě vektorové grafiky a současně ve formě náhledu v pdf souboru, kde bude logo zobrazeno ve dvou velikostech (velké, v průměru aspoň 15 cm, a malé, v průměru cca 2 cm). Pokud je barevné řešení jiné než černobílé, odevzdá soutěžící taktéž černobílou mutaci loga.

Termín:

Soutěžní návrhy je nutno doručit na adresu tajemníka Spektroskopické společnosti JMM Tomáše Vašiny (immss@spektroskopie.cz) nejpozději do **29. února 2024**.

Cena pro vítěze:

Peněžitá odměna **20 000,- Kč**.

Další podmínky:

Vyhlašovatel si vyhrazuje právo nevybrat žádný z předložených návrhů a neudělit cenu.

Autor vítězného návrhu dává SSJMM souhlas k plnému využití díla a přenechává jim veškerá práva z díla plynoucí.

OBSAH**ÚVODNÍK**

Jubilejní minisymposium k 70. výročí založení ÚOCHB 717
J. Cvačka

Čestné členství České společnosti chemické za příkladnou reprezentaci české chemie a biochemie na mezinárodním i vnitrostátním fóru bylo uděleno RNDr. PhDr. Zdeňkovi Hostomskému, CSc., dr.h.c. 719
J. Barek

Redaktor časopisu Chemické listy prof. Ing. František Švec, DrSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové získal Cenu Neuron 2023 za celoživotní přínos vědě v oboru chemie 720
J. Barek

Šormiáda 721
A. Kasal

REFERÁTY

Rozmanitost spektroskopie Ramanovy optické aktivity 722
P. Bouř

Peptid uvolňující prolaktin: neuropeptid s nevhodným jménem, ale vhodnými vlastnostmi pro léčbu obezity, diabetu 2. typu i Alzheimerovy nemoci 732
B. Železná, A. Pačesová, V. Strnadová, J. Kuneš a L. Maletínská

Role permeačních testů *in vitro* v preklinickém výzkumu potenciálních léčiv 739
H. Mertlíková-Kaiserová

Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie. Část II 747
Š. Strnad, V. Vrkoslav a J. Cvačka

Strukturální biologie v antivirovém výzkumu na příběžích kinas lipidů, proteinu STING a virových methyltransferas 755
E. Bouřa

CONTENTS**EDITORIAL**

Jubilee Minisymposium Devoted to the 70th Anniversary of the Founding of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry 717
J. Cvačka

The Czech Chemical Society Awarded RNDr. PhDr. Zdeněk Hostomský, CSc., dr.h.c. the Membership of Honour for an Outstanding Representation of Czech Chemistry and Biochemistry in Both International and Domestic Forums 719
J. Barek

Prof. Ing. František Švec, DSc., of the Faculty of Pharmacy of the Charles University in Hradec Králové Obtained the Neuron Prize 2023 for His Lifework in the Field of Chemistry 720
J. Barek

Šormiáda 721
A. Kasal

REVIEW ARTICLES

Variability of the Raman Optical Activity Spectroscopy 722
P. Bouř

Prolactin-Releasing Peptide, a Peptide with an Improper Name, but Proper Biological Activity for Obesity, Type-2 Diabetes, and Alzheimer's Disease Treatment 732
B. Železná, A. Pačesová, V. Strnadová, J. Kuneš, and L. Maletínská

The Role of Permeation Assays in Preclinical Drug Discovery 739
H. Mertlíková-Kaiserová

Location of Double or Triple Bonds in Lipids Using Mass Spectrometry, Part II 747
Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka

Structural Biology in Antiviral Research – A Story Illustrated by the Tales of Lipid Kinases, STING and Viral Methyltransferases 755
E. Bouřa




 VYCESTUJTE NA
ZAHRAŇIČNÍ STÁŽ
 12 MĚSÍCŮ | PRESTIŽNÍ UNIVERZITA | VLASTNÍ VÝBĚR

MÁTE PH.D., PROJEKT V OBORU ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ NEBO MEDICINÁLNÍ CHEMIE A JE VÁM MĚNĚ NEŽ 35 LET?

PŘIHLASTE SE DO
15. BŘEZNA 2024

www.experientia.cz



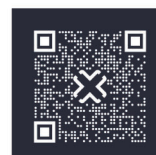


 ZALOŽTE SI
VÝZKUMNOU SKUPINU
 START-UP GRANT | 2 MIL. Kč ROČNĚ | PO DOBU 3 LET

VRÁTILI JSTE SE ZE ZAHRAŇIČNÍ STÁŽE, MÁTE MAXIMÁLNĚ 7 LET OD UKONČENÍ PH.D. STUDIA A PROJEKT V OBORU ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ NEBO MEDICINÁLNÍ CHEMIE?

PŘIHLASTE SE DO
15. BŘEZNA 2024

www.experientia.cz



CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 117 (2023), čís./no. 12 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 147, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 133 • 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 • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurásek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffner, 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, 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 PŘEDPLATNĚM, 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 • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2023 (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 • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://casii.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 29.11.2023.

Úvodníky

Editorials

| | |
|--|-----|
| Šťastné nově (<i>V. Vyskočil</i>) | 1 |
| Vážené kolegyně a kolegové, vážení čtenáři (<i>M. Němec</i>) | 85 |
| O stylistice našich autorů (<i>J. Podešva</i>) | 137 |
| V dubnu o dubu i Dubně (<i>P. Holý</i>) | 189 |
| Před sto lety zemřel Wilhelm Conrad Röntgen (<i>J. Fiala</i>) | 277 |
| Chemické společnosti (jejich časopisy), Open Access a transformační smlouvy (<i>J. Jirát a E. Dibuszová</i>) | 345 |
| Umělá inteligence píše pro Chemické listy (<i>B. Kratochvíl</i>) | 346 |
| Národní institut virologie a bakteriologie – reakce na hrozby dalších pandemií (<i>M. Rumlová a T. Ruml</i>) | 393 |
| Jak se ujistit, že dostanete Nobelovu cenu (<i>M. Lebl</i>) | 485 |
| Konečně září, konečně chemie (<i>P. Šmejkal</i>) | 537 |
| Chemické listy – Listy chemické (<i>P. Drašar</i>) | 593 |
| 75. sjezd chemických společností (<i>T. Navrátil</i>) | 669 |
| Jubilejní minisymposium k 70. výročí založení ÚOCHB (<i>J. Cvačka</i>) | 717 |
| Čestné členství České společnosti chemické za příkladnou reprezentaci české chemie a biochemie na mezinárodním i vnitrostátním fóru bylo uděleno RNDr. PhDr. Zdeňkovi Hostomskému, CSc., dr.h.c. (<i>J. Barek</i>) | 719 |
| Redaktor časopisu Chemické listy prof. Ing. František Švec, DrSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové získal Cenu Neuron 2023 za celoživotní přínos vědě v oboru chemie (<i>J. Barek</i>) | 720 |
| Šormiáda (<i>A. Kasal</i>) | 721 |

Referáty

Review Articles

| | |
|--|-----|
| <i>P. Dvořák a V. Vyskočil</i> : Netradiční filmové elektrody ve voltametrické a ampérometrické analýze organických sloučenin | 3 |
| <i>M. Němec</i> : Principy a použití urychlovačové hmotnostní spektrometrie | 86 |
| <i>V. Valášek, M. Petrová, I. Světlík, V. Brychová, J. Kubančák a K. Pachnerová Brabcová</i> : Milníky a vybrané aplikace radiouhlíkového datování | 94 |
| <i>V. Brychová, L. Davidová, I. Světlík, K. Pachnerová Brabcová, M. Petrová a G. Florescu</i> : Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza | 100 |
| <i>J. Kučera, J. Kameník, R. Garba, a Pavel P. Povinec</i> : Metodika a aplikace stanovení kosmogenních radionuklidů ¹⁰ Be a ²⁶ Al urychlovačovou hmotnostní spektrometrií | 107 |
| <i>M. Daňo, M. Němec, M. Mindová, J. John, E. Viglašová a B. Cziferi</i> : Metody a využití stanovenia ¹²⁹ I urychlovačovou hmotnostnou spektrometriou | 114 |
| <i>T. Prášek, M. Němec a K. Fenclová</i> : Stanovení ²³⁶ U urychlovačovou hmotnostní spektrometrií a jeho využití | 122 |
| <i>K. Fenclová, M. Němec a T. Prášek</i> : Stanovení plutonia a dalších vybraných aktinoidů metodou urychlovačové hmotnostní spektrometrie | 128 |
| <i>I. Hagarová a L. Nemček</i> : Detailnější pohľad na extrakčné postupy vhodné na separáciu nanočastic zlata z environmentálnych vôd | 138 |
| <i>M. Mergová, A. Balažová, M. Obložinský, I. Holková, P. Mučaji a S. Bittner Fialová</i> : Jasmonáty, ich biosyntéza, metabolismus a signálna dráha v rastlinných organizmoch | 147 |
| <i>J. Aubrecht a D. Kubička</i> : Hledání „zeleného“ hydrogenolýzního katalyzátoru | 191 |
| <i>E. Šárka, K. Caltová, P. Smrčková, R. Bleha, I. Marek, V. Fila a M. Lhotka</i> : Ekologické aspekty a aplikace škrobu | 196 |
| <i>O. J. Míka</i> : Nebezpečí vybraných podlimitních zdrojů rizika se zaměřením na amoniak v podmínkách České republiky | 208 |
| <i>B. Kratochvíl</i> : Mineralogická a ložiskově-geologická expertiza hlavice děkanského žezla Fakulty chemické technologie VŠCHT Praha | 214 |
| <i>M. Jurášek a P. Drašar</i> : O duchu (duši) z vína | 278 |
| <i>D. Maršík</i> : Lignin a jeho biokonverze na polyhydroxyalkanoáty bakterií <i>Pseudomonas putida</i> | 282 |
| <i>A. Špačková a K. Hroboňová</i> : Příprava a použití polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekúl v súlade s princípmi zelenej chémie | 290 |
| <i>J. Zemanová a K. Šustová</i> : Problematika hořkých peptidů vznikajících v procesu zrání sýrů | 301 |

| | |
|---|-----|
| F. Švec: Zanedbávané aplikace monolitických struktur: Počátky planární chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí | 308 |
| B. Kratochvíl a E. Benešová: Konjugáty protilátka-léčivo, spojení velkých a malých terapeutických molekul | 319 |
| M. Jurášek a P. Drašar: O halucinogenním oříšku v naší kuchyni..... | 348 |
| I. Hůnová: Námraza jako relevantní součást atmosférické depozice v horských oblastech | 352 |
| M. Šolcová a S. Purkrťová: Využití moderních metod pro stanovení rezistence k antibiotikům | 358 |
| V. Výbohová a K. Hroboňová: Izolácia prírodných zlúčenín s organoleptickými vlastnosťami použitím vybraných pokročilých extrakčných techník | 365 |
| F. Švec: Zanedbávané aplikace monolitických struktur: Pokročilé studie tenkovrstvé chromatografie-hmotnostní spektrometrie | 395 |
| M. Shamzhy: Současné úspěchy v návrhu zeolitových katalyzátorů | 407 |
| R. Chalupa a K. Nesměrák: Chemická výročí roku 2023 spojená s Univerzitou Karlovou | 419 |
| D. Čáková, N. Jelenová a J. Viktorová: Využití reportérových testů při sledování buněčného stresu a toxicity | 487 |
| M. Jurášek, L. Opletal a P. Drašar: O lesním entheogenu | 495 |
| V. Procházka, I. Suchara, L. Thinová, J. Mížera, J. Sucharová a J. Hraníček: Stabilní a radioaktivní cesium v přírodním prostředí | 501 |
| L. Pejškova, K. Loužecká, T. Podzimek a E. Benešová: L-Asparaginasy a jejich potenciál v medicíně a potravinářství | 508 |
| D. Haluška, O. Lyutakov a V. Švorčík: Elektrochemická depozícia mikro- a nanostruktur ľubovoľného tvaru | 539 |
| M. Jurášek, J. Cabalka a P. Drašar: O síle paňdžábského asfaltu | 547 |
| L. Trnková a I. Trísková: Elektroanalýza insulínu na nanokompozitních elektrodách | 551 |
| L. Moráňová, M. Bartošik, J. Strmisková a K. Nováková: Elektrochemická analýza klinických vzorků – cesta k translačnímu výzkumu | 595 |
| E. Navrátilová Radinová, E. Mašková, K. Kubová a J. Vysloužil: Nanočástice jako léková forma v praxi | 604 |
| V. Bělohav, T. Jirout, J. Elster, J. Liška, L. Nedbalová a J. Kviderová: Kultivace polárních mikrořas v otočném deskovém fotobioreaktoru | 613 |
| V. Šedajová, A. Bakandritsos a M. Otyepka: Kovalentně funkcionalizované grafenové deriváty jako aktivní elektrodové materiály pro superkondenzátory | 619 |
| J. Jarolínková a Z. Kolská: Metody fixace dusíku a jeho redukce na amoniak | 628 |
| M. Jurášek, B. Kratochvíl, M. Kohout, F. Švec a P. Drašar: O oddělení a posílení obrazu za zrcadlem (deracemizace a amplifikace chiralita) | 671 |
| M. Sabolová, J. Fišnar a Z. Řeblová: Vitamin E – doporučený a skutečný příjem | 677 |
| Š. Strnad, V. Vrkoslav a J. Cvačka: Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie. Část I | 684 |
| P. Bouř: Rozmanitost spektroskopie Ramanovy optické aktivity | 722 |
| B. Železná, A. Pačesová, V. Strnadová, J. Kuneš a L. Maletínská: Peptid uvolňující prolaktin: neuropeptid s nevhodným jménem, ale vhodnými vlastnostmi pro léčbu obezity, diabetu 2. typu i Alzheimerovy nemoci ... | 732 |
| H. Mertlíková-Kaiserová: Role permeačních testů <i>in vitro</i> v preklinickém výzkumu potenciálních léčiv | 739 |
| Š. Strnad, V. Vrkoslav a J. Cvačka: Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie. Část II | 747 |
| E. Bouřa: Strukturní biologie v antivirovém výzkumu na příbězích kinas lipidů, proteinu STING a virových methyltransferas | 755 |

Původní a metodické práce

Original and Methodical Papers

| | |
|---|-----|
| P. Doležal, M. Davidková, P. Vovesný a P. Drašar: Feromonový odparník <i>Acumiprotect</i> pro odchyt lýkožrouta vrcholkového, <i>Ips acuminatus</i> (Coleoptera; Curculionidae) | 13 |
| K. Chomaničová, Š. Husár, M. Sýkorová, K. Birošíková a B. Vladovičová: Vývoj matricových tablet s prodlouženým uvolňováním pramipexolu | 17 |
| T. Podskalská, K. Řihová, V. Kružík, T. Škorpilová, V. Smutná, J. Potančoková a H. Čížková: Možnosti detekce falšování citronových šťáv a nápojů na bázi citronů | 23 |
| R. Jelínková, I. Moravcová a P. Žuja: Orientační test přítomnosti derivátů fentanylové řady metodou tenkovrstvé chromatografie | 155 |
| J. Zuzáková, D. Janák, E. Vobecká a J. Řihová Ambrožová: Využití somatických kolifágů při sledování hygienické nezávadnosti recyklovaných odpadních vod | 163 |
| J. Stárek, Z. Zwaan, M. Zlámal, M. Paidar, A. Černín, L. Malý, J. Kinčl a V. Sýkora: Aplikace inteligentní membránové separace | 330 |

| | |
|---|-----|
| <i>B. Galajdová, J. Žitka, L. Pavlovec, O. Trhlíková, J. Kredatusová a R. Konefal:</i> Syntéza a elektrochemické vlastnosti elektrolýtů na bázi fosfoniových, sulfoniových a imidazoliových iontových kapalin pro použití v lithium-iontových bateriích | 373 |
| <i>I. Ivanko, E. Tomšík a M. Hrubý:</i> Vývoj chytrých potenciometrických senzorů potažených vrstvami odolnými biopasivací pro detekci raného stádia zánětlivých procesů kolem kloubních náhrad | 425 |
| <i>J. Hrouzek, N. Grigová, T. Pócssová, A. Szarka a S. Hrouzková:</i> Štúdium vybraných parametrov analytických metód na kontrolu kontaminácie propolisovej tinktúry | 433 |
| <i>S. Černá, K. Benešová a J. Martiník:</i> Stanovení organických kyselin ve speciálních pivech a nápojích na bázi piva pomocí kapilární izotachoforézy | 516 |
| <i>L. Melich, M. Fořtová, B. Hosnedlová, J. Podhajský, O. Rychlý, J. Werle, K. Burešová, L. Vysloužilová, K. Dunovská, E. Klapková, K. Kotaška, J. Čepová, B. Jedličková, O. Štěpánková, R. Průša a R. Kizek:</i> Studium hladiny metalothioneinu v séru pacientů se zhoubným nádorem | 573 |
| <i>H. Hrušková, I. Voráčová, M. Laštovičková, M. Killinger a F. Foret:</i> Epitachoforéza – metoda pro získávání biomakromolekul z komplexních matic | 634 |
| <i>M. Barna, J. Čepová, K. Dunovská, J. Petrus, P. Melicherčík, R. Průša, R. Kizek a E. Klapková:</i> Chemiluminiscenční a fotometrická analýza matrix Gla proteinu u pacientů s onemocněním pohybového aparátu | 694 |
| <i>V. Berková, L. Štěpánková, P. Čičmanec, M. Berka a L. Frejlichová:</i> Metodika pro stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity rostlinných vzorků pomocí kombinované extrakce | 701 |

Nomenklatura a terminologie

Nomenclature and Terminology

| | |
|--|-----|
| <i>P. Drašar, J. Kozler a O. Paleta:</i> Huminové látky, charakterizace a názvoslovné doporučení | 581 |
|--|-----|

Chemický průmysl

Chemical Industry

| | |
|---|-----|
| <i>M. Šilhan, L. Novák a A. Mlčoch:</i> Strategická výzkumná agenda SUSCHEM CZ | 170 |
| <i>T. Herink, J. Pašek, J. Krupka, P. Fulín a J. Lederer:</i> Historie výzkumu, vývoje a realizace výroby dicyklopentadienu v Litvínově | 219 |
| <i>P. Polívka a M. Šilhan:</i> Parametry a potenciál revitalizace nevyužívaných průmyslových ploch (brownfieldů) pro výrobu vodíku | 585 |

Výuka chemie

Education in Chemistry

| | |
|--|-----|
| <i>J. Kalina a M. Lach:</i> „Polarimetr“ – experiment pro výuku | 30 |
| <i>K. Petrželová, K. Sadílková a M. Klečková:</i> Exkurze do chemických podniků – metodika, tvorba interaktivní mapy chemického průmyslu a podpůrných materiálů | 177 |
| <i>Z. Holík Purkrtová:</i> Leptání a barvení kraslic jako chemický pokus pro školní výuku | 227 |
| <i>D. Šarboch, M. Teplá a I. Rajsiglová:</i> Jak učit biochemii? Mezipředmětově a s podporou dynamické vizualizace! | 384 |
| <i>M. Teplá a M. Šrámek:</i> Tipy a rady při sestavování testových úloh z chemie | 438 |
| <i>M. Ganajová, I. Sotáková a H. Čtrnáctová:</i> Systémové úlohy vo výučbe organickej chémie | 522 |
| <i>A. Airaksinen, F. Concia, S. Das, P. Distler, J. John, E. Macerata, M. Mariani, E. Mossini, M. Negrin, M. Němec, V. Potgjeffer, T. Retegan, M. Štork, M. Teplá a C. Walther:</i> Hromadný otevřený online kurz „Význam radiochemie pro naši společnost“ | 708 |

Diskuse

Discussion

| | |
|--|----|
| <i>J. Vacek:</i> Úvaha o funkčnosti (dekonstrukci) našeho vzdělávacího procesu | 37 |
|--|----|

Bulletin Asociace českých chemických společností

| | |
|---|-------------------|
| Pováleční předsedové Československé společnosti chemické, předchůdci prof. Čůty (<i>P. Drašar</i>) | 43 |
| Předsedové společnosti chemické v letech 1904–1943 (<i>P. Drašar</i>) | 48 |
| Jacques Guérin: Chemik-mecenáš a spoluvůrce proustovského mýtu (<i>R. Chalupa a K. Nesměrák</i>) | 235 |
| Předsedové ISIS, Spolku pro vzdělání v oboru chemie a pomocných věd, v letech 1864–1873 (<i>P. Drašar</i>) | 238 |
| Předsedové Spolku českých chemiků 1872–1907 (<i>P. Drašar</i>) | 244 |
| Evropské chemické časopisy (<i>P. Drašar</i>) | 253 |
| Studium skleníkového jevu již před 200 roky (<i>Z. Slanina</i>) | 447 |
| Neumann Karel Augustin, první profesor chemie a chemické technologie na pražské polytechnice (<i>P. Drašar</i>) | 448 |
| Jediný předseda společnosti pro průmysl chemický v Království českém 1893–1907 (<i>P. Drašar</i>) | 451 |
| K historii objevu neviditelných paprsků X. Wilhelm Conrad Röntgen (1845–1923), Ivan Puluj (1845–1918) (<i>I. Kraus</i>) | 454 |
| Ohlédnutí za mezinárodním dnem žen a dívek ve vědě (<i>A. Týčová a M. Killinger</i>) | 460 |
| Předsedové organizací slovenských chemiků do konce 20. století (<i>P. Drašar a V. Milata</i>) | 641 |
| Bioplasty pohledem vysokoškoláků a vysokoškolaček (<i>M. Nová a P. Šmejkalová</i>) | 647 |
| | |
| Ze života chemických společností | 56, 256, 463, 656 |
| Odborná setkání | 58, 258, 466, 657 |
| Akce v ČR a v zahraničí | 60, 260, 467, 659 |
| Recenze | 60, 258, 468, 659 |
| Evropská koutek | 63, 261, 472 |
| Zákony, které ovlivní život chemiků | 65, 262, 474, 661 |
| Zprávy | 66, 263, 475, 662 |
| Aprílový klub | 476, 663 |
| Členská oznámení a služby | 75, 476 |
| Osobní zprávy | 76, 265, 478 |
| Výročí a jubilea | 82, 270, 482, 664 |

Czech Chemical Society Symposium Series

Ročník 21

| | |
|--|-----|
| 1. Historie organické chemie na PřFUK a Chemické listí | 1 |
| 2. XXII nd Interdisciplinary Meeting of Young Life Scientists, Milovy, 15. 5. – 18. 5. 2023 | 67 |
| 3. 4. konference Pokroky anorganické chemie – PAnCh 2023 ⁴ , Brno, 25. – 29. června 2023 | 123 |
| 4. XXXVII. Immunoanalýza Lubochňa 2023, 12. – 16. 6. 2023 | 163 |
| 5. NIVB Meeting 2023, Kutná Hora, Czech Republic, 2 nd – 5 th October, 2023 | 177 |
| 6. Cena Karla Štulíka, Ostrava, Ostravská univerzita 8. 2. 2023 | 257 |

Autorský rejstřík 117 (2023)**Author Index 117 (2023)**

(úv) úvodník, (ref) přehledný referát, (pmp) původní a metodické práce, (nt) nomenklatura a terminologie, (ch.p.) chemický průmysl, (rec) recenze, (os.zp.) osobní zprávy, (s) odborná setkání, (v.ch.) výuka chemie, (d) diskuse, (z) zprávy, (b) bulletin

- Airaksinen A.: (v.ch.) 708
Aubrecht J.: (ref) 191
- Bakandritsos A.: (ref) 619
Balažová A.: (ref) 147
Barek J.: (b) 63, 256, 463, 472, 473, (os.zp.) 478, (s) 59, 258, (úv) 719, 720
Barna M.: (pmp) 694
Bartošík M.: (ref) 595
Bělohav V.: (ref) 613
Bělohav Z.: (os.zp.) 265
Benešová E.: (rec) 61, 259, (ref) 319, 508
Benešová K.: (pmp) 516
Berka M.: (pmp) 701
Berková V.: (pmp) 701
Birošíková K.: (pmp) 17
Bittner S. Fialová: (ref) 147
Bittová M.: (os.zp.) 267
Bleha R.: (ref) 196
Bouř P.: (ref) 722
Bouřa E.: (ref) 755
Brychová V.: (ref) 94, 100
Burešová K.: (pmp) 573
- Cabalka J.: (ref) 547
Caltová K.: (ref) 196
Concia F.: (v.ch.) 708
Cvačka J.: (ref) 684, 747, (úv) 717
Cziferi B.: (ref) 114
- Čáková D.: (ref) 487
Čepová J.: (pmp) 573, 694
Černá S.: (pmp) 516
Černín A.: (pmp) 330
Čižmanec P.: (pmp) 701
Čížková H.: (pmp) 23
Čtrnáctová H.: (z) 71, (v.ch.) 522
- Daňo M.: (ref) 114
Das S.: (v.ch.) 708
Davidková M.: (pmp) 13
Davidová L.: (ref) 100
Dejmková V.: (z) 67
Dibuszová E.: (úv) 345
Distler P.: (v.ch.) 708, (z) 68
- Doležal M.: (rec) 471
Doležal P.: (pmp) 13
Drašar P.: (b) 43, 48, 238, 244, 253, 448, 451, 465, 466, 476, 641, 657, (nt) 581, (os.zp.) 81, 269, (pmp) 13, (rec) 469, 659, (ref) 278, 348, 495, 547, 671, (úv) 593, (z) 74
Dunovská K.: (pmp) 573, 694
Dvořák P.: (ref) 3
- Elster J.: (ref) 613
- Fenclová K.: (ref) 122, 128
Fiala J.: (úv) 277
Fíla V.: (ref) 196
Fišnar J.: (ref) 677
Florescu G.: (ref) 100
Foret F.: (pmp) 634
Fořtová M.: (pmp) 573
Frejlichová L.: (pmp) 701
Fulín P.: (ch.p.) 219
- Galajdová B.: (pmp) 373
Ganajová M.: (v.ch.) 522
Garba R.: (ref) 107
Grigová N.: (pmp) 433
- Hagarová I.: (ref) 138
Haluška D.: (ref) 539
Hanika J.: (rec) 660
Herink T.: (ch.p.) 219, 660
Holík Purkrtová Z.: (rec) 259, (v.ch.) 227
Holková I.: (ref) 147
Holý P.: (rec) 468, (úv) 189
Hosnedlová B.: (pmp) 573
Hraniček J.: (ref) 501
Hroboňová K.: (ref) 290, 365
Hronec M.: (os.zp.) 266
Hrouzek J.: (pmp) 433
Hrouzková S.: (pmp) 433
Hrubý M.: (pmp) 425
Hrušková H.: (pmp) 634
Hůnová I.: (ref) 325
- Husár Š.: (pmp) 17
- Chalupa R.: (b) 235, (ref) 419
Chomaničová K.: (pmp) 17
- Ivanko I.: (pmp) 425
- Janák D.: (pmp) 163
Jarolímková J.: (ref) 628
Jedličková B.: (pmp) 573
Jelenová N.: (ref) 487
Jelínková R.: (pmp) 155
Jirát J.: (úv) 345
Jirout T.: (ref) 613
John J.: (ref) 114, (v.ch.) 708
Jurášek M.: (ref) 278, 348, 495, 547, 671
- Kafka S.: (os.zp.) 267
Kalina J.: (v.ch.) 30
Kameník J.: (ref) 107
Kanický V.: (os.zp.) 267
Kardová D.: (z) 70
Kasal A.: (úv) 721
Kašička V.: (os.zp.) 79
Killinger M.: (b) 460, (pmp) 634
Kinčl J.: (pmp) 330
Kizek R.: (pmp) 573, 694, (rec) 659
Klapková E.: (pmp) 573, 694
Klečková M.: (v.ch.) 177
Kohout M.: (ref) 671
Kolská Z.: (ref) 628
Konefal R.: (pmp) 373
Košin P.: (rec) 62
Kotaška K.: (pmp) 573
Kozler J.: (nt) 581
Kratochvíl B.: (os.zp.) 265, 478, (ref) 214, 319, 671, (úv) 346
Kraus I.: (b) 454
Kredatusová J.: (pmp) 373
Křížek T.: (b) 473
Krupka J.: (ch.p.) 219
Kružík V.: (pmp) 23
Kubančák J.: (ref) 94
Kubička D.: (ref) 191
- Kubová K.: (ref) 604
Kučera J.: (ref) 107
Kučerík J.: (s) 658
Kuneš J.: (ref) 732
Kvíděrová J.: (ref) 613
- Labuda J.: (b) 63, (os.zp.) 78
Lach M.: (v.ch.) 30
Laštovičková M.: (pmp) 634
Lebl M.: (úv) 485
Lederer J.: (ch.p.) 219, (os.zp.) 266, (s) 466
Lhotka M.: (ref) 196
Liška A.: (os.zp.) 479
Liška J.: (ref) 613
Loužecká K.: (ref) 508
Lubal P.: (os.zp.) 267, 480
Lubojacký J.: (s) 466
Ludvík J.: (os.zp.) 78
Lyutakov O.: (ref) 539
- Macerata E.: (v.ch.) 708
Maletínská L.: (ref) 732
Malý L.: (pmp) 330
Marek I.: (ref) 196
Mariani M.: (v.ch.) 708
Maršík D.: (ref) 282
Martinič J.: (pmp) 516
Masák J.: (os.zp.) 479
Mašková E.: (ref) 604
Matysik F.-M.: (b) 473
Melich L.: (pmp) 573
Melicherčík P.: (pmp) 694
Mergová M.: (ref) 147
Mertlíková-Kaiserová H.: (ref) 739
Mika O. J.: (ref) 208
Milata V.: (b) 641, (os.zp.) 76, 269
Mindová M.: (ref) 114
Mizera J.: (ref) 501
Mlčoch A.: (ch.p.) 170
Modrianský M.: (os.zp.) 268
Moráňová L.: (ref) 595
Moravcová I.: (pmp) 155
Mossini E.: (v.ch.) 708
Mostecký J. ml.: (os.zp.) 266
Mučaji P.: (ref) 147

- Navrátil T.: (s) 466, (úv) 669
 Navrátilová Radinová E.: (ref) 604
 Nedbalová L.: (ref) 613
 Negrin M.: (v.ch.) 708
 Nemček L.: (ref) 138
 Němec M.: (ref) 86, 114, 122, 128, (úv) 85, (v.ch.) 708
 Nesměrák K.: (b) 235, (ref) 419, (s) 657
 Nová M.: (b) 647
 Novák L.: (ch.p.) 170
 Nováková K.: (ref) 595
- Obložinský M.: (ref) 147
 Opletal L.: (ref) 495
 Otyepka M.: (ref) 619
- Pačesová A.: (ref) 732
 Pachnerová Brabcová K.: (ref) 94, 100
 Paidar M.: (pmp) 330
 Paleta O.: (nt) 581
 Pašek J.: (ch.p.) 219
 Pavlovec L.: (pmp) 373
 Pejšková L.: (ref) 508
 Petrová M.: (ref) 94, 100
 Petrus J.: (pmp) 694
 Petrželová K.: (v.ch.) 177
 Pócssová T.: (pmp) 433
 Podešva J.: (rec) 60, (úv) 137
 Podhajský J.: (pmp) 573
 Podskalská T.: (pmp) 23
- Podzimek T.: (ref) 508
 Polívka P.: (ch.p.) 585
 Pospíšil M.: (rec) 258
 Potančoková J.: (pmp) 23
 Pottgießer V.: (v.ch.) 708
 Povinec Pavel P.: (ref) 107
 Prášek T.: (ref) 122, 128
 Princ I.: (rec) 260
 Procházka V.: (ref) 501
 Průša R.: (pmp) 573, 694
 Purkrtová S.: (ref) 358
- Rajsiglová I.: (v.ch.) 384
 Réblová Z.: (ref) 677
 Retegan T.: (v.ch.) 708
 Rotaru A.: (s) 658
 Ruml T.: (úv) 393
 Rumlová M.: (úv) 393
 Rychlý O.: (pmp) 573
- Říhová Ambrožová J.: (pmp) 163
 Říhová K.: (pmp) 23
- Sabolová M.: (ref) 677
 Sadílková K.: (v.ch.) 177
 Shamzhy M.: (ref) 407
 Slanina Z.: (b) 447
 Smrček S.: (os.zp.) 77
 Smrčková P.: (ref) 196
 Smutná V.: (pmp) 23
 Sotáková I.: (v.ch.) 522
 Souček I.: (os.zp.) 481
 Srsenová L.: (s) 466
 Stárek J.: (pmp) 330
- Strmisková J.: (ref) 595
 Strnad Š.: (ref) 684, 747
 Strnadová V.: (ref) 732
 Suchara I.: (ref) 501
 Sucharová J.: (ref) 501
 Světlík I.: (ref) 94, 100
 Sýkora V.: (pmp) 330
 Sýkorová M.: (pmp) 17
 Szarka A.: (pmp) 433
- Šarboch D.: (v.ch.) 384
 Šárka E.: (ref) 196
 Šedajová V.: (ref) 619
 Šiler P.: (s) 658
 Šilhan M.: (ch.p.) 170, 585
 Škorpilová T.: (pmp) 23
 Šmejkal P.: (úv) 537
 Šmejkalová P.: (b) 647
 Šolcová M.: (ref) 358
 Špačková A.: (ref) 290
 Špáňík I.: (os.zp.) 78
 Šrámek M.: (v.ch.) 438
 Štěpánková L.: (pmp) 701
 Štěpánková O.: (pmp) 573
 Štrok M.: (v.ch.) 708
 Šulcová P.: (b) 57
 Šustová K.: (ref) 301
 Švec F.: (ref) 308, 395, 671
 Švorc L.: (os.zp.) 78, (s) 59
 Švorčík V.: (ref) 539
- Teplá M.: (v.ch.) 384, 438, 708
 Thinová L.: (ref) 501
 Tomšík E.: (pmp) 425
- Trhlíková O.: (pmp) 373
 Třísková I.: (ref) 551
 Trnka T.: (os.zp.) 81
 Trnková L.: (ref) 551
 Týčová A.: (b) 460
- Vacek J.: (d) 37
 Valášek V.: (ref) 94
 Viglašová E.: (ref) 114
 Viktorová J.: (ref) 487
 Vladovičová B.: (pmp) 17
 Vobecká E.: (pmp) 163
 Vopařilová P.: (s) 58
 Voráčová I.: (pmp) 634
 Vovesný P.: (pmp) 13
 Vrkoslav V.: (ref) 684, 747
 Výbohová V.: (ref) 365
 Vyskočil V.: (ref) 3, (úv) 1
 Vysloužil J.: (ref) 604
 Vysloužilová L.: (pmp) 573
- Walther C.: (v.ch.) 708
 Werle J.: (pmp) 573
- Zemanová J.: (ref) 301
 Zlámal M.: (pmp) 330
 Zuzáková J.: (pmp) 163
 Zwaan Z.: (pmp) 330
- Železná B.: (ref) 732
 Žitka J.: (pmp) 373
 Žuja P.: (pmp) 155

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC 117, 1 – 776 (2023)

Vedoucí redaktor

Editor-in-Chief

V. VYSKOČIL

Redakční kruh

Editorial Board

J. BAREK, E. BENEŠOVÁ, P. DRAŠAR, P. HOLÝ, P. CHUCHVALEC, M. JURÁŠEK, Z. KOLSKÁ,
B. KRATOCHVÍL, J. MASÁK, J. PODEŠVA, P. ŠMEJKAL

Zahraniční a oblastní redaktori

Foreign and Regional Editors

F. ŠVEC (USA, ČR)

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. MELZUCH, V. PAČES, M. POSPÍŠIL,
V. RŮŽIČKA, P. SLAVÍČEK, I. STIBOR, J. ZIMA, T. ZIMA

Technická redaktorka

Editorial Assistant

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 117 (2023)

Volume 117 (2023)

Listy chemické, ročník 147 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 133

Str. 1 – 776

ISSN 0009-2770



DESIGNOVÉ PRODUKTY S VĚDECKOU DUŠÍ



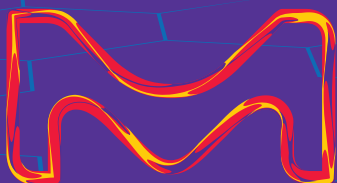
MERCK

discovery at your fingertips

Go beyond the literature with an AI-driven platform and accelerate synthesis design with SYNTHIA™ Retrosynthesis Software.

Experience SYNTHIA™ Retrosynthesis Software with a free individual trial.

Lite.SynthiaOnline.com



The Life Science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials