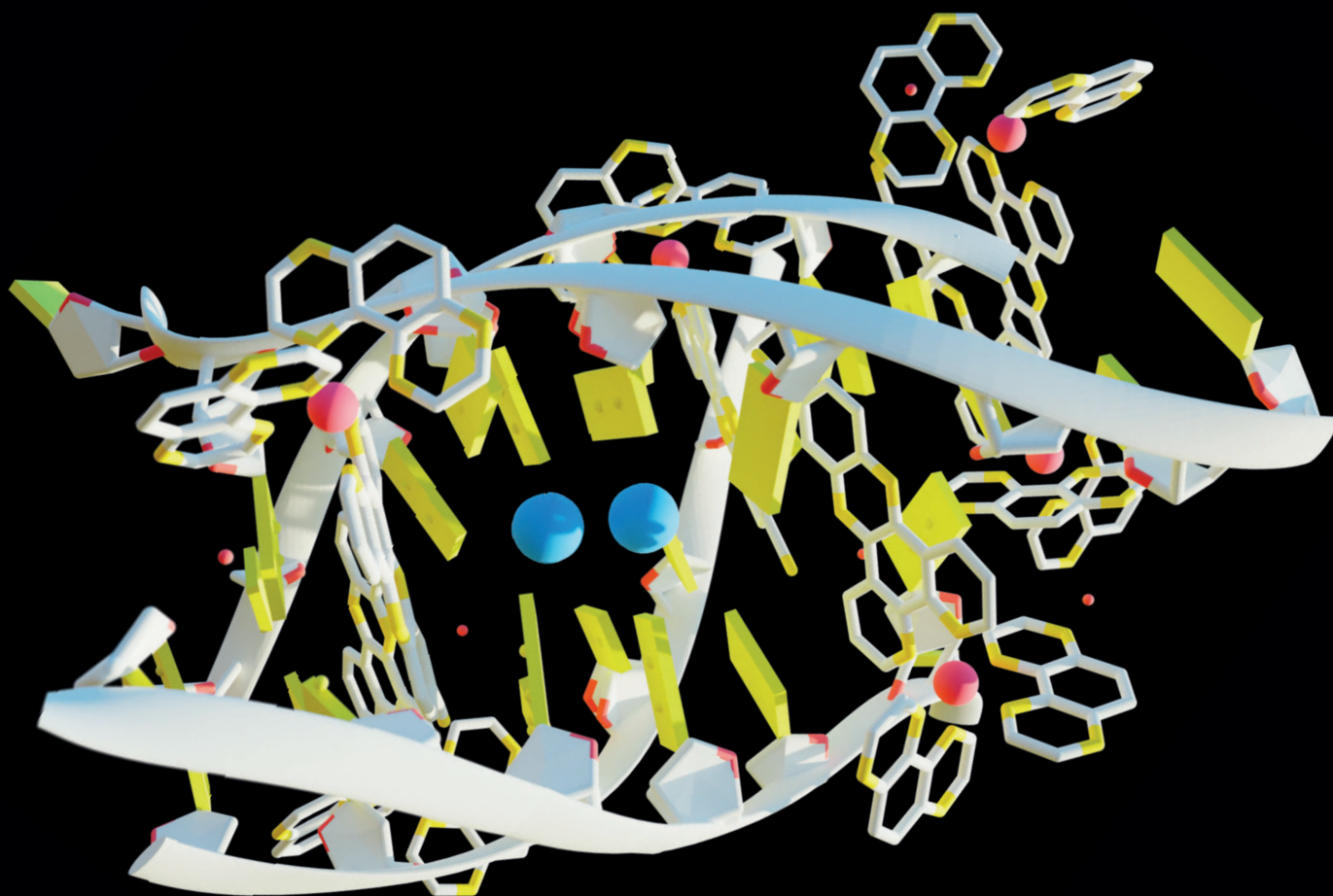


# Chemické Listy

# 6

ročník • 118



Perfluoralkylové látky

Nukleosidová chemie v ÚOCHB

Sledování krystalizačního procesu

Chemické výpočty na středních školách



# Chemistry Europe Fact Sheet

**16** chemical societies, **15** European countries,  
over **75,000** chemists.

Family of high-quality scholarly chemistry journals,  
covering a very broad range of disciplines.

Journals:  
[www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)

Societies:  
[www.chemistryviews.org/  
chemistry-europe-member-societies/](http://www.chemistryviews.org/chemistry-europe-member-societies/)

Evaluate, publish, disseminate, and amplify the  
scientific excellence of chemistry researchers  
from around the globe in high-quality publications.

Supports its members at every stage of their careers  
as they strive to solve the challenges that impact  
humankind.

Values integrity, openness, diversity, cooperation,  
and freedom of thought.

Hub: [www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)

Association

Mission

*ChemistryViews*

3 per year, free

Newsletter



**Chemistry  
Europe**

Science  
news  
magazine

What is happening in  
the global chemistry  
community

Strong focus on the people  
behind the science.

[www.chemistryviews.org/register/](http://www.chemistryviews.org/register/)

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

Fellows  
Program

Award

Recognizes members for their outstanding  
achievements and contributions and their  
service to at least one member society.

[www.chemistryviews.org/fellows/](http://www.chemistryviews.org/fellows/)

Recognizes outstanding contributions to chemistry.

Includes prize money of EUR 10,000  
and a certificate

Open to individuals worldwide, regardless of  
their affiliation with *Chemistry Europe* societies.

[www.chemistryviews.org/chemistryeuropeaward/](http://www.chemistryviews.org/chemistryeuropeaward/)



@ChemEurope

Hub:

[www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)



[linkedin.com/company/  
chemurope/](https://www.linkedin.com/company/chemurope/)

## Devět Skal po tříadvacáté

Ve dnech 20.–23. 5. 2024 se pod záštitou Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (resp. IOCB Tech s.r.o.), České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a České společnosti chemické konal již 23. ročník konference pro mladé vědce z různých oborů přírodních věd Interdisciplinary Meeting of Young Life Scientists (<http://www.interdisciplinarymeeting.cz/>).

Stejně jako v minulých letech i letos byl zájem o tuto konferenci veliký a odborná komise měla nelehkou práci při výběru vítězných 40 přednášek a 30 posterů. Během konference zazněla řada zajímavých přednášek jak z oboru biochemie a molekulární biologie, tak organické chemie, analytické chemie a materiální chemie. Třešničkou na dortu byla plenární přednáška s všeříkajícím názvem **MY LOVE AFFAIR: MONOLITHS**, kterou přednesl prof. František Švec, mimo jiné držitel ceny Neuron za rok 2023 a autor více než 530 vědeckých publikací včetně knih a 75 patentů. Ostatně o kvalitě výzkumu prezentujících účastníků se čtenáři mohou sami přesvědčit při pohledu do sborníku abstraktů zveřejněného v Czech Chemical Society Symposium Series (první číslo roku 2024, <http://www.ccsss.cz/index.php/ccsss/issue/view/43/77>).

Jako hlavní sponzor konference vystupovala, stejně jako již od jejích počátků, firma Merck Life Science spol. s.r.o. ([www.sigmaaldrich.cz](http://www.sigmaaldrich.cz)). Její zástupce Mgr. Stanislav Kukla přednesl v dnešní době více než aktuální příspěvek na téma **GREENING THE LAB: SCIENCE IN THE AGE OF SUSTAINABILITY**. V tomto roce se však připojili i sponzoři další, a to včetně asociace Chemistry Europe sdružující chemické společnosti napříč Evropou a spravující řadu odborných periodik.

Za dobu své existence si konference Interdisciplinary Meeting of Young Life Scientists prošla celou řadou změn. Konala se na různých místech, přestála i kovidové období. V letošním roce ji však čekala výzva největší. Poprvé se jí nezúčastnili její zakladatelé, prof. Martin Fusek



a prof. Pavel Drašar a předali pomyslné žezlo svým nástupcům v čele s Ing. Ondřejem Baszczyńskim, Ph.D. Doufejme, že alespoň z dálky dění na Devíti Skalách pozorovali a nebyli zklamáni. Hlavní myšlenka totiž jistě zůstala zachována. Konference umožnila setkání úspěšných mladých vědců ze všech koutů země, rozšíření jejich vědeckých obzorů a navázání kontaktů, bez kterých se žádný úspěšný vědec neobejde. Doufejme, že v tomto duchu bude konference pokračovat minimálně dalších 23 let.

Eva Benešová



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.

## PERFLUORALKYLOVÉ LÁTKY – PŘEHLED JEJICH VÝSKYTU, DOPADŮ NA ZDRAVÍ A METOD DETEKCE

KAROLINA KUKRÁLOVÁ, ELENA MILIUTINA, OLEKSIY LYUTAKOV a VÁCLAV ŠVORČÍK

Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha, Česká republika  
kukraloa@vscht.cz

Došlo 22.2.24, přijato 28.3.24.

Na perfluoralkylové látky (PFAS) je v posledních letech soustředěna pozornost širší veřejnosti, protože to jsou látky znečišťující životní prostředí. Jsou to např. kyselina perfluoroktanová a perfluoroktansulfonová. Tyto látky vznikají průmyslovou aktivitou člověka především při výrobě polymerů nebo nepřílnavých povrchů. Odpadní vodou nebo i jinými cestami se mohou dostat do prostředí, a tak kontaminovat zdroje pitné vody nebo potravin. Jejich působení na organismy a lidské zdraví je rozsáhle studováno a jejich přítomnosti v organismu je připisován vliv na mnohé zdravotní komplikace, dokonce i některé druhy rakoviny. Z toho důvodu byly stanoveny přípustné limity PFAS v pitné vodě a jejich regulací se zabývají mnohé státní orgány a mezinárodní organizace. Aktuálním standardem v detekci PFAS jsou chromatografické metody. V současnosti jsou zkoumány i nové metody detekce především optickou a elektrochemickou cestou. Jejich příklady jsou v textu detailněji popsány a diskutovány.

**Klíčová slova:** perfluoralkylové látky (PFAS), jejich výskyt, dopady na zdraví člověka, jejich detekce

### Obsah

1. Úvod
2. Kde se s PFAS můžeme setkat a jak vznikají
3. Ekologická situace ve světě
4. Jak se PFAS dostávají do organismu a co v něm mohou způsobit
5. Regulace úřady
6. Metody detekce PFAS
  - 6.1. Optická detekce
  - 6.2. Elektrochemická detekce
7. Problémy při detekci PFAS
8. Závěr

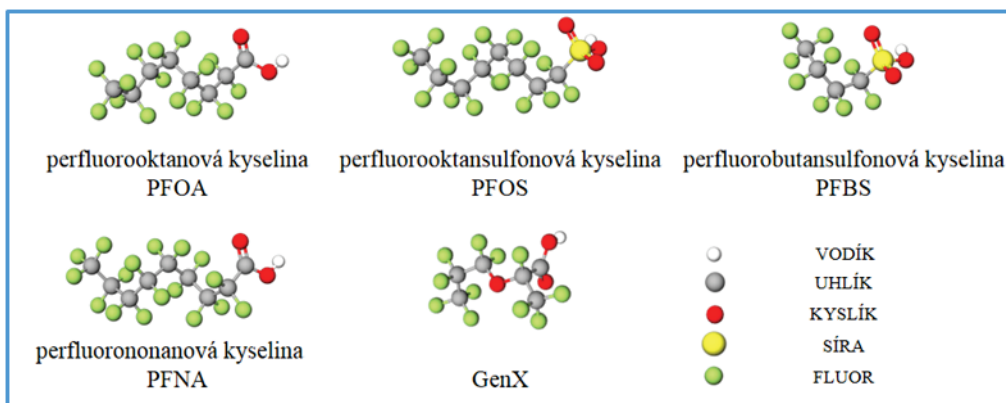
### 1. Úvod

Perfluorované a polyfluoralkylové látky (PFAS) se dostaly do zájmu veřejnosti, protože se běžně používaly v průmyslu k povlakování materiálů pro zlepšení jejich povrchových vlastností, např. odolnost proti ohřevu, mechanickému namáhání, vodě a dalším provozním faktorům<sup>1</sup>. Do této rozsáhlé skupiny řadíme okolo 5000 látek, jakými jsou např. kyselina perfluoroktansulfonová (PFOS), kyselina perfluoroktanová (PFOA), kyselina perfluorononánová (PFNA), perfluorbutansulfonová kyselina (PFBS) nebo perfluor(2-methyl-3-oxahexanoát)amonný (HFPO-DA nebo GenX) a mnoho dalších (obr. 1)<sup>2</sup>.

Nejznámějším příkladem ze skupiny PFOS je kyselina oktansulfonová, u které bylo všech 17 atomů vodíku navázaných na jednotlivých atomech uhlíku v řetězci nahrazeno atomy fluoru. Tato látka byla dříve zvažována jako lék, který je schopný snižovat hladinu tuků, např. cholesterolu v krvi (tzv. hypolipidemika). Nyní je mnohem známější jako významný organický kontaminant životního prostředí<sup>3</sup>. Není to přírodní látka. PFOS vzniká jen kvůli činnosti člověka. Jeho první významné použití bylo zaznamenáno při výrobě impregnací na textil a kůži chránící materiál před vznikem skvrn. Za normálních podmínek je to stabilní naředivělá kapalina<sup>4</sup>.

Druhý významný zástupce, PFOA, je organická kyselina, za normálních podmínek bílá, krystalická pevná látka<sup>5</sup>. Je také známým kontaminantem životního prostředí a zároveň se uvádí jako karcinogenní látka a endokrinní disruptor<sup>6</sup>. Vzniká v průmyslu jako jeden z vedlejších produktů především při výrobě fluoropolymerů<sup>1</sup>.

PFOS i PFOA díky silným vazbám mezi uhlíkem a fluorem dobře odolávají rozkladu, zůstávají dlouhou dobu v životním prostředí, a tudíž se dají označit jako biopersistentní<sup>7</sup>. Látky ze skupiny PFAS byly dokonce označeny jako nejdéle přetrvávající člověkem vyrobené látky v životním prostředí vůbec. PFAS jsou obecně dobře rozpustné ve vodě, a proto v nezměněné podobě zůstávají v prostředí, kde se mohou přenášet na dlouhé vzdálenosti od svého zdroje uvolněním do prostředí<sup>8</sup>.



Obr. 1. Významní zástupci chemikálií ze skupiny PFAS. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

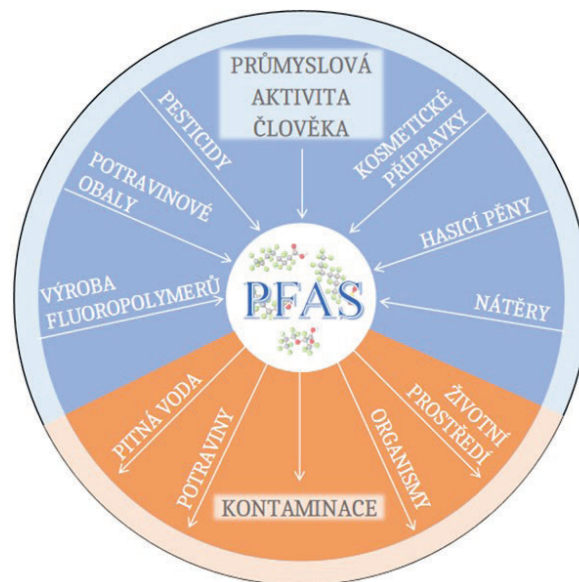
## 2. Kde se s PFAS můžeme setkat a jak vznikají

Průmyslová odvětví využívající PFAS zasahují do téměř všech sfér našeho života. Jedná se o automobilový průmysl, výrobu spotřebního zboží pro domácnost a materiálů přicházejících do styku s potravinami; textil, kůži, oděvy, koberce a čalounění; kosmetiku; stavebnictví; elektroniku a izolátory; letectví a obranu; chemický, těžební a ropný průmysl; hasicí prostředky i lékařské přípravky<sup>9</sup>. Příklady jejich použití jsou uvedeny na obr. 2. Historicky se jako první používaly PFAS s dlouhými alkylovými řetězci. S novými vědeckými objevy ukazujícími na jejich nebezpečnost byly nahrazovány alternativními látkami s krátkými řetězci. To se však ukázalo jako liché řešení, protože i tyto látky mají vlastnosti, které vzbuzují obavy o možném ohrožení lidského zdraví<sup>8</sup>.

PFOA, případně její soli, hrají zásadní roli jako pomocné prostředky při produkci fluorovaných polymerů a také je nalezneme v procesech syntézy fluorakrylových esterů. Asi nejznámějším produktem, na jehož výrobě se PFOA podílí, je teflon. Během jeho výroby však dochází k vyhoření většiny PFOA (cit.<sup>5</sup>). Proto se fluoropolymerní materiály pro styk s potravinami „nezdají“ být významným zdrojem PFOA. Bylo zjištěno, že z výroby odcházejí jen s velmi nízkou koncentrací, která minimálně migruje do vody nebo oleje při vaření. Navíc při běžném používání teflonového nádobí nebyla prokázána generace žádného dalšího množství PFOA. Vzhledem k tomuto by se množství PFOA mělo blížit nule při opakovaném použití nádobí s tímto povlakem<sup>10</sup>. Teflon se nezdá být významným zdrojem PFAS, který by se dostal do lidského organismu, ale potenciální hrozbou může být uvolňování mikro- nebo nanočástic z teflonového povlaku<sup>11</sup>.

Mezi další výrobky, které používají při výrobě PFAS k dosažení nepřilnavého nebo skvrnám odolného povrchu, patří potravinové obaly<sup>12</sup>. Takovými jsou např. sáčky na popcorn, které mohou mít na vnitřní straně polymerní povlak s relativně vysokým obsahem perfluoroktyletha-

nolu ( $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ). Ten po zahřátí degraduje a uvolňuje PFOA, která je schopna migrovat do připravovaného pokrmu, a tím se dostat do lidského těla<sup>13</sup>. V sáčcích, které obsahují 3–4 mg  $\text{kg}^{-1}$  perfluoroktylethanolu, je pak uvolněné množství PFOA o stovky % vyšší než u teflonového nádobí<sup>10</sup>. Je však nutné dodat, že ne u každého popcornového sáčku perfluoroktylethanol najdeme. Jsou tu i další plastové obaly na potraviny, které obsahují PFAS. Jsou jimi např. obaly z restaurací rychlého občerstvení a krabice na pizzu, které také vděčí PFAS za svoji nepřilnavost a odolnost. V roce 2017 byly PFAS nalezeny v 56 % dezertních ubrousků, 38 % obalů na hamburgery a 20 % lepenkových „fastfoodových“ obalů v USA (cit.<sup>14</sup>).



Obr. 2. Příklady použití PFAS v průmyslu. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

Stravování v rychlém občerstvení se proto připisuje i významně zvýšená koncentrace PFOA v krvi obézních lidí<sup>2</sup>.

Jak bylo zmíněno výše, PFOA se do prostředí dostává hlavně díky průmyslové činnosti. To podporuje i skutečnost, že se její zvýšená hladina v krvi objevuje především u lidí s vyšším vzděláním a socioekonomickým statusem. Připisuje se to faktu, že mají možnost nakupovat vysoce kvalitní spotřebitelské produkty, které mohou obsahovat více PFAS (cit.<sup>2</sup>).

### 3. Ekologická situace ve světě

Kontaminace prostředí PFAS má za následek vážné ekologické zatížení, protože to jsou látky biopersistentní povahy. Čištění míst kontaminovaných PFAS je značně technicky i finančně náročné, a tudíž povětšinou zůstávají v prostředí<sup>8</sup>. Průmyslové využití PFAS mělo za následek hlavně jejich detekovatelnou přítomnost v životním prostředí zahrnující vzduch, půdu, prach, ledové plochy i vodní zdroje (řeky, oceány, jezera, podzemní vody) po celém světě včetně České republiky<sup>15–18</sup>. Hlavními lokalitami znečištění jsou především průmyslové oblasti jako např. americká řeka Tennessee, která se nachází v blízkosti významné továrny vyrábějící fluorované látky. PFOA a PFAS byly nalezeny také v pitné vodě kolem průmyslových oblastí v Německu, USA, Ghaně, Turecku, Austrálii nebo Číně, dále např. v dešťové vodě v centrech kanadských měst, v pobřežních vodách jižního Japonska a Koreji a mnoha dalších místech. Nejvyšší hodnoty znečištění životního prostředí PFOA, PFOS a PFHS pak byly zaznamenány po použití většího množství požárních pěn k uhašení požáru ropného skladiště v Japonsku způsobeného zemětřesením roku 2011 (cit.<sup>19,20</sup>).

Takto rozsáhlá kontaminace životního prostředí díky PFAS má za následek její detekovatelnou přítomnost v mnoha organismech včetně lidí a zvířat po celém světě. Vysoké koncentrace PFOS byly zaznamenány v tkáních a orgánech i mořských zvířat<sup>21</sup>. Konkrétně PFOS byla látka, která byla v dosavadních výzkumech nalezena ve všech analyzovaných druzích, tkáních i lokalitách. Vysoké hodnoty PFOS obsahují např. krevety a mušle z moří kolem Severní Ameriky. Rekord množství PFOS i PFOA drží jeden druh mořské ryby z Cartagenského zálivu v Kolumbii, v jehož žluči se našlo 3673 ng g<sup>-1</sup> PFOS a 370 ng g<sup>-1</sup> PFOA. To jsou několika řádově vyšší hodnoty než u jiných zvířat, kde se zaznamenané hodnoty pohybují v řádech jednotek nebo dokonce desetin ng g<sup>-1</sup>. Vystavení PFAS se nevyhnou ani ptáci a savci. Vysoká hodnota PFOS byla nalezena v orgánech a vajíčkách amerických i asijských volavek nebo třeba švédských alkounů. Vysoké koncentrace byly také zaznamenány u tuleňů žijících v oblasti německých přístavů, kde byly zaznamenány v různých orgánech: v játrech, ledvinách, plicích, srdci, mozku, krvi, svalech a dalších<sup>21</sup>.

### 4. Jak se PFAS dostávají do organismu a co v něm mohou způsobit

Do lidského těla se stejně jako do zvířat PFAS mohou dostat především kontaminací pitné vody nebo potravin<sup>22</sup>. Podle výzkumů se v lidském organismu nacházejí nejčastěji PFOS, PFOA a PFHS (cit.<sup>20</sup>), které se v těle akumulují a mohou být zdraví nebezpečné. Podporuje to skutečnost, že v lidském těle mohou zůstat až několik let, protože je tělo nezdolává dostatečně vylučovat žádným běžným způsobem. Poločas rozpadu PFOA v lidském těle byl vypočten na 2,4 roky a v životním prostředí se odhaduje minimálně na 10–15 let (cit.<sup>23,24</sup>).

PFAS jsou látky, které se začaly používat relativně nedávno a jejich historie sahá jen do poloviny minulého století. Nejdříve byly považovány za biologicky neaktivní a nebyla jim věnována velká pozornost z toxikologického hlediska<sup>20</sup>. Později však bylo zjištěno, že působení PFOA, která je jednou z negenotoxických chemikálií, se v organismu zaměřuje především na játra a má za následek vyšší úmrtnost jaterních buněk. Vystavení organismu PFAS souvisí i s mnohými dalšími nepříznivými a toxickými účinky na imunologickou odpověď člověka (např. její zásadní snížení nebo narušení protilátkové odpovědi po očkování) a jeho endokrinní systém. V hormonálním systému ovlivňuje především štítnou žlázu a pohlavní hormony, kdy dochází ke snížení jejich produkce. U mužů dochází i k nesprávným funkcím spermatogeneze a u těhotných žen má zvýšená hladina PFAS v těle za následek nižší porodní hmotnost dítěte kvůli nedostatečné dostupnosti glukosy pro plod<sup>2</sup>.

Celkově se PFAS připisují mimo jiné imunotoxicita, neurotoxicita, vývojová toxicita a hepatotoxicita, přičemž základní mechanismy jejich působení jsou rozsáhle studovány<sup>2</sup>. Jejich přítomnost v lidském těle je pak konkrétně spojována i s některými dalšími zdravotními problémy, jako je zvýšení hladiny cholesterolu, nemoci štítné žlázy nebo rakovina ledvin a varlat<sup>15,25</sup>. U nenarozených dětí matek s vyšší hodnotou PFOA se pak mluví o vyšším riziku mozkové obrny<sup>2</sup>. Grafické shrnutí efektů PFAS v lidském těle je uvedeno na obr. 3.

Distribuce polyfluoralkylových sloučenin v těle závisí na konkrétní sloučenině a podávané dávce. Většinou jsou detekovány v játrech<sup>21</sup>, krevním séru<sup>26</sup> a ledvinách, v menším množství i v plicích a mozku<sup>27,28</sup>. PFOA je proteinofilní, ale má tendenci být distribuována spíše v tkáních s vysokým obsahem bílkovin než v tucích. Např. byla detekována i v mateřském mléku<sup>29</sup>. Ve všech těchto místech se PFAS hromadí, a tudíž jejich hladina významně roste s rostoucím věkem u mužů i žen, přičemž u mužů jsou hladiny výrazně vyšší<sup>30</sup>. To může souviset i se způsobem, jakým se tělo látky zbavuje. PFAS se u lidí vylučuje převážně stolicí, avšak menší množství je vylučováno i močí<sup>2</sup>. Vyšší hladina u mužů ukazuje i na fakt, že s pravidelnou ztrátou menstruační krve odchází i PFAS z ženského organismu<sup>31</sup>.

Jako hlavní cesta, kterou se PFAS dostávají do těla, byla označena pitná voda a následně potraviny, ale mohou



Obr. 3. Výskyt PFAS a jejich efekty v lidském organismu

být potenciálně absorbovány i vdechnutím nebo „přes“ kůži<sup>2</sup>. Odhaduje se, že člověk, který používá pitnou vodu s obsahem PFOA menším než 350 ng l<sup>-1</sup>, by neměl být v ohrožení vlastního zdraví<sup>15</sup>. Potraviny mohou být kontaminované během jejich produkce nebo přenosem z potravinových obalů<sup>22</sup>. Dalšími potenciálními zdroji byly označeny i ryby, mořské plody, maso a masné výrobky, vejce, mléko a mléčné výrobky, kam se PFAS dostávají díky pitné vodě a potravě lovených a zemědělských zvířat<sup>8</sup>.

## 5. Regulace úřady

Toxicita PFAS byla podrobena rozsáhlému zkoumání. Některé mezinárodní instituce zakázaly použití určitých polyfluoralkylových látek v průmyslu a zároveň stanovily přípustné limity množství PFAS v pitné vodě.

Díky výše popsaným efektům na lidské zdraví byla PFOA, její soli a jí příbuzné sloučeniny Evropskou unií zakázány podle nařízení o perzistentních organických polutantech od 4. července 2020 v rámci Stockholmské úmluvy.

V Evropské unii byl stanoven limit 0,5 µg l<sup>-1</sup> pro všechny PFAS v pitné vodě, platný dle směrnice z 12. ledna 2021 (cit.<sup>8</sup>). Řada rozvojových států žádnou regulaci doposud nezavedla a PFAS mohou nadále kontaminovat životní prostředí na jiných částech planety. O významu a neblahých důsledcích těchto kontaminantů se zmiňují i přední mezinárodní organizace, jako je Evropská chemická agentura (ECHA), světová zdravotnická organizace (WHO) nebo příslušné orgány jednotlivých států. V nařízeních platných pro EU ECHA uvádí chemické látky, kterým bylo uděleno „Omezení výroby, uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek, směsí a výrobků“. Na seznamu z roku 2009 se mimo známé nebezpečné látky, jako jsou sloučeniny olova, rtuti nebo mědi, nachází i PFOS s dodatkem, že jakmile se objeví možnosti používání bezpečnějších alternativ, bude PFOS zakázáno úplně<sup>32</sup>. Od roku 2023 jsou PFAS zakázány pro použití v hasicích pěnách a s novým rozhodnutím Evropské komise přibyly i PFCA (perfluorované karboxylové kyseliny C<sub>9-14</sub>). Další látky ze skupiny: GenX (látka sloužící jako náhrada za PFOA), PFBS (náhrada za PFOS), PFHpA a jejich soli jsou pod drobnohledem jakožto látky „vzbuzující velmi velké obavy“ kvůli jejich odolnosti, toxicitě a dalším potenciálním hrozbám<sup>8</sup>.

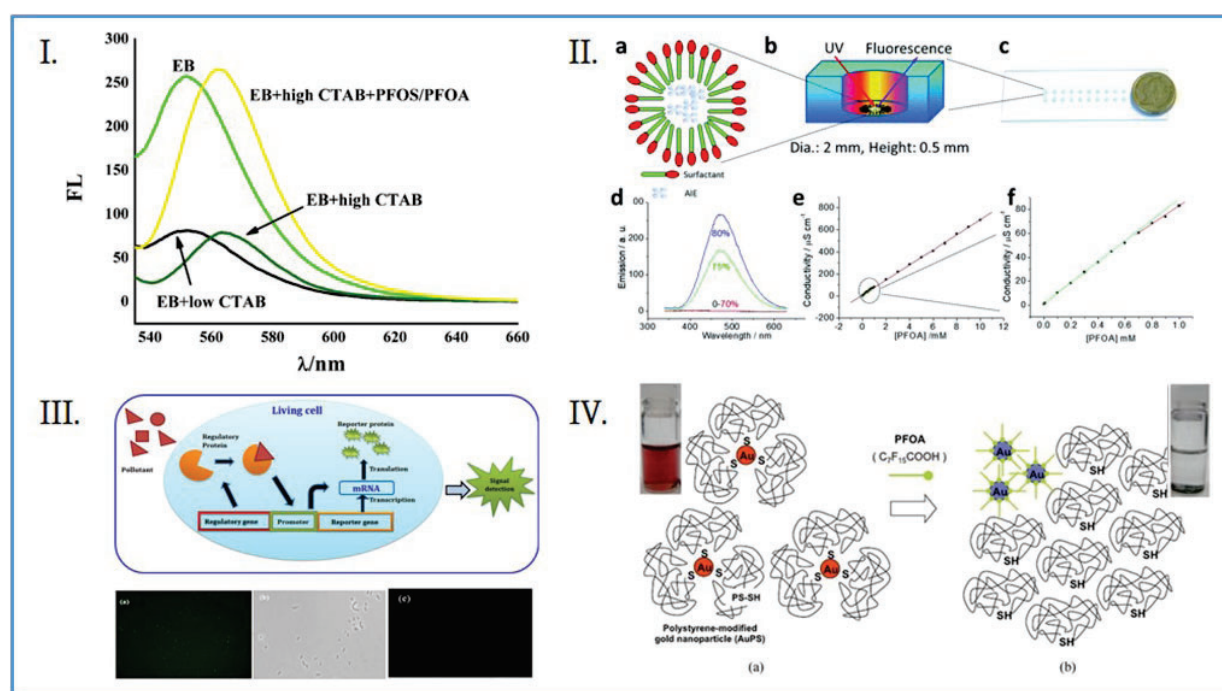
## 6. Metody detekce PFAS

Se vzrůstajícím povědomím o hrozbách PFAS pro lidské zdraví se objevila nová potřeba detekce PFAS ve vodě a případně i potravinách, aby se omezilo jejich působení na naše zdraví. Pro detekci PFAS nejen ve vodě se v analytických laboratořích pro komerční využití standardně používají chromatografické metody společně s hmotnostní spektrometrií – např. plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a vysoko účinná kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie<sup>33</sup>. Tyto metody jsou schopné měření s relativně nízkými detekčními limity. Na druhou stranu jsou to metody, které je možné provádět pouze v laboratoři na drahých a nepřenosných přístrojích. Proto je aktuální snaha o jednodušší možnosti detekce na místě a v reálném čase, levněji, s akceptovatelnou reprodukovatelností a přípustným detekčním limitem. Nejčastější směry výzkumů směřují optickou nebo elektrochemickou cestou. Detekční limity diskutovaných metod se pohybují v řádech jednotek až tisíců  $\text{ng l}^{-1}$  (cit.<sup>33</sup>).

### 6.1. Optická detekce

Optické senzory fungují na principu kombinace převodníku a rozpoznávacího prvku<sup>34–37</sup>. Tím může být enzym, protilátka, nebo modifikovaný povrch<sup>38,39</sup>, který díky interakci s požadovaným analytem, tj. PFAS, zaznamená detekovatelnou změnu jednou z optických metod. Před a po interakci se měří změny fluorescence, absorbance, Ramanova rozptylu nebo indexu lomu, které jsou díky převodu na elektrický signál kvantifikovány<sup>33</sup>.

Fluorescenční metody jsou běžně používané díky přípustné citlivosti, jednoduchosti a variabilitě. Reakce analytu s fluorescenčním prvkem vede buď ke zhasnutí nebo k vybuzení fluorescenční emise<sup>33</sup>. V práci<sup>40</sup> byla přítomnost PFOS a PFOA ve vodě detekována pomocí kombinace fluorescenčního prvku Erythrosinu B se zhasněčem – hydrátem chloridu berberinu. Intenzita fluorescenční emise lineárně vzrůstala se vzrůstající koncentrací PFOS nebo PFOA ve vzorku (obr. 4 I). V dalším výzkumu byla PFOA detekována díky tomu, že působí jako povrchově aktivní látka. Lipofilní molekuly AIEgen, které rozptýlené v rozpouštědle nevykazují fluorescenční emisi, v přítomnosti PFAS tvořily agregáty a způsobily emisi (obr. 4 II). Byl detekován silný luminiscenční signál<sup>41</sup>.



Obr. 4. **Optická cesta detekce PFAS:** I. detekce PFAS ve vodném roztoku na základě „off-on“ systému erythrosin B (EB)-hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB)<sup>40</sup>; II. (a) schéma AIE-micely, (b) AIE-micela na dně otvoru pro čip, (c) fotofotografie čipu, (d) PL spektra AIE v přítomnosti PFOA v závislosti na množství vody ve směsi s acetonem s 10 mM PFOA a 10  $\mu\text{M}$  TPE, (e) vodivost roztoku v závislosti na koncentraci PFOA, (f) přiblížená oblast v rozsahu nízké koncentrace<sup>41</sup>; III. Schéma metody detekce PFOA a PFOS ve vzorcích vody pomocí geneticky upraveného bakteriálního biosenzoru a snímky z (a) fluorescentního a (b) optického mikroskopu buněk obsahujících PFOA a (c) kontrolní snímek bez PFOA z fluorescentního mikroskopu<sup>42</sup>; IV. Schéma detekce PFOA pomocí modifikovaných AuNP (AuPS): (a) AuPS s polystyrenovými skupinami jsou stabilně dispergovány a (b) AuNP bez polystyrenových skupin jsou agregovány<sup>43</sup>. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)



Jinou možností nabízejí biosenzory. Pro detekci PFOS a PFOA ve vodě byla např. použita geneticky modifikovaná bakterie. Díky vložení dvou specifických genů do bakteriálního genomu začala bakterie produkovat zelený fluorescenční protein při zjištění přítomnosti hledaných látek ve vodě (obr. 4 III)<sup>42</sup>.

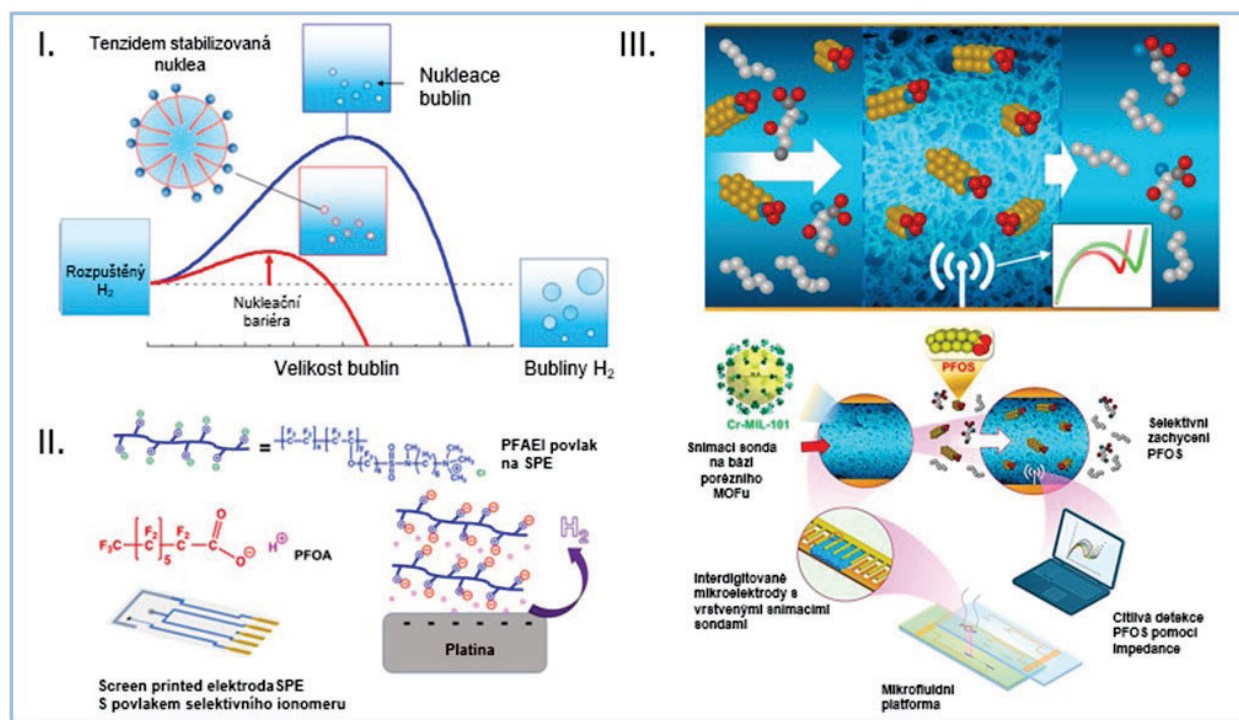
Existují i metody využívající okem viditelnou změnu barvy vzorku do charakteristického zabarvení díky jeho reakci s analytem. Takové způsoby detekce často využívají zlaté nanočástice (AuNP). Jsou založeny na schopnosti snadné modifikace jejich povrchu, která může metodu specifikovat pro určitý analyt. Např. AuNP s povrchem modifikovaným thiolem funkcionalizovaným polystyrenem interagují s PFOA v roztoku a mění svoji barvu z červené na fialovou (obr. 4 IV)<sup>43</sup>.

Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) je založena na principu interakce laserového paprsku s analytem. Fotony laseru interagují s molekulou analytu a následně je měřen signál po neelastické srážce s molekulou analytu, tj. po Ramanově rozptylu. Tento signál je ale slabý a k jeho mnohonásobnému zesílení se používá nanostruktura na povrchu substrátu<sup>44–46</sup>. Tato metoda má značný potenciál i pro detekci stopového množství PFOA v hasicích pěnách<sup>33</sup>. SERS substrát z oxidu grafenu pokrytý stříbrnými nanočásticemi byl schopen detekovat přítomnost PFOA až do limitu 50 ppb (cit.<sup>47</sup>).

## 6.2. Elektrochemická detekce

Elektrochemické metody jsou „oblíbenými“ metodami detekce pro svou jednoduchost, cenovou dostupnost, vysokou citlivost a rychlost měření<sup>48,49</sup>. Díky průchodu elektronů dochází k reakcím na rozhraní elektrody a elektrolytu, které jsou základním kamenem elektrochemických metod<sup>50,51</sup>. Nejvyužívanějšími jsou amperometrie, voltametrie, potenciometrie a impedimetrie<sup>33</sup>.

Amperometrické techniky používají konstantní napětí přivedené na pracovní elektrodu a měří průchod náboje na rozhraní nebo proudovou hustotu na dané ploše. Voltametrické metody fungují na stejném principu s rozdílem, že se do obvodu přivádí konstantní proud. Měřený proud nebo měřené napětí pak odpovídá rychlosti probíhající reakce na elektrodě, a tudíž i koncentraci analytu ve vzorku<sup>33</sup>. Jednou z možností detekce PFOA metodou používající popsany princip je detekce pomocí elektrochemické nukleace bublin. PFOA jako povrchově aktivní látka dokáže snížit energii potřebnou k nukleaci plynových bublin v roztoku (obr. 5 I). Metodou cyklické voltametrie bylo zjištěno, že během elektrochemické reakce, kdy v roztoku vzniká plyný vodík, hodnota maximálního proudu lineárně klesala se zvyšující se koncentrací analytu<sup>52</sup>. Velmi specifickou metodou je i použití perfluorovaného anexového ionomeru na elektrodě (obr. 5 II). Povro-



Obr. 5. Elektrochemická cesta detekce PFAS: I. Schématické znázornění metody pro detekci povrchově aktivní látky založená na nukleaci bublin<sup>52</sup>; II. Schéma detekce PFOA pomocí selektivních ionomerních povlaků na síťovkových elektrodách<sup>53</sup>; III. Znázornění zachycení PFOS a schéma procesu detekce na mikrofluidním impedančním senzoru na bázi MOF (cit.<sup>54</sup>). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

náním proudové odezvy z obdélníkové voltametrie bylo potvrzeno, že tato povrchová modifikace umožňuje provádět přímou detekci PFOA díky elektrostatickým, van der Waalsovým a hydrofobním interakcím mezi ionomerem a PFOA (cit.<sup>53</sup>).

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla použita v následujícím experimentu, kde byla vytvořena mikrofluidní platforma pro kvantifikaci PFAS. Organokovová síť (MOF) jako základ systému v pórech obsahovala chromové sondy, které mají vůči PFAS vysokou afinitu. Struktura s MOF tak aktivně zachycovala PFAS obsažené v roztoku, který jím procházel. Díky napojení na mikroelektrodu bylo následně možné měřit impedanční spektra a sledovat zvyšující se odpor přenosu náboje v závislosti na koncentraci PFAS (obr. 5 III)<sup>54</sup>.

## 7. Problémy při detekci PFAS

Navzdory významnému pokroku v metodách detekce PFAS existuje stále řada problémů, které je třeba překonat, aby se zvýšila účinnost detekce a hodnocení rizik spojených s působením těchto látek:

- Rozmanitost a počet sloučenin ve skupině PFAS ztěžuje vývoj standardizovaných detekčních metod schopných současně detekovat více sloučenin PFAS v různých maticích<sup>55–57</sup>.
- Nízké koncentrace PFAS v životním prostředí a biologických vzorcích vyžadují vysoce citlivé metody analýzy<sup>21</sup>.
- Složitost extrakce. Vzhledem k široké škále fyzikálně-chemických vlastností PFAS zůstává vývoj účinných a univerzálních extrakčních metod pro všechny typy matic (voda, půda, biologické tkáně) výzvou. Pro maximalizaci detekce nebo extrakce cílových sloučenin a minimalizaci ztrát jsou nutné specifické postupy přípravy vzorků<sup>58–61</sup>.
- Regulační a zákonná omezení. Různé země a regiony mohou uplatňovat různé předpisy, což vytváří další výzvy pro mezinárodní výzkum a spolupráci<sup>62,63</sup>.

## 8. Závěr

Závěrem lze říci, že výzkum PFAS týkající se jejich přítomnosti v životním prostředí, bezpečnosti a rizik spojených s jejich následnými dopady na lidské zdraví přinesl mnohé výzvy a nové oblasti budoucího vývoje technologií v této oblasti. Odolnost PFAS vůči přirozené degradaci a schopnost dlouhodobé akumulace v životním prostředí a biologických organismech z nich činí zvláště zajímavou třídu kontaminantů. Toxikologické studie ukázaly, že expozice PFAS může vést k řadě nepříznivých zdravotních účinků, včetně narušení endokrinního systému, narušení reprodukce, zvýšenému riziku některých typů rakoviny a mnohým dalším neblahým následkům na lidské zdraví. Moderní metody detekce a analýzy PFAS se neustále zlepšují, což umožňuje lepší citlivost a specifitu při detekci

těchto látek v různých prostředích. Stále však existuje akutní potřeba vyvinout účinnější metody pro detekci a likvidaci PFAS.

*Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR č. 23-07445S.*

### Seznam použitých zkratk

GenX = HFPO-DA	perfluor(2-methyl-3-oxahexanoát) amonný
PFAS	perfluorované a polyfluoralkylové látky
PFCA	perfluorkarboxylové kyseliny
PFBS	perfluorbutansulfonová kyselina
PFHpA	perfluorheptanová kyselina
PFHS	perfluorhexansulfonová kyselina
PFNA	perfluornonanová kyselina
PFOA	perfluoroktanová kyselina
PFOS	perfluoroktansulfonová kyselina

### LITERATURA

- Centers for Disease Control and Prevention: [https://www.cdc.gov/biomonitoring/PFOA\\_FactSheet.html](https://www.cdc.gov/biomonitoring/PFOA_FactSheet.html), staženo 14. 1. 2024.
- Kuzukiran O., Simsek I., Filazi A., Yurdakok-Dikmen B., v knize: *Reproductive and Developmental Toxicology*, (Gupta R. C., ed.), 3. vyd., str. 815. Academic Press, Cambridge 2022.
- Fu Y., Wang T., Fu Q., Wang P., Lu Y.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 246 (2014).
- PubChem: National Center for Biotechnology Information (2024).
- PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/7137>, staženo 14. 1. 2024.
- PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanoic-acid>, staženo 19. 10. 2022.
- Manojkumar Y., Pilli S., Rao P. V., Tyagi R. D.: *Neurotoxicol. Teratol.* 97, 107174 (2023).
- ECHA: <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas>, staženo 14. 1. 2024.
- WHO: <https://www.who.int/publications/m/item/background-documents-for-development-of-who-guidelines-for-drinking-water-quality-and-guidelines-for-safe-recreational-water-environments>, staženo 14. 1. 2024.
- Begley T. H., White K., Honigfort P., Twaroski M. L., Neches R., Walker R. A.: *Food Addit. Contam.* 22, 1023 (2005).
- Luo Y., Gibson C. T., Chuah C., Tang Y., Naidu R., Fang C.: *Sci. Total Environ.* 851, 158293 (2022).
- Sapozhnikova Y., Taylor R. B., Bedi M., Ng C.: *Chemosphere* 337, 139381 (2023).
- Dinglasan M. J. A., Ye Y., Edwards E., Mabury S.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 2857 (2004).

14. Schaidler L. A., Balan S. A., Blum A., Andrews D. Q., Strynar M. J., Dickinson M. E., Lunderberg D. M., Lang J. R., Peaslee G. F.: *Environ. Sci. Technol. Lett.* **4**, 105 (2017).
15. Minnesota Department of Health: <https://www.health.state.mn.us/communities/environment/risk/docs/guidance/gw/pfoainfo.pdf>, staženo 6. 1. 2024.
16. Brusseau M. L., Guo B.: *Chemosphere* **302**, 134938 (2022).
17. Griffin E. K. a 14 spoluautorů: *Mar. Pollut. Bull.* **192**, 115011 (2023).
18. Dvorakova D., Jurikova M., Svobodova V., Parizek O., Kozisek F., Kotal F., Jeligova H., Mayerova L., Pulkrabova J.: *Water Res.* **247**, 120764 (2023).
19. Liu L., Qu Y., Huang J., Weber R.: *Environ. Sci. Eur.* **33**, No. 6 (2021), doi: 10.1186/s12302-020-00425-3.
20. Lau C., Anitole K., Hodes C., Lai D., Pfahles-Hutchens A., Seed J.: *Toxicol. Sci.* **99**, 366 (2007).
21. Houde M., De Silva A. O., Muir D. C. G., Letcher R. J.: *Environ. Sci. Technol.* **45**, 7962 (2011).
22. Vestergren R., Cousins I. T., v knize: *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods* (Rose M., Fernandes A., ed.), str. 279. Woodhead Publishing, Sawson 2013.
23. Russell M. H., Waterland R. L., Wong F.: *Chemosphere* **129**, 210 (2015).
24. Seow J.: [https://www.kappetijn.eu/wp-content/uploads/2019/05/Rapport-Jimmy-Seow-Environment-Firefighting\\_Foam\\_final\\_version\\_7June2013.pdf](https://www.kappetijn.eu/wp-content/uploads/2019/05/Rapport-Jimmy-Seow-Environment-Firefighting_Foam_final_version_7June2013.pdf), staženo 14. 1. 2024.
25. Maloney E. K., Waxman D. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 209 (1999).
26. Zhang T., Sun H., Qin X., Gan Z., Kannan K.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 5572 (2015).
27. Cao Y., Ng C.: *Environ. Sci.: Processes Impacts* **23**, 1623 (2021).
28. Dragon J., Hoaglund M., Badireddy A. R., Nielsen G., Schlezinger J., Shukla A.: *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 8539 (2023).
29. Zheng G., Schreder E., Dempsey J. C., Uding N., Chu V., Andres G., Sathyanarayana S., Salamova A.: *Environ. Sci. Technol.* **55**, 7510 (2021).
30. Obeng-Gyasi E.: *Aging Health Res.* **2**, 100086 (2022).
31. Rickard B. P., Rizvi I., Fenton S. E.: *Toxicology* **465**, 153031 (2022).
32. Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:164:0007:0031:EN:PDF>, staženo 10. 2. 2024.
33. Ryu H., Li B., De Guise S., McCutcheon J., Lei Y.: *J. Hazard. Mater.* **408**, 124437 (2021).
34. Burtsev V., Erzina M., Guselnikova O., Miliutina E., Kalachyova Y., Svorcik V., Lyutakov O.: *Analyst* **146**, 3686 (2021).
35. Miliutina E., Guselnikova O., Kushnarenko A., Bainova P., Postnikov P., Hnatowicz V., Svorcik V., Lyutakov O.: *ACS Sens.* **5**, 50 (2020).
36. Guselnikova O., Miliutina E., Elashnikov R., Burtsev V., Chehimi M. M., Svorcik V., Yusubov M., Lyutakov O., Postnikov P.: *Prog. Org. Coat.* **136**, 105211 (2019).
37. Miliutina E., Kalachyova Y., Postnikov P., Švorčík V., Lyutakov O.: *Photonic Sens.* **10**, 105 (2020).
38. Miliutina E. a 10 spoluautorů: *Appl. Surf. Sci.* **586**, 152833 (2022).
39. Miliutina E., Žádný J., Guselnikova O., Storch J., Walaská H., Kushnarenko A., Burtsev V., Svorcik V., Lyutakov O.: *Sens. Actuators, B* **343**, 130122 (2021).
40. Cheng Z., Du L., Zhu P., Chen Q., Tan K.: *Spectrochim. Acta, Part A* **201**, 281 (2018).
41. Fang C., Wu J., Sobhani Z., Al Amin M., Tang Y.: *Anal. Methods* **11**, 163 (2018).
42. Sunantha G., Vasudevan N.: *Sci. Total Environ.* **759**, 143544 (2021).
43. Takayose M., Akamatsu K., Nawafune H., Murashima T., Matsui J.: *Anal. Lett.* **45**, 2856 (2012).
44. Erzina M., Trelin A., Guselnikova O., Skvortsova A., Strnadova K., Svorcik V., Lyutakov O.: *Sens. Actuators, B* **367**, 132057 (2022).
45. Guselnikova O., Elashnikov R., Svorcik V., Kartau M., Gilroy C., Gadegaard N., Kadodwala M., Karimullah A. S., Lyutakov O.: *Nanoscale Horiz.* **8**, 499 (2023).
46. Skvortsova A. a 10 spoluautorů: *Sens. Actuators, B* **375**, 132812 (2023).
47. Fang C., Megharaj M., Naidu R.: *RSC Adv.* **6**, 11140 (2016).
48. Buravets V. a 10 spoluautorů: *Nanoscale Adv.* **5**, 6837 (2023).
49. Zabelina A. a 15 spoluautorů: *Chem. Eng. J.* **454**, 140441 (2023).
50. Elashnikov R., Trelin A., Tulupova A., Miliutina E., Zahorjanová K., Ulbrich P., Tomeček D., Fitl P., Švorčík V., Lyutakov O.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **13**, 48030 (2021).
51. Zabelin D. a 12 spoluautorů: *Chem. Eng. J.* **443**, 136440 (2022).
52. Ranaweera R., Ghafari C., Luo L.: *Anal. Chem.* **91**, 7744 (2019).
53. Sahu S. P., Kole S., Arges C. G., Gartia M. R.: *ACS Omega* **7**, 5001 (2022).
54. Cheng Y. H., Barpaga D., Soltis J. A., Shutthanandan V., Kargupta R., Han K. S., McGrail B. P., Motkuri R. K., Basuray S., Chatterjee S.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 10503 (2020).
55. Menger R. F., Funk E., Henry C. S., Borch T.: *Chem. Eng. J.* **417**, 129133 (2021).
56. Hassan M. T.-A., Chen X., Fnu P. I. J., Osonga F. J., Sadik O. A., Li M., Chen H.: *J. Hazard. Mater.* **465**, 133366 (2024).
57. Schymanski E. L., Zhang J., Thiessen P. A., Chirsir P., Kondic T., Bolton E. E.: *Environ. Sci. Technol.* **57**, 16918 (2023).

58. Simon F., Gehrenkemper L., von der Au M., Wittwer P., Roesch P., Pfeifer J., Cossmer A., Meermann B.: *Chemosphere* 295, 133922 (2022).
59. George S. E., Baker T. R., Baker B. B.: *Environ. Pollut.* 321, 121123 (2023).
60. Groisman L., Berman T., Quinn A., Pariente G., Rorman E., Karakis I., Gat R., Sarov B., Novack L.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 262, 115165 (2023).
61. Kaltenberg E. M., Dasu K., Lefkovitz L. F., Thorn J., Schumitz D.: *Environ. Pollut.* 318, 120940 (2023).
62. The Organisation for Economic Co-operation and Development: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/portal-perfluorinated-chemicals/terminology-per-and-polyfluoroalkyl-substances.pdf>, staženo 14. 1. 2024.
63. The Organisation for Economic Co-operation and Development: [https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-management/Risk\\_Reduction\\_Approaches%20for%20PFASS.pdf](https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-management/Risk_Reduction_Approaches%20for%20PFASS.pdf), staženo 14. 1. 2024.

**K. Kukrálová, E. Miliutina, O. Lyutakov, and V. Švorčík** (*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology Prague, Prague*): **Perfluoroalkyl Substances – an Overview of Their Occurrence, Health Effects and Detection Methods**

Perfluoroalkyl substances (PFAS) have gained wider public attention in recent years as environmental pollutants which include perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. These substances are produced by industry, mainly during the manufacture of polymers or non-stick surfaces. They can enter the environment through waste water or other routes and contaminate drinking water sources or food. Their effects on organisms and human health have been extensively studied and their presence in the body has been attributed to many health complications including cancer. For this reason, limits for PFAS in drinking water have been established and their regulation is being addressed by many governments and international organisations. Chromatographic methods are the current standard for PFAS detection, but new detection methods, mainly optical and electrochemical, are currently being investigated. Examples of these are described in more detail in the text.

**Keywords:** perfluoroalkyl substances (PFAS), occurrence of PFAS, effects of PFAS on human health, detection of PFAS

*Acknowledgements*

*The authors thank the GA CR for the financial support for their scientific work in project No. 23-07445S.*



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.

## NUKLEOSIDOVÁ CHEMIE V ÚOCHB – OHLÉDNUTÍ DO HISTORIE

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

MARCELA KREČMEROVÁ

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

Došlo 26.2.24, přijato 27.3.24.

Nukleosidová chemie se v ÚOCHB rozvíjela od roku 1957 díky předvídatosti jeho prvního ředitele Františka Šorma. Tento nový obor, z počátku cílený hlavně na syntézu oligonukleotidů, si brzy vydobyl skvělou reputaci. ÚOCHB byl v té době jedním z pouhých čtyř pracovišť na světě úspěšných v syntéze oligonukleotidů. Prvními úspěchy v syntézách chemicky modifikovaných nukleosidů byly syntézy 6-azauridinu jako antileukemika, 6-azauridin-triacetátu jakožto léčiva proti lupénce (Riboazauracil) a zejména 5-azacytosinových nukleosidů 5-azacytidinu a 2'-deoxy-5-azacytidinu (decitabinu), které byly syntetizovány na počátku 60. let Aloisem Pískalou. Obě sloučeniny jsou antileukemické látky fungující na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací. V současné době se klinicky používají k léčbě myelodysplastických syndromů a dalších hematologických malignit a jsou prodávány pod obchodními názvy Vidaza<sup>®</sup> (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen<sup>®</sup> (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Významné syntetické úspěchy jsou spjaty s osobností Antonína Holého včetně syntéz L-nukleosidů a acyklických nukleosidových analogů, tj. látek, v nichž je cukerný furanosový kruh nahrazen (poly)hydroxylovaným acyklickým řetězcem. Mnohé byly shledány účinnými antiviroty a jeden z nich, 9-(S)-[(2,3-dihydroxypropyl)]adenin, dokonce vstoupil do klinické praxe jako antiherpetické léčivo Duvira gel. Skutečným milníkem se stal vývoj acyklických nukleosidfosfonátů (ANP), poprvé publikovaných Holým a De Clercqem v roce 1986. V průběhu příštích tří dekad bylo identifikováno ohromné množství biologicky aktivních ANP jako antiviroty, cytostatik, imunomodulátorů a antiparazitik. Tři z nich se dostaly do klinické praxe jako úspěšná antivirotika: cidofovir pro léčbu cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, tenofovir pro léčbu a prevenci HIV a později schválen též pro léčbu hepatitidy B a adefovir taktéž pro léčbu hepatitidy B. Tenofovir je ve formě prolečiv nyní nejvíce používán jako součást kombinovaných anti-HIV preparátů obsahujících v jedné tabletě několik různých anti-HIV léčiv současně a stal se nejspěšnějším a nejpoužívanějším anti-HIV léčivem vůbec.

Klíčová slova: 6-azauracil, 5-azacytidin, decitabin, antimetabolity, L-nukleosidy, acyklické analogy, DHPA, acyklické nukleosidfosfonáty, cidofovir, adefovir, antivirotika, HIV, tenofovir, kombinovaná antiretroviróvá terapie, antiparazitika

V historii vědy zůstane rok 1953 už navždy spojen s jedním z nejvýznamnějších objevů 20. století. Stalo se tak v Cavendishově laboratoři v Cambridgi a onou událostí bylo vyřešení struktury DNA jako dvojité šroubovice s antiparalelní orientací obou řetězců, kde se párují adenin s thyminem a guanin s cytosinem pomocí vodíkových vazeb. Revoluční objev, který položil základy budoucí molekulární biologie a genetiky, byl odhalen světu 25. dubna 1953 v časopise Nature<sup>1</sup>. Článek dlouhý jen něco přes jednu stránku začínající poněkud nesmělým úvodem „Rádi bychom navrhli strukturální podobu soli deoxyribonukleové kyseliny (D.N.A). Vyznačuje se novými rysy, které mají značnou biologickou zajímavost...“ záhy ovlivnil směřování vědeckého výzkumu chemických a biochemických laboratoří po celém světě.

V pražských Dejvicích byl ve stejném roce založen Ústav organické chemie a biochemie ČSAV v čele s jeho

prvním ředitelem Františkem Šormem. Činnost ústavu se zaměřovala hlavně na chemii přírodních látek (terpenů a rostlinných léčiv), steroidů, klasickou organickou syntézu (syntézy antibiotik, azulenů, aminokyselin a peptidů), aplikaci fyzikálních metod (IČ a UV spektroskopie), chemii a biochemii bílkovin a enzymologii. František Šorm byl člověk s mimořádnou vědeckou intuicí a brzy dokázal rozpoznat nezbytnost výzkumu nukleových kyselin pro další rozvoj biologických a chemických věd. Proto již čtyři roky po založení ústavu, v roce 1957, založil v ÚOCHB oddělení chemie nukleových kyselin, jehož vedoucím se stal Dr. Jiří Smrt. Jedním z hlavních témat nového oddělení byla syntéza oligonukleotidů.

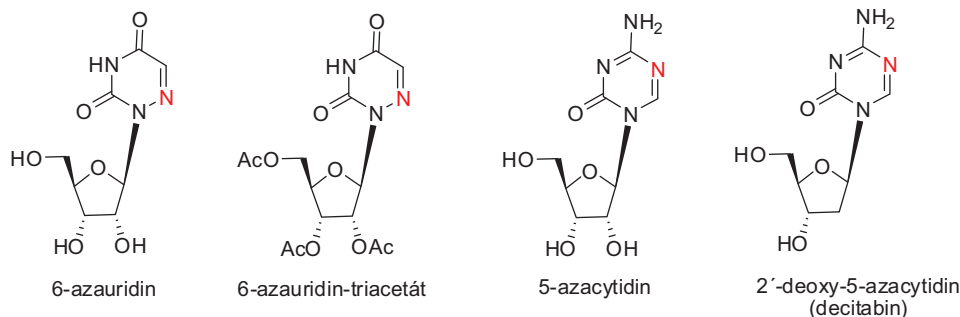
První oligonukleotidová práce autorů Smrta a Šorma z roku 1961 popisuje syntézu dimeru 6-azaU-p-U kondenzační reakcí chráněného 6-azauridinu a uridin-3'-fosfátu s DCC a následným odchráněním<sup>2</sup>. Požadavky molekulár-

ních biologů na syntetické oligonukleotidy byly hnací silou k rychlému vývoji nových efektivnějších metod syntézy a pražská skupina si zde vydobyla velmi brzy prestižní pozici. Na počátku 60. let patřil ÚOCHB k pouhým čtyřem pracovištím na světě úspěšných v syntéze oligonukleotidů. Původní metoda syntézy oligonukleotidů v roztoku fosfodiesterovou metodou (Khorana) byla postupně nahrazována nejprve účinnější fosfortriesterovou metodou (Letsinger), poté metodou H-fosfonátovou (Todd, Froehler, Matteucci) a fosfitovou (Letsinger), která vytvořila základ fosforamiditové metody (Caruthers), která je v současnosti jedinou prakticky používanou metodou syntézy oligonukleotidů na pevné fázi<sup>3</sup>. Také zde jsme dokázali držet krok se západními pracovišti. Díky technické zdatnosti Jiřího Smrta a pracovníků vývojových dílen byly na ústavu svépomocí sestrojeny první automatické syntetizátory SynGen-1 a SynGen-2.

Paralelně s chemií oligonukleotidů byla věnována pozornost syntézám a biochemickým studiím chemicky modifikovaných nukleosidů. Strukturně pozměněné nukleosidy fungují jako antimetabolity v procesech metabolismu nukleových kyselin a mohou tedy ovlivňovat enzymové reakce v buňkách nebo buněčných parazitech (např. viry, bakterie, plísň). Osobnostmi nukleosidového výzkumu byli v 60. letech František Šorm, Alois Pískala, Jiří Žemlička, Stanislav Chládek, Jiří Beránek, Miroslav Prystaš, Antonín Holý, Josef Piřha, Jiří Veselý, Alois Čihák a Karel Raška, Jr. Pozornost farmaceutického průmyslu se v té době upínala hlavně na látky s cytostatickými účinky. První nukleosidové práce v ÚOCHB na konci 50. let se týkaly hlavně 6-azauridinu (obr. 1), což byl v té době v socialistickém Československu jediný komerčně dostupný nukleosid. Získával se jako vedlejší produkt z jedné biotechnologické výroby na Slovensku a důvodem zájmu o něj byly jeho cytostatické účinky. 6-Azauridin byl krátce vyvíjen firmou Spofa jako prostředek k léčbě leukémie a byl dokonce licencován britské firmě Distillers Co. V klinických zkouškách se však jeho antileukemické účinky ukázaly jako nedostatečné a vývoj byl ukončen. Mnohem úspěšnější byl 6-azauridin-triacetát. Tento derivát byl komerčně dostupný pod názvem Ribozauracil a prodával se v USA jako léčivo na lupénku<sup>4,5</sup>.

I jeho používání však bylo zastaveno, a to z důvodu tromboembolických vedlejších účinků u malého procenta pacientů.

Biologická zajímavost 6-azapyrimidinových derivátů vedla logicky k myšlence syntetizovat jejich 5-azaanalogy. Toto téma bylo náplní disertační práce vědeckého aspiranta Aloise Pískaly. Ukázalo se, že syntetizovat 5-azauridin je nesmírně obtížné, a to z důvodu nestability triazinového kruhu – poloha 6 je extrémně náchylná k ataku nukleofilních činidel včetně  $\text{OH}^-$  iontů vody a dochází vždy spontánně k jeho otevření<sup>6</sup>. Po velkém úsilí se Pískalovi látka podařilo připravit značně složitým postupem výstavby celé heterocyklické části. K velkému zklamání však byly jeho biologické účinky nulové a Šorm poté Pískalovi zakázal další 5-azapyrimidinové deriváty připravovat jakožto ztrátu času a plýtvání drahými chemikáliemi. Pískala ale i tak v syntézách tajně pokračoval a roku 1963 připravil 5-azacytidin<sup>7</sup>. K překvapení všech se ukázaly jednak jeho mimořádně silné antibakteriální účinky, ale především účinky cytostatické, konkrétně antileukemické. Tématika 5-azacytosinových derivátů získala ihned oficiální podporu a rok na to byl syntetizován i 2'-deoxy analog, 5-aza-2'-deoxycytidin (decitabin, obr. 1). Na obě molekuly byly podány patentové přihlášky a patenty dokonce licencovaly velké farmaceutické firmy (Bayer a Upjohn, později Bristol-Myers). Vzhledem ke komplikovanému způsobu přípravy byl prakticky veškerý materiál obou nukleosidů na preklinické a klinické testy (mnohačetgramové až kilogramové šarže) po dlouhá léta syntetizován v ÚOCHB vlastníma rukama Dr. Pískaly a jeho spolupracovníků. Bohužel jeho objevy byly učiněny v nepříliš vhodné době, a přestože obě látky po 40 letech výzkumu nakonec dospěly až ke klinickému schválení, jejich autor ani ústav z nich neměl nikdy žádný zisk. Na tom se podepsaly jak nevhodné smlouvy s firmami nebo jejich nedodržení, tak především neznalost patentového práva a všeobecně špatná patentová politika tehdejší Československé akademie věd. Pohnutá historie vývoje obou léčiv byla nedávno podrobně vylíčena v časopise Vesmír<sup>8</sup>. Průlomový objev, který hlavní měrou přispěl ke klinickému vývoji obou léčiv, učinili v roce 1980 profesor Peter Jones se svou doktorandkou



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

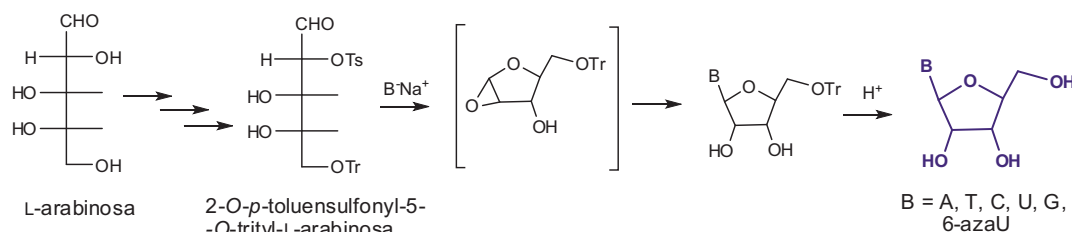
Shirley Taylor z University Jižní Kalifornie (USC, Los Angeles), když při práci s 5-azacytidinem pozorovali v té době téměř neuvěřitelný jev přeměny rakovinných buněk do stadia víceméně normálních buněk. K objevu došlo náhodou. Stačilo, aby si jeden z laborantů Jonesovy laboratoře po skončení experimentů s azacytidinem neuklidil stůl a odjel na dovolenou. Když se vrátil, zapomenuté rakovinné buňky byly po několikátýdenním působení azacytidinu zcela zdravé. Profesora Jonese účinek látky natolik nadchnul, že si 5-azacytidin podle Pískalovy publikace v Collection of Czechoslovak Chemical Communication<sup>7</sup> ihned nasyntetizoval k dalším výzkumům a dokonce si nechal jeho označení 5-AZA-C přepsat jako novou poznávací značku svého auta.

Jak tedy 5-azacytidin funguje? Ukázalo se, že při nízkých koncentracích mají 5-azacytosinové nukleosidy zcela nový mechanismus účinku, odlišný od všech dosud známých cytostatik. 5-Azacytidin a decitabin fungují na epigenetickém principu jako inhibitory DNA methylací<sup>9</sup>. DNA je methylována enzymem DNA methyltransferasou v poloze 5 cytosinu; K DNA methylací dochází téměř výhradně v oblasti zvýšeného výskytu CpG dinukleotidů, tzv. CpG ostrůvků, které jsou přítomny v promotorové oblasti přibližně 50 % genů. Právě abnormální hypermethylace promotorových regionů v CpG ostrůvcích byla u mnoha druhů malignit prokázána jako příčina utlumení funkce tumorsupresorových genů a rozvoje rakovinného bujení. Enzym DNA methyltransferasa a její inhibice se tak stává důležitým targetem ve vývoji antitumorových léčiv, která necílí na rakovinné buňky za účelem jejich zničení, ale místo toho umožňují zpětnou přeměnu maligní buněčné populace do stavu více méně normálních zdravých buněk<sup>10</sup>. Po čtyřiceti letech od publikace prvních syntéz a mnoho let po expiraci původních patentů byly nakonec oba 5-azacytosinové nukleosidy schváleny FDA jako léčiva k terapii myelodysplastických syndromů pod názvy Vidaza<sup>®</sup> (5-azacytidin, schválen 2004) a Dacogen<sup>®</sup> (5-aza-2'-deoxycytidin, schválen 2006). Dalšími indikacemi pro jejich aplikaci jsou akutní myeloidní leukémie (Vidaza<sup>®</sup>, Dacogen<sup>®</sup>) a chronická myelomonocytová leukémie (Vidaza<sup>®</sup>).

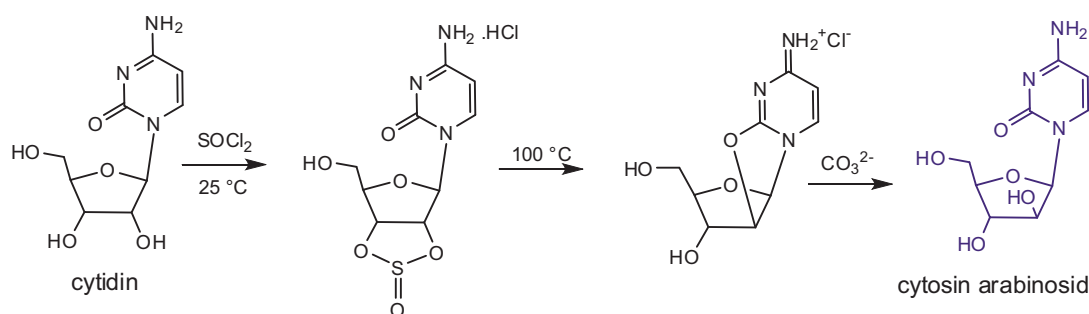
Ve stejné době, kdy Pískala rozvíjí svou chemii 5-azacytidinu, začíná svou kariéru v ÚOCHB také mladý Antonín Holý. Ten se nejprve jako aspirant pod vedením Dr. Zdeňka Arnolda věnoval klasické organické syntéze,

speciálně syntetickému využití reaktivity dimethylformamidu a polymethiniových solí<sup>11–13</sup>. Do nukleosidové skupiny nastoupil po aspirantůře a zde se několik let zabýval hlavně 6-azauridinovou chemií, fosforylačními reakcemi, přípravou krátkých oligoribonukleotidů, cyklických ribonukleosidfosfátů a nukleosid 5'-fosfátů. Jeho průlomovou prací však byla roku 1969 syntéza L-nukleosidů a jejich fosforylovaných metabolitů. L-Nukleosidy byly v hledáčku biochemiků již nějaký čas, ale cesta k nim byla synteticky obtížná. První syntézy popsané o pět let dříve vycházející z halogenosy L-ribosy nebo halogenosy 5'-difenylylfosforyl-L-ribosy a soli příslušné báze vedly jen k malým množstvím požadovaného produktu<sup>14,15</sup>. Holého syntéza vycházející z L-arabiny přes 2-O-p-toluensulfonyl-5-O-trityl-L-arabinosu, uzavření epoxidového kruhu mezi polohami 1 a 2 a následné otevření epoxidu sodnou solí příslušné báze bylo synteticky jednoduché, univerzální a umožnilo získávat L-nukleosidy ve velkých, až 100 g šaržích<sup>16</sup> (obr. 2). O tři roky později, roku 1972 publikoval Holý podobně úspěšnou metodiku syntézy L-deoxyribonukleosidů<sup>17</sup>. L-Nukleosidy byly předmětem výzkumu mnoha biochemických pracovišť, avšak významné účinky a uplatnění v té době ještě nenašly. Jejich „zlatá éra“ měla přijít až o několik desetiletí později, když se hlavním úkolem farmaceutických firem stal boj s těžkými virovými infekcemi, jako HIV, hepatitida B nebo cytomegalovirové infekce u transplantovaných pacientů. Antivirotika, která dnes patří k hlavním terapeutikům proti těmto virovým infekcím, jako např. lamivudin, emtricitabin, clevudin, telbivudin nebo maribavir, jsou sloučeniny na bázi L-nukleosidů<sup>18</sup>. Přesto, že žádný z těchto preparátů není originálním produktem našeho ústavu, původní syntetické know-how našich chemiků k jejich vývoji přispělo významnou měrou.

Omezený přístup k devizovým prostředkům byl iniciací snahy o maximální soběstačnost, a to v nejrůznějších odvětvích, chemii a zdravotnictví nevyjímaje. Proto bylo např. vysoce oceňovaným počinem vypracování originální syntézy cytostatika 1-β-D-arabino-furanosylcytosinu (cytosin arabinosid, araC, cytarabin) používaného k léčbě leukémií. Inovativní pouze tříkroková syntéza vycházející z cytidinu (obr. 3) byla velmi efektivní a firma Spofa tak mohla podle tohoto postupu vyrábět vlastní cytarabin, který byl dodáván na trh pod firemním názvem Alcysten. Autoři syntézy Hubert Hřebabecký a Josef Brokeš pod



Obr. 2. Zkrácené schéma syntézy L-nukleosidů



Obr. 3. Originální syntéza cytosin arabinosidu (cytarabinu) vyvinutá v ÚOCHB

vedením Jiřího Beránka byli za tuto syntézu v roce 1980 oceněni Cenou ČSAV „Za nové poznatky v oblasti kancerostatika 1-β-D-arabinofuranosylcytosinu vedoucí k praktické aplikaci dosažených výsledků.“ (cit.<sup>19</sup>).

Zatímco v 50. a 60. letech byl hlavní zájem farmaceutického průmyslu soustředěn na vývoj látek cytostatické povahy, koncem 60. a počátkem 70. let se začíná obracet pozornost stále více i k virovým infekcím. Jedním z iniciátorů tohoto trendu byl v té době explozivní nárůst genitálního herpesu v USA, zřejmě jako důsledek společenských změn vedoucích k celkovému uvolnění morálky, vzniku hnutí hippies a zvýšení promiskuity. Genitální herpes je sexuálně přenosné onemocnění, které je způsobené nejčastěji virem herpes simplex typu 2 (HSV-2), ale původcem může být někdy i HSV-1. Jedna z prvních, kdo se začal systematicky věnovat hledání a testování protivirotických látek na bázi nukleosidových analogů, byla americká biochemička a farmakoložka Gertrude Elion, vedoucí oddělení experimentální terapie společnosti Burroughs Wellcome. Poté, co si všimla, že adenin arabinosid vykazoval známky aktivity proti některým DNA virům, začala syntetizovat nové látky na bázi nukleosidových analogů. Výsledkem tohoto úsilí byl mezi jinými také purinový analog 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin (acyklovir, Zovirax), který se záhy ukázal jako účinný inhibitor herpes simplex viru typu I a typu II a dalších herpetických virů<sup>20,21</sup>. Zovirax firmy Burrough Wellcome dlouho vedl na žebříčku prodeje protivirotických léků a v roce 1988 byla za něj Gertrudě Elion spolu s kolegou Georgem Hitchingsem udělena Nobelova cena. Byla to historicky první Nobelova cena cílená do farmaceutického průmyslu. Z chemického hlediska byl acyklovir představitelem nové generace antimetabolitů, založené na tom, že potřebné prostorové uspořádání bioaktivní molekuly nemusí být *a priori* fixováno, ale může být vyvoláno z rozvolněné struktury molekuly teprve kontaktem s cílovým enzymem metabolismu, na nějž působí. Podobně jako u antimetabolitů dříve zmíněných, je i zde pro jejich funkci klíčovým metabolickým krokem fosforylace. V buňkách infikovaných herpes virem je tato fosforylace 30–120krát rychlejší než u neinfikova-

ných buněk, klíčovým enzymem katalyzujícím tuto fosforylaci je thymidinkinasa.

Nový typ nukleosidových antimetabolitů s acyklickým řetězcem nahrazujícím cukerný kruh inspiroval nukleosidové chemiky z různých pracovišť. V ÚOCHB tato tematika zaujala mladého vědce Antonína Holého, který brzy na to syntetizoval svou vlastní sérii acyklických analogů. V květnu 1976 dostal Holý příležitost zúčastnit se v Göttingenu nukleosidové konference s názvem „Symposium on synthetic nucleosides, nucleotides and polynucleotides“. Konferenci organizoval Karl-Heinz Scheit, který byl Holého přítelem a spolupracovníkem spolu s Fritzem Ecksteinem během Holého tříměsíční postdoktorské stáže v Göttingenu. Na konferenci se Holý seznámil s předními osobnostmi nukleosidové chemie té doby, přičemž do budoucna nejvýznamnější bylo setkání s mladým belgickým lékařem – virologem z Lovaně Erikem De Clercqem. De Clercq, ač vzděláním lékař, vynikal znalostmi chemie a schopností správného chemického myšlení. Velmi rychle odhadl potenciál nukleosidů a nukleosidových antimetabolitů v jejich působení proti buněčným parazitům včetně virů. Na konferenci do Göttingenu přijel hlavně proto, aby se tu pokusil najít chemika ochotného ke spolupráci v hledání protivirotických látek. Setkání De Clercqa s Holým bylo pro oba muže doslova osudové. Z obou vědců se stali doživotní přátelé a z jejich spolupráce vnikla v průběhu let protivirotická léčiva zachraňující životy miliónů lidí. Toto první setkání později oba zmiňovali ve svých přednáškách a retrospektivních publikacích jako zcela zásadní<sup>22,23</sup>. Erik De Clercq je mnohokrát vyjádřil, že jeho největší životní výhrou byla právě účast na konferenci v Göttingenu v roce 1976 a objev zdejší plejády vynikajících nukleosidových chemiků, z nichž první mezi všemi byl Antonín Holý. První série pouhých šesti látek přišla poštou z Prahy do Lovaně ještě téhož roku. K obrovskému překvapení byly dvě látky protiviroticky aktivní, z čehož nejnadějnější se jevil (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (DHPA)<sup>24</sup>. K objevu DHPA došlo jen krátce poté, co byl objeven protivirotický účinek acykloviru. Na rozdíl od acykloviru působícímu selektivně proti her-



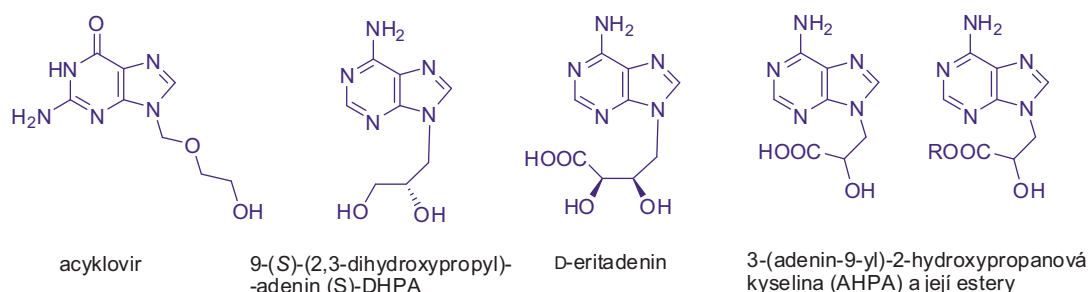
pesvirům na základě přednostní fosforylace virovou thymidinkinasou, DHPA má široké spektrum aktivit jak proti DNA virům, tak i RNA virům. Jeho účinek spočívá v reverzibilní inhibici enzymu *S*-adenosylhomocystein-hydrolasy katalyzujícímu hydrolyzu *S*-adenosylhomocysteinu (SAH) na adenosin a *L*-homocystein. Hromadí se SAH, jenž vzniká z *S*-adenosyl-*L*-methioninu (SAM) odštěpením methylu, následně působí jako inhibitor různých SAM-dependentních methylačních procesů včetně těch, které jsou nezbytné pro fázi zrání (maturace) virové RNA<sup>25</sup>. Pro svou vysokou účinnost a prakticky nulovou toxicitu byl DHPA postoupen do klinického testování a posléze schválen jako léčivo k topickému použití pro indikaci herpes labialis (opar), jehož původcem je virus HSV-1. Preparát se prodával ve formě krému pod názvem Duvira<sup>®</sup> gel a byl vyráběn firmou Spofa.

Dalšími Holého účinnými virostatiky s podobným mechanismem účinku (inhibice methylačních reakcí) byly látky *D*-eritadenin, 3-(adenin-9-yl)-2-hydroxypropanová kyselina (AHPA) a AHPA estery (obr. 4, cit.<sup>26–28</sup>). Z těchto látek se však už žádná do klinické fáze nedostala. Nejvýznamnější Holého objevy z oboru protivirotických léčiv však již měly přijít za nedlouho.

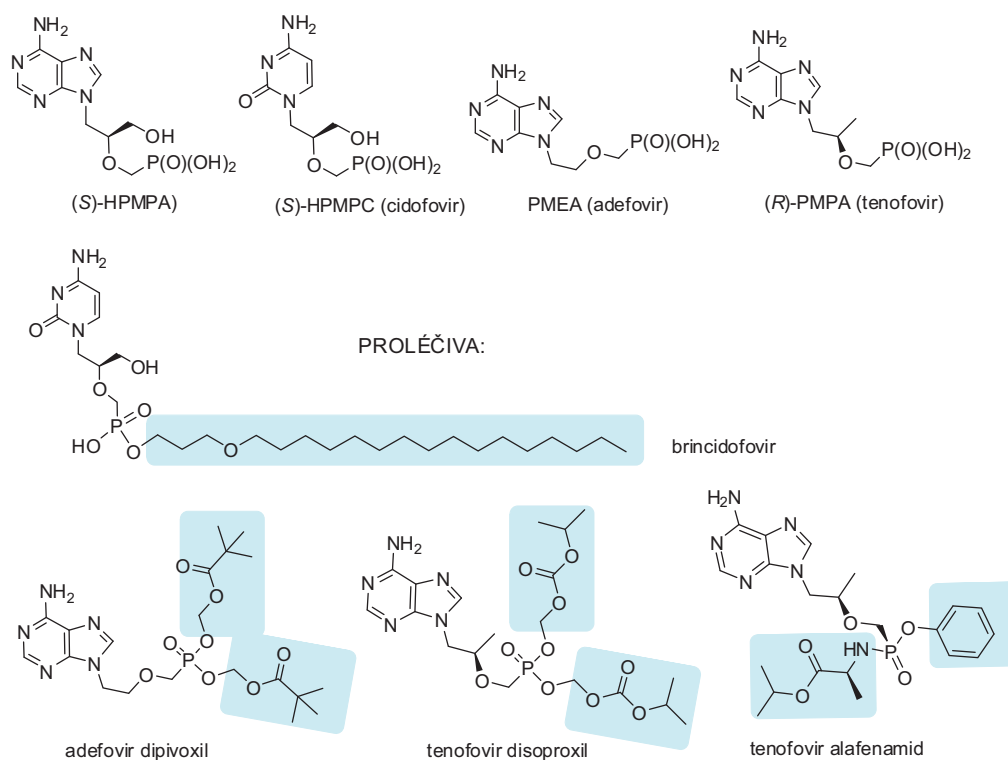
Jak již bylo zmíněno výše, většina nukleosidových analogů při vstupu do buňky potřebuje být fosforylována, aby se mohl projevit jejich biologický účinek jakožto anti-metabolitu. Přímá aplikace nukleosidfosfátů však není reálná, fosfáty jsou chemicky a metabolicky nestabilní. Tento problém vyřešil Holý jednoduchým a velmi elegantním způsobem – připojením fosfátového uskupení přes methylenový můstek. Takové látky jsou tedy nikoli fosfáty, ale fosfonomethylderiváty. Nemohou v organismu hydrolyticky odštěpit fosfát, ale mohou se dále fosforylovat a vstupovat do metabolických dějů podobně jako nukleosidtrifosfáty. Připojením fosfonomethylového uskupení k molekule (*S*)-DHPA tak vznikla první látka nového strukturního typu, 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl-derivátů, zde konkrétně (*S*)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adenin [(*S*)-HPMPA] (obr. 5). (*S*)-HPMPA vykazoval široké spektrum aktivit proti prakticky všem DNA virům, tj. herpesvirům, poxvirům, adenovirům, hepadnavirům a papillomavirům<sup>29</sup>. Navzdory výsledkům protivirotických testů nebyl HPMPA nikdy dále vyvíjen jako

protivirotické léčivo, a to ani proti těm indikacím, kde žádná alternativní možnost léčby nebyla známá, jako je tomu např. u adenovirových infekcí. Jeho objev však inicioval syntézu dalších acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) a v podstatě určil směr nukleosidové chemie v ÚOCHB na příští tři dekády. Při té příležitosti je třeba zmínit úzkou spolupráci Antonína Holého s Ivanem Rosenbergem. Ivan Rosenberg byl Holého první vědecký aspirant. Tématem jeho disertační práce byla příprava fosfonomethylderivátů přirozených ribonukleosidů<sup>30</sup>. Tyto látky sice žádnou biologickou aktivitu neměly, stejně jako jejich analogy v 2'-deoxy řadě<sup>31</sup>, ale byly zde vypracovány základní metodiky fosfonátové chemie. Největším výsledkem spolupráce obou kolegů jsou nové protivirotické struktury ANP, z nichž některé se později staly klinickými léčivými (adefovir, cidofovir). Nedílnou součástí celého týmu a Holého přítelem byl Dr. Ivan Votruba. Ten prováděl nejen veškeré dostupné biochemické eseje, ale též farmakokinetické studie a položil v ÚOCHB základy nového oboru biochemické farmakologie. Antivirotický screening ANP byl nadále prováděn Erikem De Clercqem v Rega Institute for Medical Research Katolické Univerzity v Lovani. Klíčovým partnerem pro klinický vývoj a komercializaci úspěšných kandidátů byl John Martin, generální ředitel firmy Gilead Sciences, Inc.

Prvním acyklickým nukleosidfosfonátem, který dosáhl klinické praxe, byl cidofovir, (*S*)-1-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)cytosin (HPMPC, cidofovir, obr. 5, cit.<sup>32</sup>). Tato látka s univerzální aktivitou proti veškerým DNA virům byla schválena FDA roku 1996 jako léčivo proti cytomegalovirové retinitidě u pacientů s AIDS a prodává se pod názvem Vistide<sup>™</sup> (výrobce Gilead Sciences, Inc.). Kromě toho se používá off-label k léčbě závažných virových infekcí, kde není známa jiná možnost léčby nebo stávající léčba selhává. Mezi takové indikace patří těžké papilomatózy, polyomavírové infekce (progresivní multifokální leukoencefalopatie), adenovirové infekce a poxviróvé infekce (molluscum contagiosum, orf, opičí neštovice)<sup>33</sup>. V odůvodněných případech lze cidofovir také použít i pro imunokompromitované pediatrické pacienty s komplikovanými adeno-, polyoma- nebo cytomegalovirovými infekcemi. Cidofovir se aplikuje intravenózně, přičemž jeho biodostupnost je velmi nízká.



Obr. 4. Acyklovir a protivirotické acyklické analogy nukleosidů syntetizované v ÚOCHB



Obr. 5. Struktury protivirotických acyklických nukleosidfosfonátů a jejich prolékových forem

Více než 90 % léčiva se vylučuje v nezměněné podobě ledvinovou cestou a způsobuje poškození ledvin. Problém s nefrotoxicitou se dá částečně vyřešit použitím nefroprotektivního léčiva probenecidu, který se podává před vlastní aplikací cidofoviru<sup>34</sup>.

Aby se zvýšila biodostupnost cidofoviru, byly syntetizovány a zkoušeny různé formy proléčiv, avšak většina pokusů aplikovat cidofovir v podobě orálně dostupného proléčiva selhala. Jedinou výjimkou byly alkoxyalkylestery, z nichž nejspěšnějším kandidátem byl hexadecyloxypropylester cidofoviru (brincidofovir, obr. 5), vyvíjený firmou Chimerix, Inc. V červnu 2021 byl brincidofovir schválen FDA jako možný prostředek k léčbě pravých neštovic v případě zneužití jejich původce, viru variola, k bioteroristickému útoku nebo v případě jeho náhodného úniku. Brincidofovir se prodává pod komerčním názvem Tembexa<sup>TM</sup>. V klinických zkouškách proti adenovirovým a cytomegalovirovým infekcím dospěl brincidofovir až do fáze 3, avšak jeho další vývoj byl ukončen kvůli vážným vedlejším účinkům<sup>35</sup>.

Dalším léčivem z řad ANP byl 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEa, adefovir, obr. 5, cit.<sup>36,37</sup>). Adefovir je aktivní proti retrovirům (HIV) a některým typům DNA virů. Aktivita proti HIV a viru hepatitidy B spočívá v jeho funkci inhibitoru reverzní transkriptasy. Adefovir se používá v prolékové formě jako bis (pivaloyloxymethyl)ester (adefovir dipivoxil)<sup>38</sup> a původně

byl vyvíjen jako léčivo proti HIV. Klinické testy však ukázaly, že potřebná denní dávka (120 mg) je s ohledem na jeho nefrotoxicitu příliš vysoká a vývoj adefoviru jako anti-HIV preparátu byl proto ukončen. Nicméně se ukázalo, že látka má mnohonásobně vyšší účinnost proti HBV, kde lze dosáhnout požadovaného terapeutického efektu již při denní dávce desetkrát nižší<sup>39,40</sup>, tj. 10 mg. To umožnilo pokračující klinický vývoj adefoviru jako terapeutika proti chronické hepatitidě B a posléze roku 2002 jeho schválení FDA a prodej pod obchodním názvem Hepsera<sup>TM</sup> (Gilead Sciences, Inc.).

Nejspěšnějším ANP a bez pochyby nejslavnější sloučeninou pocházející z ÚOCHB je (*R*)-9-[(2-fosfonomethoxy)propyl]adenin (PMPA, tenofovir, obr. 5). Jeho syntéza byla publikována poprvé roku 1995 v časopisu Collection<sup>41</sup>. O rok později následovala práce popisující jeho mimořádné protivirotické účinky proti hepadnavirům (HBV) a retrovirům<sup>42</sup>, a to na principu inhibice jejich reverzní transkriptasy. Podobné účinky kromě tenofoviru vykazoval také ještě jeho 2,6-diaminopurinový analog (HPMPDAP). Situace kolem HIV/AIDS byla na počátku 90. let nesmírně vážná. V rozvojových zemích, zejména v zemích subsaharské Afriky, začalo šíření viru nabírat katastrofického rozměru. V zemích s vyspělejší zdravotnictvím sice již některé preparáty proti HIV byly k dispozici, avšak léčba spočívala více méně jen v určitém zpomalení infekce. Virus si na tyto látky (převážně nukle-

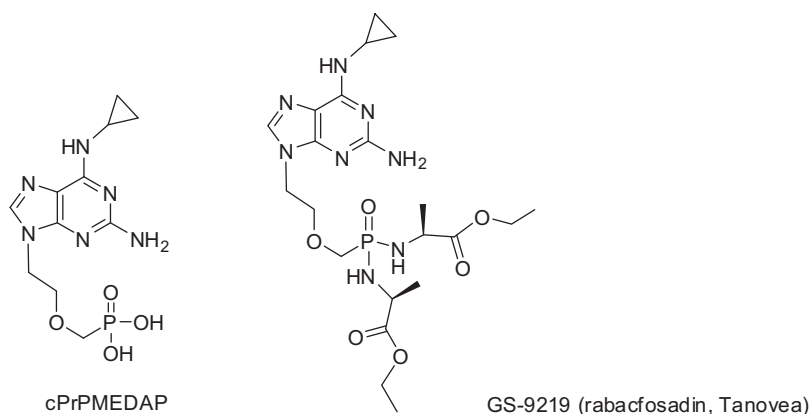
osidové povahy) rychle vytvářel rezistenci. Pacient byl nucen užívat denně až dvacet různých tablet a léčba byla prováděna závažnými vedlejšími účinky. Zvládnutí problému s HIV se stalo prioritou farmaceutického průmyslu. Firma Gilead Sciences, která již měla jeden Holého preparát (Vistide) na trhu a druhý (adefovir) tou dobou v klinickém vývoji, začala po zjištění anti-HIV účinnosti tenofoviru na lidech ihned s jeho klinickým vývojem. Vzhledem k jeho nízké biodostupnosti ve formě volné fosfonové kyseliny bylo přistoupeno k syntéze proléčiva, bis(isopropoxykarbonyloxymethyl)esteru (tenofovir disoproxil-fumarát, TDF, obr. 5). Hlavní zásluha na dotažení tohoto náročného projektu do konce náleží tehdejšímu prezidentovi Gilead Sciences Johnu Martinovi. To celé by však nikdy nebylo možné bez vzájemné souhry a absolutní důvěry všech tří zúčastněných stran, tj. Antonína Holého jakožto autora látky, virologa Erika De Clercq a Johna Martina jako průmyslového partnera. Dramatický průmyslový vývoj látek z Holého laboratoře popisuje geniálním způsobem divadelní hra Petra Zelenky *Elegance molekuly* v podání Dejvického divadla. Historickým mezníkem v boji s HIV se stal 26. říjen 2001, kdy byl tenofovir disoproxil-fumarát schválen FDA pro léčbu HIV. Na trh byl uveden pod názvem Viread a aplikoval se orálně jako jedna tableta denně. Brzy na to Gilead uvedl na trh kombinace Vireadu s dalšími antiretrovirovými léčivy. Jsou to preparáty Atripla (TDF/ emtricitabin/efavirenz), Complera (TDF/ emtricitabin/rilpivirin), Stribild (TDF/ emtricitabin/elvitegravir/cobicistat), a Truvada (TDF/ emtricitabin). Kombinovaná antiretrovirová terapie (cART) je v současné době preferenční léčbou pro naprostou většinu z celkových dnes již 38 milionů HIV pozitivních lidí na světě. Princip cART spočívá v kombinaci několika antiretrovirových léčiv zasahujících několik stadií replikačního cyklu viru současně. Tenofovir jakožto nukleosidový inhibitor reverzní transkriptasy (NRTI) tak může být kombinován s nenukleosidovými inhibitory reverzní transkriptasy (NNRTI), inhibitory virové proteasy, inhibitory vstupu nebo integrasovými inhibitory<sup>43</sup>. Obrovský význam tenofoviru v potlačení šíření HIV infekce bylo

zjištěno, že tato látka funguje též profylakticky. Zabraňuje přenosu HIV z matky na dítě a jeho preventivní užívání dokáže také spolehlivě chránit osoby, které jsou s HIV pozitivními běžně ve styku. To jsou především rodinní příslušníci, partneři nebo zdravotnický personál. Jen díky tenofoviru mohou dnes HIV pozitivní prožívat normální plnohodnotný život a nákaza HIV už definitivně přestala být rozsudkem smrti, ale léčitelným chronickým onemocněním. Je smutným paradoxem, že ke schválení léčebné kombinace TDF s emtricitabinem pro preventivní použití jakožto preparátu Truvada, došlo dne 16. července roku 2012, což je den Holého úmrtí.

V roce 2015 byla firmou Gilead uvedena na trh nová proléková forma tenofoviru – tenofovir alafenamid-fumarát (TAF). Toto proléčivo je představitelem tzv. proTides, aryloxyfosforamidátových derivátů, v nichž amidátovou složku představuje ester aminokyseliny. „ProTides“ jsou ve farmacii častou používanou prolékovou formou, zejména díky optimálním farmakokinetickým vlastnostem a relativně snadné syntéze. TAF má 10krát vyšší účinnost než TDF a na rozdíl od TDF k jeho aktivaci dochází cíleně až v lymfoidních buňkách, což představuje výhodu nižší systémové expozice a tedy i nižší toxicity. TAF se prodává pod komerčním názvem Vemlidy a je též součástí několika preparátů cART jako Genvoya, Odefsey, Descovy, Biktarvy a Symtuza.

Nesmírně důležitý přínos tenofoviru spočívá i v léčbě další závažné virové choroby, a to chronické hepatitidy B. K léčbě HBV byly schváleny obě prolékové formy – tenofovir disoproxil i tenofovir alafenamid<sup>44</sup>.

Dále je třeba zmínit, že kromě oněch tří klinicky úspěšných ANP cidofoviru, adefoviru a tenofoviru byly v Holého týmu během tří dekád systematického výzkumu syntetizovány stovky dalších sloučenin tohoto strukturního motivu. Mnohé z nich jsou účinná antivirotika, ale jsou zde též cytostatika a látky s antiparazitickými účinky nebo imunomodulačními účinky. Před několika lety byla velká pozornost věnována cytostatickým fosfonomethoxyethyl derivátům purinových bazí: guaninu, 2,6-diaminopurinu a N<sup>6</sup>-substituovaným 2,6-diaminopurinům<sup>45</sup>. Jeden z nich,



Obr. 6. Struktura cytostatických fosfonátů cPrPMEDAP a jeho prolékové formy rabacfosadinu (GS-9219, Tanovea)

N<sup>6</sup>-cyklopropyl-2,6-diamino-9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]-purin (cPrPMEDAP, obr. 6) byl dokonce vybrán jako vůdčí struktura a ve formě bis-amidátového prolečiva s ethylesterem L-alaninu vyvíjen firmou Gilead Sciences jako cytostatikum k léčbě Non-Hodgkinových lymfomů. Jeho vysoká účinnost v *in vivo* testech a dobrá snášenlivost záhy vedly k zahájení klinických zkoušek na lidských pacientech. U testů na psech stačila jedna jediná injekce látky a nádory zmizely do několika dnů. Výsledky měly tehdy značný ohlas i ve sdělovacích prostředcích i tím pádem též u laické veřejnosti. O to větší zklamání bylo, když se u lidských pacientů objevily nečekané a zcela neakceptovatelné vedlejší účinky a klinické zkoušky musely být ukončeny. Nicméně, osud této látky byl nakonec přece jen úspěšný. Licenci odkoupila firma na veterinární léčiva VetDC v Coloradu, kde byla látka vyvíjena jako léčivo proti psím lymfomům pod označením (VDC-1101, rabacfosadin). V dubnu 2017 byl rabacfosadin oficiálně schválen FDA a v současné době je vyráběn a prodáván firmou Elanco pod názvem Tanovea<sup>TM</sup>. Celý tento pozoruhodný příběh nedávno zpracoval ve svém review<sup>46</sup> Erik De Clercq.

Jakým směrem pokračovala nukleosidová chemie v ÚOCHB po smrti Anonína Holého a jaké jsou současné trendy v medicíně chemii ANP?

Jak již bylo zmíněno, ANP nejsou jen virostatika a cytostatika. Velká pozornost je věnována novým strukturám účinným proti parazitům. Ve spolupráci s Univerzitou v Queenslandu již několik let úspěšně vyvíjíme ANP jako potenciální antimalarika. Princip účinku spočívá v inhibici enzymů 6-oxopurin fosforibosyltransferas původců malárie parazitů *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium vivax*. Jedná se o enzymy, které hrají zásadní roli v životním cyklu těchto parazitů při syntéze purinů *de novo*<sup>47,48</sup>. Hlavní zásluhu na rozvoji této tematiky měla Dr. Dana Hocková (1970–2021) a v současné době výzkum stále probíhá v týmu Dr. Zlatka Janeby. Z dalších parazitů je cíleno na parazity *Trypanosoma brucei* (původce spavé nemoci). Nesmírně důležitý je vývoj nových ANP derivátů proti těžkým bakteriálním infekcím, kde se ANP uplatňují např. jako inhibitory adenylácyklosóvého toxinu bakterie *Bordetella pertussis* (původce černého kašle), nebo jako látky potenciálně účinné proti antraxu (bakterie *Bacillus anthracis*)<sup>49</sup>.

Je třeba si připomínat, že navzdory veškerému pokroku v moderní medicíně potřeba nových biologicky aktivních molekul stále trvá. Důvodem jsou nově se objevující infekce, rezistence mnohých patogenů vůči stávající léčbě a narůstající počet pacientů s imunitními problémy. Mnohé nukleosidové analogy včetně ANP s vysokou aktivitou proti vážným, život ohrožujícím infekcím dosud čekají na svůj další vývoj a klinické využití. Stále např. chybí efektivní léčba cytomegalovirových a polyomavirových infekcí u imunokompromitovaných pacientů, léčba poxvirových infekcí a některých specifických herpesvirových infekcí (např. lidský herpesvirus typu 6, HHV-6). To vše opodstatňuje náš další výzkum, kterým se aktuálně zabýváme a budeme se zabývat i nadále.

Vypracováno s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu Český národní uzel Evropské infrastruktury pro translační medicínu EATRIS-CZ, grant č. LM2023053.

#### Seznam zkratek

AC	5-azacytidin (5-azacytidine)
ANP	acyklické nukleosidfosfonáty (acyclic nucleoside phosphonates)
cART	kombinovaná antiretrovirová terapie (combination antiretroviral therapy)
DAC	decitabin (decitabine)
DHPA	(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin
DMT	DNA methyltransferasa (DNA methyltransferase)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
HBV	virus hepatitidy B (hepatitis B virus)
HCMV	lidský cytomegalovirus (human cytomegalovirus)
HHV-6	lidský herpesvirus typu 6 (human herpes virus type 6)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HPMP	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]
HPMP-5-azaC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]-5-azacytosin
HPMPC	(S)-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)-propyl]cytosin
HSV-1	herpes simplex virus typu 1 (herpes simplex virus type 1)
HSV-2	herpes simplex virus typu 2 (herpes simplex virus type 2)
PME	(fosfonomethoxy)ethyl ((phosphonomethoxy)ethyl)
PMP	(fosfonomethoxy)propyl ((phosphonomethoxy)propyl)
TAF	tenofovir alafenamid (tenofovir alafenamide)
TDF	tenofovir disoproxil-fumarát (tenofovir disoproxil fumarate)
VZV	Varicella zoster virus

#### LITERATURA

1. Watson J. D., Crick F. H. C.: *Nature* 171, 737 (1953).
2. Smrt J., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 27, 73 (1962).
3. Rosenberg I.: *Chem. Listy* 108, 375 (2014).
4. Šorm F., Škoda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 21, 487 (1956).
5. Deneau D. G., Farber E. M.: *Dermatologica* 151, 158 (1975).
6. Krečmerová M.: *Chem. Listy* 116, 152 (2022).
7. Pískala A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*

- 29, 2060 (1964).
8. Vrtiška O.: *Vesmír* 97, 598 (2018).
  9. Jones P. A., Taylor S. M.: *Nucleic Acids Res.* 9, 2933 (1981).
  10. Yang X., Lay F., Han H., Jones P. A.: *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 536 (2010).
  11. Arnold Z., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 40 (1965).
  12. Arnold Z., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 47 (1965).
  13. Holý A., Arnold Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 53 (1965).
  14. Acton E. M., Ryan K. J., Goodman L.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5353 (1964).
  15. Shimizu B., Saito A., Nishimura T., Miyaki M.: *Chem. Pharm. Bull.* 15, 2011 (1967).
  16. Holý A., Šorm F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 34, 3383 (1969).
  17. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 37, 4072 (1972).
  18. Mathé C., Gosselin G.: *Antiviral Res.* 71, 276 (2006).
  19. Brokeš J., Beránek J., Hřebabeký H.: *Method of Preparation of the 1-β-D-arabinofuranosylcytosine.* Patent No. CS212052 B1 (1982).
  20. Fyfe J. A., Keller P. M., Furman P. A., Miller R. L., Elion G. B.: *J. Biol. Chem.* 253, 8721 (1978).
  21. Kent R., Huber B.: *Nature* 398, 380 (1999).
  22. De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 33, 1278 (2013).
  23. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 5 (2006).
  24. De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Holý A.: *Science* 200, 563 (1978).
  25. Votruba I., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45, 3039 (1980).
  26. Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 2148 (1984).
  27. Votruba I., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 167 (1982).
  28. De Clercq E., Holý A.: *J. Med. Chem.* 28, 282 (1985).
  29. De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
  30. Holý A., Rosenberg I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 3447 (1982).
  31. Krečmerová M., Hřebabeký H., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 55, 2521 (1990).
  32. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels, J., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A.: *Antiviral Res.* 8, 261 (1987).
  33. De Clercq E.: *Med. Res. Rev.* 28, 929 (2008).
  34. Wolf D. L., Rodriguez C. A., Mucci M., Ingrosso A., Duncan B. A., Nickens D. J. J.: *Clin. Pharmacol.* 43, 41 (2003).
  35. Huston J., Curtis S., Egelund E. F.: *Ann. Pharmacother.* 57, 1197 (2023).
  36. Holý A., Rosenberg I., Dvořáková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54, 2190 (1989).
  37. Holý A.: *Curr. Pharm. Design* 9, 2567 (2003).
  38. Starrett J. E. Jr., Tortolani D. R., Hitchcock M. J., Martin J. C., Mansuri M. M.: *Antiviral Res.* 19, 267 (1992).
  39. Fontaine H. a 10 spoluautorů: *Transplantation* 80, 1086 (2005).
  40. de Fraga R. S., Van Vaisberg V., Mendes L. C. A., Carrilho F. J., Ono S. K.: *J. Gastroenterol.* 55, 496 (2020).
  41. Holý A., Dvořáková H., Masojídková M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 1390 (1995).
  42. Balzarini J., Aquaro S., Perno C. F., Witvrouw M., Holý A., De Clercq E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 337 (1996).
  43. Weichseldorfer M., Reitz M., Latinovic O. S.: *Pharmaceuticals* 13, 1798 (2021).
  44. de Fraga R. S., Van Vaisberg V., Mendes L. C. A., Carrilho F. J., Ono S. K.: *Gastroenterol.* 55, 496 (2020).
  45. Holý A., Votruba I., Tloušťová E., Masojídková M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 1545 (2001).
  46. De Clercq E.: *Biochem. Pharmacol.* 154, 265 (2018).
  47. Keough D. T. a 11 spoluautorů.: *J. Med. Chem.* 56, 6967 (2013).
  48. Keough D. T. a 12 spoluautorů.: *ACS Chem. Biol.* 13, 82 (2018).
  49. Kraina P., Česnek M., Tloušťová E., Mertlíková-Kaiserová, Fulton C. J., Davidson E. K., Smith B. P., Watts V. J., Janeba Z.: *Bioorg. Med. Chem.* 95, 117508 (2023).

**M. Krečmerová** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Nucleoside Chemistry at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry – Looking Back on History**

Nucleoside chemistry has been developing at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (IOCB) since 1957 thanks to the foresight of its first director František Šorm. This new area, targeted especially to oligonucleotide synthesis, earned soon an excellent reputation. At that time IOCB was one of only four institutions in the world successful in oligonucleotide synthesis. First successes in the field of chemically modified nucleosides were syntheses of 6-azauridine as antileukemic agent, 6-azauridine triacetate investigated as antipsoriatic drug (Riboazauracil) and especially 5-azacytosine nucleosides, i.e., 5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine) synthesized in early 1960s by Alois Pískala. Both compounds are antileukemic agents working on the epigenetic principle as inhibitors of DNA methylations. At present, they are clinically used for the treatment of myelodysplastic syndromes and other haematological malignancies, marketed under the names Vidaza® (5-azacytidine, approved 2004) and Dacogen® (5-aza-2'-deoxycytidine, 2006). Remarkable synthetic achievements are connected with the personality of Antonín Holý including syntheses of L-nucleosides or acyclic nucleoside analogues, compounds having a sugar furanose ring replaced by a (poly)hydroxylic carbon chain.

Many of them were found effective antivirals. One of them, 9-(*S*)-[(2,3-dihydroxypropyl)]adenine entered to clinical practice as antiherpetic drug Duvira gel. However, it was the development of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs), first reported by Holý and De Clercq in 1986, that became a real milestone. During next three decades a number of biologically active ANPs were identified as antivirals, cytostatics, immunomodulators and antiparasitics. Three of them reached the stage of clinical practice as successful antivirals: cidofovir for the treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients, tenofovir for the treatment and prevention of HIV (later

approved also for the treatment of hepatitis B), and adefovir for the treatment of hepatitis B. Tenofovir in the form of prodrugs is mostly used as a part of several combined anti-HIV therapeutics containing various anti-HIV drugs in all-in-one pill and is currently the most successful anti-HIV drug available.

Keywords: 6-azauracil, 5-azacytidine, decitabine, antimetabolites, L-nucleosides, acyclic analogues, DHPA, acyclic nucleoside phosphonates, cidofovir, adefovir, antivirals, HIV, tenofovir, combined antiretroviral therapy, antiparasitics



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.

## IGF2: OPOMÍJENÝ HORMON Z RODINY INZULINU S VÝZNAMNÝM TERAPEUTICKÝM POTENCIÁLEM

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

TEREZA TURNOVSKÁ, JIŘÍ JIRÁČEK a LENKA ŽÁKOVÁ

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

Inzulinu podobný růstový faktor 2 patří, spolu s několika dalšími inzulinu podobnými peptidy, do evolučně konzervované rodiny signálních molekul, které jsou nezbytné pro normální buněčnou proliferaci a vývoj mozku. Dřívější studie se zaměřovaly převážně na jeho úlohu v embryonálním vývoji a kancerogenezi. V posledních letech byly odhaleny nové poznatky týkající se role inzulinu podobného růstového faktoru 2 v centrální nervové soustavě, zejména jeho význam pro učení, konsolidaci paměti a zlepšení kognitivních funkcí. I přes stále ne zcela prozkoumanou fyziologickou roli inzulinu podobného růstového faktoru 2 se v našem článku snažíme podrobněji popsat a vysvětlit jeho známé funkce a diskutovat jeho potenciální využití, včetně možné aplikace v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

**Klíčová slova:** IGF2, inzulin, inzulinový receptor, IGF2 receptor, kancerogeneze, neurodegenerativní choroby, embryogeneze

### Obsah

1. Úvod
2. Inzulinu podobný růstový faktor 2 (IGF2)
  - 2.1. Vazební partneři IGF2
  - 2.2. Fyziologické funkce IGF2
    - 2.2.1. Fyziologický význam v růstu a vývoji
    - 2.2.2. IGF2 a kancerogeneze
    - 2.2.3. IGF2 v nervové soustavě
  - 2.3. Analogy IGF2
3. Závěr

### 1. Úvod

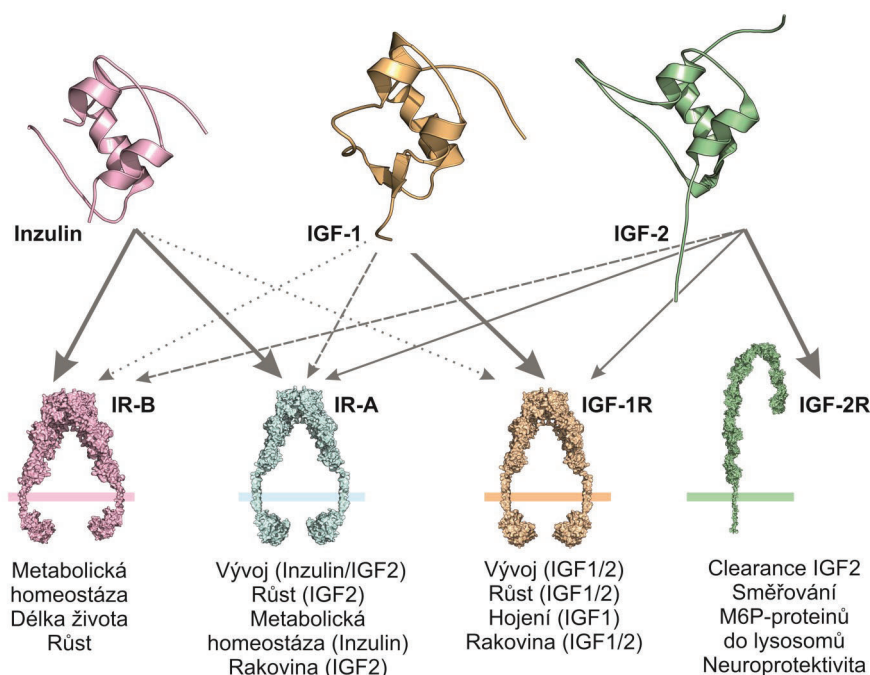
Inzulinu podobný růstový faktor 2 (IGF2) patří, společně se svými známějšími „kolegy“, inzulinem a inzulinu podobným růstovým faktorem 1 (IGF1), do rodiny inzulinu podobných hormonů, tzv. inzulinové rodiny. Tato rodina obsahuje kromě již zmíněných peptidů tři relaxiny (H1–H3) a čtyři inzulinu podobné peptidy (INSL3–INSL6)<sup>1</sup>. I přes jejich rozdílné fyziologické funkce a poměrně nízkou sekvenční homologii si tyto peptidy zachovávají velmi podobnou terciární strukturu, na které má největší podíl zejména přítomnost šesti cysteinů v konzervovaných pozicích tvořících tři stabilizující disulfidové můstky<sup>1</sup>.

Vzájemná strukturní podobnost inzulinu, IGF1 a IGF2 zajišťuje schopnost těchto molekul vázat se nejen na své primární receptory, ale i na receptory ostatních členů inzulinové rodiny peptidů. Těmito receptory jsou tři receptoro-

vé tyrosinkinasy, konkrétně dvě izoformy inzulinového receptoru (IR-A a IR-B) a receptor pro IGF1 (IGF1R), a strukturně zcela odlišný receptor pro IGF2 (IGF2R) (obr. 1). Například inzulin se kromě svých primárních receptorů IR-A a IR-B váže, i když slaběji, i na IGF1R. Obdobně je IGF1 schopen vázat se nejen na IGF1R, ale i na IR-A. IGF2 se váže primárně na IGF2R, stejně tak má ale poměrně vysokou afinitu k IR-A a IGF1R. Naopak na IGF2R se IGF1 váže jen minimálně a inzulin vůbec. IGF2, jehož množství je v dospělém organismu několikanásobně vyšší než množství ostatních inzulinu podobných peptidů, interaguje tedy s několika různými receptory, v důsledku čehož má tento peptid široké spektrum fyziologických účinků. Hraje roli zejména v prenatálním vývoji a růstu organismu, z patologických stavů je významným faktorem ve vzniku a progresi některých druhů rakovinného bujení a v poslední době se velmi diskutuje jeho role v centrální nervové soustavě.

### 2. Inzulinu podobný růstový faktor 2 (IGF2)

Produkce IGF2 v buňce je složitý proces regulovaný velmi komplexními, komplikovanými procesy. Vzhledem ke zmíněným fyziologickým účinkům tohoto peptidu vede její deregulace často ke vzniku závažných onemocnění. Poruchy exprese *Igf2* jsou často pozorovány například v nádorových tkáních závislých na IGF2. I proto lze předpokládat, že produkce IGF2 vyžaduje přísnou kontrolu. Obecný mechanismus této regulace produkce IGF2 je



Obr. 1. **Inzulín/IGF systém.** Síla jednotlivých interakcí mezi hormony a jejich receptory je vyjádřena silou a přerušováním jednotlivých šipek

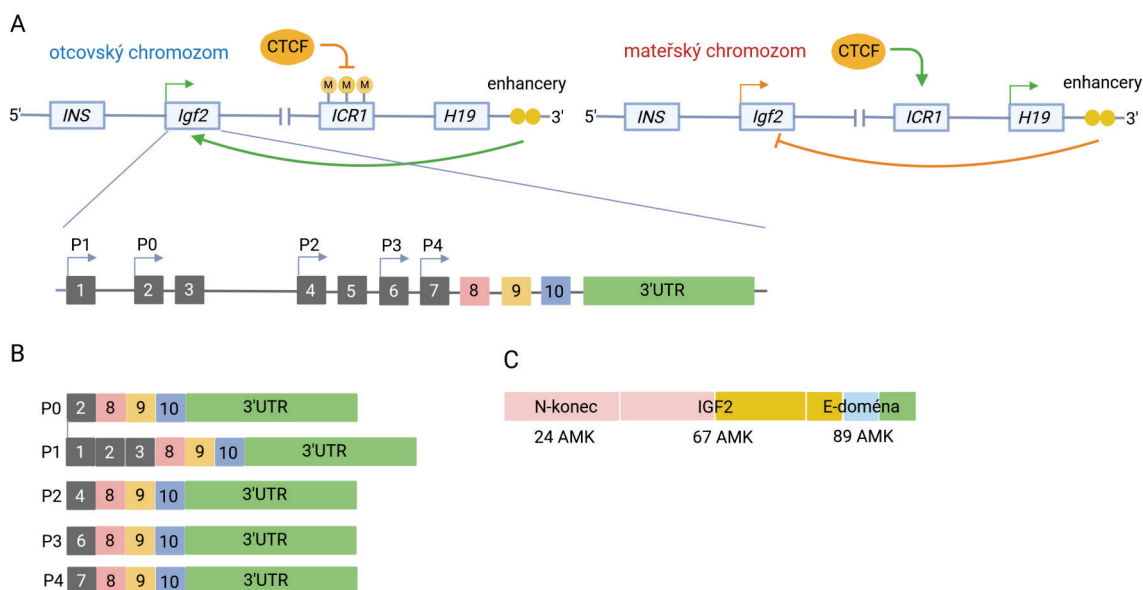
následovný. Gen *Igf2* o velikosti 30 kbp společně s genem pro inzulín (*Ins*) a neproteinogenním genem *H19* leží na krátkém raménku chromozomu 11 (11p15.5) (obr. 2A)<sup>2</sup>. Obsahuje 10 exonů a 5 promotorů, ze kterých probíhá transkripce. Vzniká tak 5 různých pre-RNA, všechny však obsahují 3'UTR, netranslatovanou část, tedy sekvenci, ze které nevzniká protein, a exony 8, 9 a 10, které kódují prekurzory IGF2 (obr. 2B)<sup>3</sup>. Aktivita jednotlivých promotorů závisí na typu tkáně a vývojovém stádiu jedince<sup>4</sup>.

Expresí genu *Igf2* je monoalelická (probíhá pouze z otcovské alely chromozomu) a úzce souvisí s expresí zmíněného genu *H19*. Ten je rovněž exprimován pouze z jedné alely, tentokrát však z mateřské. Tento způsob regulace genové exprese je označován genomový imprinting<sup>3,5</sup>. Genomový imprinting využívá methylace různých oblastí genů, která ovlivňuje vazbu zesilovače (enhanceru) a dalších DNA-vazebných proteinů. V případě *Igf2* je na otcovském chromozomu methylována oblast ICR1 (imprinting control region 1) ležící mezi *Igf2* a *H19*. Tato methylace znemožňuje vazbu proteinu transkripčního faktoru CTCF (CTCF), který tak nebrání vazbě zesilovačů a exprese genu *Igf2* probíhá<sup>6</sup>. Změna konformace chromatinu při vazbě zesilovačů na promotory *Igf2* zároveň znemožňuje expresi *H19*. V případě mateřského chromozomu je tomu naopak. Oblast ICR1 není methylována, nasedá na ni tedy protein CTCF, který brání vazbě zesilovačů a potlačuje tak expresi genu *Igf2*. Zároveň se nemění konformace chromatinu, čímž je umožněna exprese genu *H19* (obr. 2A)<sup>3,5</sup>.

Translací mRNA vzniká 180 aminokyselin dlouhý prekurzor IGF2 (pre-pro-IGF2) složený z N-koncové signální sekvence a domén B, C, A, D, E (cit.<sup>3,7</sup>). V endoplazmatickém retikulu je odštěpen N-konec, vzniká tak 156 aminokyselin dlouhý pro-IGF2 (obr. 2C). Doména E pro-IGF2 je dále glykosylována v Golgiho aparátu a pro-protein konvertasa 4 (PC4) katalyzuje štěpení peptidových vazeb za aminokyselinami v pozicích 67, 87 a 104 (cit.<sup>8</sup>). Vzniká tedy maturovaný 67 aminokyselin dlouhý IGF2 a dvě delší formy IGF2, souhrnně nazývané jako big-IGF2. Maturovaný IGF2 je následně sekretován do krve, kde cirkuluje v koncentraci asi 700 ng ml<sup>-1</sup> a je v naprosté většině vázán na vazebné proteiny pro IGF (IGFBP)<sup>9</sup>.

Terciární struktura maturovaného IGF2 byla původně odhadnuta na základě struktury inzulínu. Poprvé byla upřesněna v roce 1994 pomocí NMR (cit.<sup>10</sup>) (obr. 3). Byla potvrzena přítomnost 4 domén (B, C, A, D) (obr. 4). Doména B zahrnuje prvních 32 aminokyselin N-koncové části peptidu. S řetězcem B inzulínu sdílí 50% sekvenční homologii. Doména C hormonu IGF2 navazuje na doménu B (aminokyseliny 33–40), a je obdobou C-peptidu proinzulínu, který se ale v inzulínu finálně vyštěpuje. Obdobou řetězce A inzulínu je pak ve struktuře IGF2 doména A, kterou tvoří aminokyseliny 41–61. Doména D (aminokyseliny 62–67) vytváří C-konec peptidu. Stejně jako molekula inzulínu, i IGF2 obsahuje 3 disulfidové můstky, konkrétně mezi cysteiny v pozicích 9–47, 21–60 a 46–51. Strukturu dále stabilizují tři  $\alpha$ -helixy. Dva se nacházejí v doméně A (Glu44-Arg49, Leu53-Tyr59), kde jsou vůči sobě





Obr. 2. **Regulace exprese *Igf2* genu.** A) Uspořádání genů na krátkém raménku chromozomu 11 (11p15.5) a mechanismus regulace exprese *Igf2* – genomový imprinting. *INS* – gen pro inzulin, *Igf2* – gen pro inzulinu podobný růstový faktor 2, *ICR1* – kontrolní oblast imprintingu – na otcovském chromozomu methylovaná (M), na mateřském chromozomu bez methylace, *H19* – neproteinogenní gen, CTCF – DNA vazebný protein, P0–P4 – promotory genu *Igf2*, černé boxy 1–7 – nekódující introny genu *Igf2*, barevné boxy 8, 9, 10 – exony kódující prekurzory IGF2, 3'UTR – netranslatovaná část *Igf2*; B) Transkripty (mRNA) vznikající přepisem *Igf2*; C) Translací vznikající prekurzor IGF2 – 180 aminokyselin dlouhý pre-pro-IGF2

v antiparalelním uspořádání, jeden je pak v doméně B (Glu12-Cys21).

### 2.1. Vazební partneři IGF2

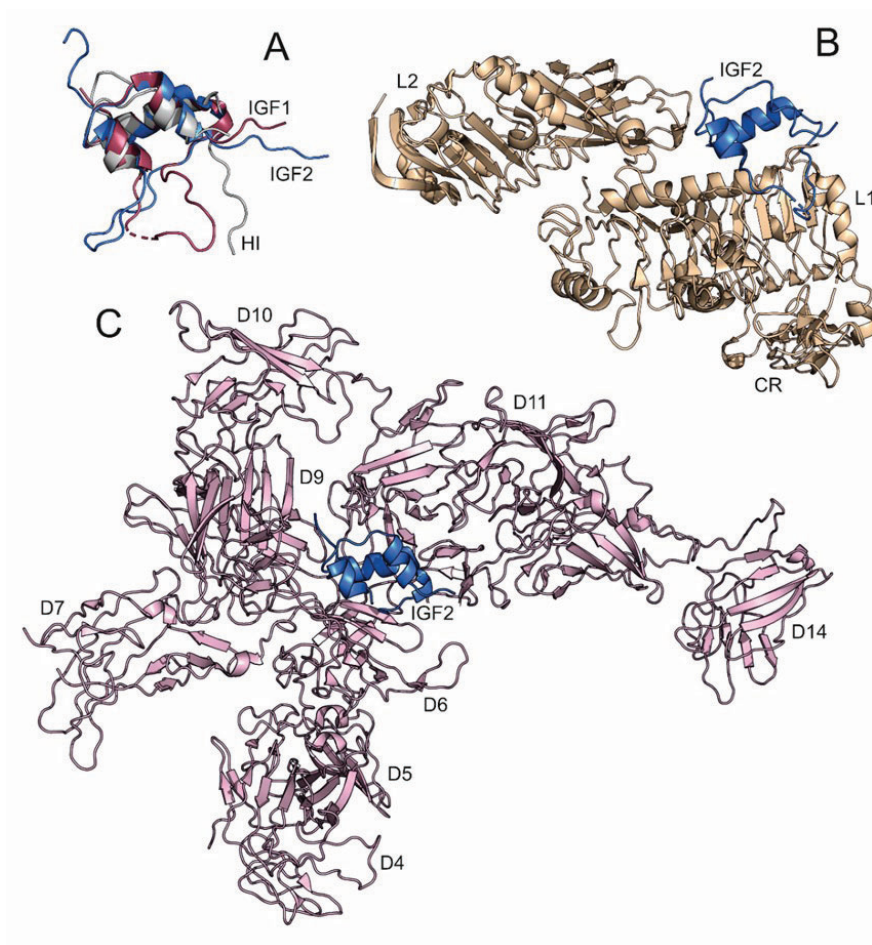
Jak již bylo řečeno, strukturní podobnost IGF2 s inzulinem a IGF1 umožňuje jeho vazbu na různé receptory inzulinu a inzulinu podobných peptidů. Díky tomu dokáže ovlivňovat různé fyziologické procesy (obr. 1). Jak jeho název napovídá, jednou z jeho hlavních funkcí je regulace růstu a vývoje tkání. Předpokládá se, že je tato jeho funkce zprostředkována prostřednictvím IGF1R, případně IR-A (cit.<sup>11</sup>). Oba tyto transmembránové receptory se vyskytují na povrchu téměř všech buněk v organismu. Na IR-B se IGF2 váže poměrně slabě. Důvodem této slabé vazby je přítomnost 12 aminokyselin pocházejících z exonu 11 genu pro inzulinový receptor. Tyto aminokyseliny jsou přítomny pouze v případě IR-B, u IR-A chybí<sup>12</sup>.

Všechny tyto receptory (IR-A, IR-B i IGF1R) jsou 2( $\alpha\beta$ ) homodimery s extracelulárními doménami zaujímavými v apo-formě antiparalelní tvar písmene  $\Lambda$  (obr. 5A). Každý homodimer je složen ze dvou monomerů, přičemž každý monomer je tvořen extracelulárním  $\alpha$ -řetězcem (130–135 kDa) a transmembránovým  $\beta$ -řetězcem (90–97 kDa).  $\alpha$ -řetězec tvoří domény L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 a  $\alpha$ -CT,  $\beta$ -řetězec je tvořen doménami FnIII-2, FnIII-3 a transmembránovou a kinasovou doménou (obr. 5A, B).

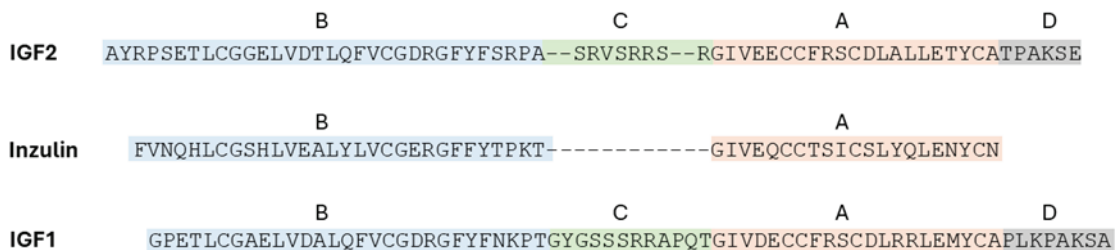
Monomerní jednotky homodimerů jsou vzájemně propojené disulfidovými můstky tvořenými cysteinovými rezidui extracelulárních  $\alpha$ -řetězců. Receptor tak vytváří dvě ekvivalentní vazebná místa. Po obsazení i jen jednoho z nich ligandem dochází k rozsáhlé změně konformace receptoru a následně k autofosforylaci tyrosinových zbytků na tyrosinkinasové doméně receptoru uvnitř buňky (obr. 5B)<sup>13</sup>. Jemné rozdíly v mechanismu vazby jednotlivých ligandů s jednotlivými receptory spouští rozdílné nitrobuněčné odpovědi vedoucí k odlišným biologickým efektům (obr. 1).

Roku 2013 byla publikována první struktura komplexu inzulinu se zkrácenou formou IR-A (cit.<sup>14</sup>). Od té doby bylo publikováno mnoho struktur komplexů inzulinu nebo IGF1 s jejich příslušnými receptory v různých rozlišeních<sup>15–18</sup>. V roce 2020 byla publikována struktura komplexu IGF2 s receptorem IGF1R v rozlišení 3,2 Å (cit.<sup>19</sup>), která odhalila, že vazebná místa na IGF1R pro IGF2 jsou velmi podobná vazebným místům, která se účastní interakcí inzulin:IR a IGF1:IGF1R (cit.<sup>13,16,20</sup>).

Receptorem zodpovědným za kontrolu hladiny volného IGF2 v krevním řečišti je zejména IGF2R. Je to asi 300 kDa velký transmembránový glykoprotein patřící do lektinové rodiny typu P (cit.<sup>21</sup>) (obr. 5C). Tento receptor, nazývaný také kation-nezávislý manosa-6-fosfátový receptor, je cílovým receptorem rovněž některých 6-fosfomannosylovaných proteinů (nejčastěji lysosomálních en-



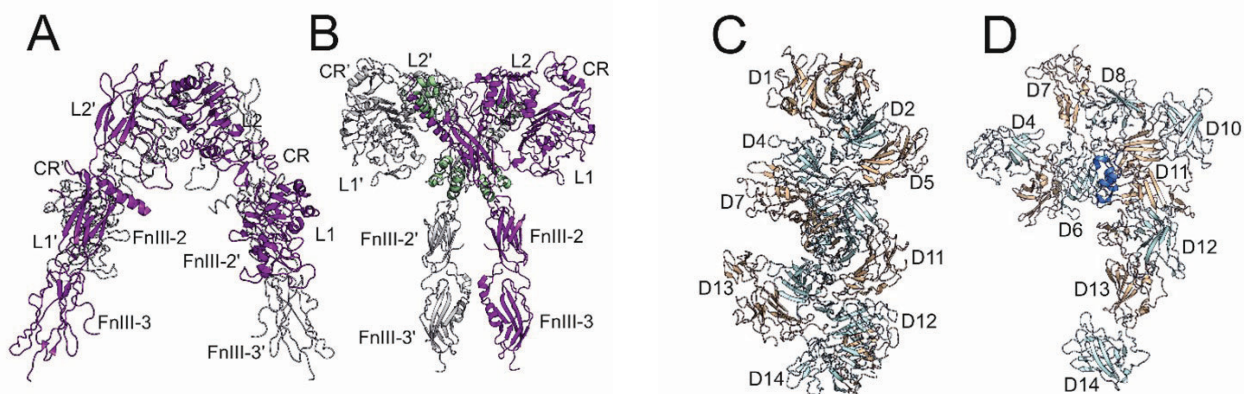
Obr. 3. Terciární struktury inzulínu, IGF1 a IGF2. (A) Překryv terciárních struktur lidského inzulínu (HI) (bílá, PDB 6SOF), IGF1 (tmavě růžová, PDB 1GZR) a IGF2 (modrá, PDB 1IGL); (B) IGF2 v komplexu s částí IGF1R (PDB 6VWI) (L1, L2 – domény bohaté na leucin, CR – doména bohatá na cystein); (C) IGF2 v komplexu s částí M6P/IGF2R (PDB 6UM2) (D4–D14 – domény 4–14 M6P/IGF2R)



Obr. 4. Primární struktura IGF2, inzulínu a IGF1. Označení, uspořádání a vzájemné porovnání jednotlivých domén

zymů). Vazbu ligandů zajišťuje 15 homologních extracelulárních domén (každá o 124–192 aminokyselinách) s 14–28 % sekvenční identitou. Domény 3, 5, 9 a 15 jsou zodpovědné za vazbu mannosylovaných glykoproteinů, doména 11 s přispěním domény 13 váže IGF2 (obr. 5D). Receptor navádí jak lysosomální enzymy (z trans-Golgiho aparátu), tak IGF2 (z buněčného povrchu) do endosomů

a lysosomů. Uvádí se, že pouze 5–10 % z celkového množství IGF2R se nachází na buněčném povrchu, zbytek cirkuluje uvnitř buněk mezi trans-Golgiho aparátem a endosomy<sup>22</sup>. Jinými slovy, receptor je s navázaným ligandem internalizován a přes časné a pozdní endosomy dopravuje ligand až do lysosomů, kde je tato molekula degradována (případ IGF2) či vykonává svou proteolytic-



Obr. 5. **Struktura inzulínového receptoru.** (A) Schématické znázornění apo-formy inzulínového receptoru (PDB 3LOH). Každý z protomerů receptoru je vyznačen jinou barvou (L1, L2 – domény bohaté na leucin, CR – doména bohatá na cystein, FnIII – doména tvořená fibronektinem typu III); (B) Aktivovaná forma IR receptoru (PDB 6PXV). Navázané molekuly inzulínu jsou vyznačeny zeleně; (C) Apo-forma IGF2R (PDB 6UM1); (D) IGF2R s navázaným IGF2 (modře) (PDB 6UM2) (D1–D14 – domény 1–14 M6P/IGF2R)

kou funkci (případ lysosomálních enzymů)<sup>23</sup>. Samotný IGF2R je recyklován a z pozdních endosomů se vrací na buněčnou membránu či do trans-Golgiho aparátu.

Dosud bylo uveřejněno poměrně velké množství struktur různě velkých konstruktů IGF2R bez ligandu nebo s navázaným IGF2 (cit.<sup>21,24,25</sup>). V roce 2020 byla publikována studie cryo-EM struktury apo-formy IGF2R (domény 4–14) i IGF2R s navázaným IGF2 (obr. 5C, 5D)<sup>26</sup>. IGF2R je také schopen tvořit v plazmatické membráně dimery<sup>27</sup> a tato dimerizace může dopomáhat ke stabilizaci domény 11 s navázaným IGF2 navíc ještě s přispěním fibronektinové domény 13 (cit.<sup>28</sup>).

Přesto, že IGF2R postrádá katalytickou intracelulární doménu s kinasovou aktivitou, je podle některých starších výzkumů schopen prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) přímým nebo nepřímým způsobem iniciovat signalizaci a ovlivňovat fosforylaci proteinů zapojených do GPCR signální kaskády<sup>29</sup>. V současné době je velmi intenzivně diskutována role IGF2R v centrální nervové soustavě (viz kapitola Fyziologické funkce IGF2).

Působení IGF2 a jeho biodostupnost jsou precizně regulovány jeho interakcí s rozpustnými IGF vazebnými proteiny (IGFBP). IGF vazebné proteiny udržují IGF2 v cirkulaci a dopravují ho k cílovým tkáním<sup>9</sup>. Dosud bylo identifikováno šest vazebných proteinů. Vazbou na některý z nich je významně prodloužen biologický poločas IGF2. Relativní afinita IGF2 k jednotlivým IGFBP je různá, ale je vyšší než afinita IGF2 k IGF1R (cit.<sup>9,30</sup>). IGF2 ve vazbě na IGFBP3 a IGFBP5 může navíc tvořit mnohem větší ternární komplex s proteinem ALS (tzv. kyselou labilní podjednotkou – z angl. acide labile subunit). Tím je mnohonásobně zvýšena stabilita komplexu a prodloužen jeho biologický poločas. Odhaduje se, že volný IGF2 má biologický poločas v krevní plazmě 5–10 minut, v binárním komplexu s IGFBP kolem 30 minut a v ternárním komplexu s ALS až 16–20 hodin.

## 2.2. Fyziologické funkce IGF2

Zásadní roli v organismu hraje IGF2 při regulaci fetálního růstu a diferenciaci. Jeho role v dospělém organismu je už méně zřejmá, avšak na rozdíl například od hloдавců je IGF2 v lidském těle produkován během celého života, a to v mnohem vyšších koncentracích než inzulín a IGF1. Jeho hladina je striktně regulována na úrovni exprese genu i na úrovni biodostupnosti pro vazbu na receptory, což naznačuje jeho významnou funkci v lidské fyziologii. Je prokázáno, že IGF2 dokáže ovlivňovat svalovou a tukovou tkáň, kosti, vaječníky a v některých částech mozku také neurogenezi<sup>31</sup>. Pozměněná exprese genu pro IGF2 se může projevit patologickými stavy, jakými jsou například obezita, diabetes, syndrom polycystických ovarií (PCOS), nemoci jater, rakovina či poruchy kognitivních funkcí. O nejvýznamnějších fyziologických funkcích se zmíníme v následujících kapitolách.

### 2.2.1. Fyziologický význam v růstu a vývoji

Oba IGF jsou společně s jejich membránovými receptory a IGF vazebnými proteiny klíčovými komponenty komplexního systému, který reguluje růst. Společně s růstovým hormonem jsou schopny fungovat jak v endokrinním, tak parakrinním či autokrinním módu. Jejich hladiny jsou přesně regulovány v prenatálním věku, v dětství, i v dospělosti. IGF1 reguluje růst od prenatálního období až do dospívání<sup>32</sup>, naproti tomu IGF2 hraje zásadní roli v růstu ve fetálním věku a později už růst těla ovlivňuje podle současných poznatků relativně málo, což je v kontrastu s jeho vysokými hladinami v dospělosti. I když je IGF2 syntetizován téměř ve všech orgánech, nejvíce se ho tvoří ve slinivce plodu a játrech v jakémkoliv věku<sup>33</sup>. Růstová funkce IGF2 je zprostředkována nejvíce IGF1 receptorem, významnou roli však hraje i jeho vazba na IR-A (cit.<sup>11</sup>).

Aktivace IR-A působením IGF2 byla prokázána například při podpoře obnovy nervových kmenových buněk. Tato aktivace vede k expanzi nervových progenitorových buněk. Pozitivní vliv na obnovu kmenových buněk byl pozorován i na jiných tkáních, například u střevních nebo svalových kmenových buněk<sup>34,35</sup>. IGF2 navíc dokáže ovlivňovat diferenciaci adipocytů, příjem glukosy buňkami a také inzulinovou sekreci<sup>36</sup>.

Jakákoliv deregulace exprese *Igf2* vede k růstovým chorobám, jako je třeba Beckwithův-Wiedemannův syndrom (BWS), způsobený ztrátou genomového imprintingu genu *Igf2* nebo Silverův-Russelův syndrom způsobený ztrátou genomového imprintingu vedlejšího genu *H19*. Navíc jsou tyto dvě choroby spojeny s vyšším výskytem dětských tumorů, jako je například Ewingův sarkom nebo Wilmsův tumor<sup>37</sup>.

Důležité informace o roli IGF2, ale i IGF2R, poskytly zvířecí modely s deletovanými příslušnými geny<sup>38</sup>. Vyřazení genu *Igf2* snížilo životaschopnost myších mláďat, ale způsobilo jejich menší velikost (asi 60 %) oproti kontrolním myším. Delece *Igf2r* naproti tomu způsobila větší velikost (asi 140 % velikosti normálních jedinců), životaschopnost mláďat byla ale drasticky snížena a jen velmi málo z nich přežilo, a pokud ano, tak s růstovými deformacemi. Zajímavé bylo, že současná delece obou genů, *Igf2* a *Igf2r*, vedla k normálnímu přežití myši a ke zmenšení jejich velikosti (asi na 75 %). Z výsledků se dá usoudit, že růstové efekty IGF2 při vývoji embrya jsou zprostředkovány aktivací IGF1R a IR-A a ne IGF2R. IGF2R ale váže a blokuje podstatnou část IGF2 a pokud IGF2R chybí, příliš vysoká hladina IGF2 a jeho akce přes IGF1R a IR-A způsobuje nadměrnou stimulaci růstu, malformace a snížení životaschopnosti plodu.

### 2.2.2. IGF2 a kancerogeneze

Zvýšená produkce IGF2 může být příčinou mnoha zhoubných nádorů dětí i dospělých. Za nadměrnou produkci IGF2 může stát mnoho různých faktorů, jako je změna methylace DNA s následnou ztrátou imprintingu, změny v expresi genů transkripčních faktorů nebo změny v posttranskripčních nebo posttranslačních modulátorech exprese genu pro IGF2 (cit.<sup>39</sup>). Deregulace exprese genu pro IGF2 je velmi často zaznamenána u pacientů s rakovinou tlustého střeva a konečníku, rakovinou prsu, prostaty či plic.

Jednou z hlavních příčin vzniku a vývoje rakovinného bujení je ztráta imprintingu (LOI, z angl. loss of imprinting) *Igf2* genu. Ztrátou imprintingu dojde ke zvýšení exprese *Igf2*, buňky jsou tak vystavené vysoké hladině IGF2, což způsobuje růst tkání a podporu anti-apoptotických efektů<sup>40</sup>. Jedním z nejčastějších onemocnění spojených s LOI *Igf2* je BWS, který se projevuje nadměrným růstem jedince a vysokým rizikem tvorby nádorů<sup>41</sup>. A až u 90 % pacientů trpících tzv. Wilmsovým tumorem (rakovinou ledvin vyskytující se v dětství) byla zaznamenána LOI *Igf2* genu<sup>42</sup>. LOI *Igf2* byla objevena i u mnoha dalších typů rakoviny, např. u hepatoblastomů, rakoviny plic, rakoviny děložního čípku či rakoviny varlat<sup>39,43,44</sup>.

Deregulace produkce IGF2 se může projevit také při vzniku sarkomů, jako například rhabdomyosarkomu (sarkomu měkkých tkání) u dětí nebo Ewingova sarkomu (maligního nádoru kostí dětí a adolescentů)<sup>45</sup>.

IGF2 podporuje růst buněk zejména při jeho působení prostřednictvím IGF1R. Při aktivaci IGF1R pomocí IGF2 je proto umocněn vznik nádorů a tvorba metastáz. IGF2 může vznik nádorů způsobovat i při vazbě na IR-A. Tento receptor se nejčastěji vyskytuje v nediferencovaných zhoubných nádorech, kde je dokonce produkován přednostně před IGF1R (cit.<sup>46,47</sup>). V těchto typech nádorů je potom IR-A hlavním receptorem, který je zodpovědný za rakovinoušporné účinky IGF2 (cit.<sup>48</sup>).

Nesprávné posttranslační zpracování pro-IGF2 (prekurzoru IGF2) vede k navýšení hladin proforem IGF2 – již zmíněných big-IGF2. I jejich zvýšená hladina v organismu působí rakovinoušporně, bývá spojována s tvorbou masivních nebo metastatických tumorů mnohdy s váhou převyšující kilogramy<sup>49</sup>. Hlavní nebezpečí těchto nesprávně zpracovaných proforem IGF2 spočívá velmi pravděpodobně v jejich zvýšené biodostupnosti a tedy vysokém proliferativním účinku. Formy big-IGF2 totiž vznikají v důsledku špatné nebo nepřítomné glykosylace E-domény pro-IGF2. V důsledku toho není molekula rozpoznána proteolytickými enzymy a E-doména tak není odštěpena. Tyto big-IGF2 mají pak kvůli své velikosti pozměněnou schopnost tvořit binární a ternární komplexy s IGF-vazebnými proteiny a kyselou labilní podjednotkou (ALS) a tím pádem zůstávají ve volných formách v krevním řečišti. Naopak jejich vazba na hlavní mitogenní receptory (IGF1R a IR-A) je ovlivněna pouze minimálně. Jejich biodostupnost je tak nebezpečně vysoká, což se může projevit ve vyšší proliferativní funkci<sup>50,51</sup>.

Role IGF2 v progresi rakoviny je stále mnohem méně charakterizována než role inzulínu a IGF1. Existují studie dokazující přímé zapojení IGF2 v primárním vzniku nádorů, progresi rakoviny a také v imunitní odpovědi či v mechanismu rezistence organismu na léčbu. V nádorových buňkách bývá *Igf2* exprimován více než *Igf1* a působí autokrinně i parakrinně, což umocňuje jeho vliv na průběh rakovinných onemocnění. Navíc IGF2 podporuje motilitu a schopnost invaze nádorových buněk, ovlivňuje fenotyp kmenových buněk, angiogenezi a podporuje schopnost nádorových buněk skrýt se před imunitním systémem organismu (immune evasion). Všechny tyto poznatky naznačují, že je IGF2 pleiotropním promotorem metastatického šíření u nádorů<sup>52</sup>.

### 2.2.3. IGF2 v nervové soustavě

Nezanedbatelnou roli má IGF2 i v nervové soustavě. IGF2R je produkován v neuronech celého mozku, zejména ale v hipokampu, kortexu, mozečku a mozkovém kmeni<sup>53</sup>. IGF2 je v centrální nervové soustavě rovněž produkován, a to v porovnání s ostatními inzulínu podobnými peptidy v relativně velkých množstvích. Jeho přítomnost byla prokázána např. v hypothalamu, hipokampu, kortexu, třetí mozkové komoře, amygdale, choroidním plexu a v leptomeningách<sup>54,55</sup>. O důvodu produkce obou těchto

molekul v mozku se intenzivně diskutuje. Obě jsou zmiňovány v souvislosti s kognitivními schopnostmi jedinců, především pak s upevněním dlouhodobé paměti. Předpokládá se i jejich zapojení do molekulární podstaty různých patologických stavů (např. psychiatrických poruch či neurodegenerativních onemocnění), jejichž symptomem je právě porucha kognitivních funkcí. Konkrétní mechanismus působení těchto molekul v mozku nejen při zmíněných patologických stavech, ale i ve zdravém organismu, je však stále z velké části neobjasněn.

Proces formování dlouhodobé paměti stojí na *de novo* expresi mRNA a syntéze proteinů. Nově vzniklé proteiny se podílí na tvorbě strukturních změn v synapsích neuronů. Právě ve formě změn v propojení synapsí v mozku jsou informace v paměti ukládány<sup>56</sup>. Počáteční impulz k transkripci nových genů dává transkripční faktor CREB (cAMP response element binding protein). Ten reaguje na zvýšenou hladinu cAMP po stimulaci příslušné signální dráhy neurotransmiterem v postsynaptickém neuronu. CREB se dále váže na promotor genu pro C/EBP $\beta$  (CCAAT enhancer binding protein). Ten působí v jádře rovněž jako transkripční faktor. Váže se na promotory genu *Igf2*, což vede k vysoké expresi genu pro IGF2 (cit.<sup>57</sup>). Postupně se ukázalo, že je endogenní IGF2 produkován v hipokampu nezbytný pro formování dlouhodobých vzpomínek.

Některé experimentální práce naznačily, že podání IGF2 může podporovat dlouhodobou paměť a prodlužovat uchovávání vzpomínek<sup>57–59</sup>. Navíc se zdá, že podání IGF2 hlodavcům způsobuje zvýšenou produkci proteinů kódovaných tzv. časnými geny (IEG – z angl. immediate early gene)<sup>58</sup>. Další práce na zvířatech také ukázaly, že IGF2 působí proti zapomínání v důsledku vysokého věku<sup>60</sup> a jeho administraci by patrně šlo zvrátit některé symptomy nemoci, jakými jsou např. Alzheimerova choroba či různé poruchy autistického spektra<sup>61–63</sup>, včetně Angelmanova syndromu<sup>64</sup>. Pozorování Cruze a spol.<sup>64</sup> se ovšem nepodařilo potvrdit ve studii Bergové a spol.<sup>65</sup>, kteří periferně podávali IGF2 myším s indukovaným Angelmanovým syndromem. Výsledky Bergové a spol. ukázaly, že IGF2 nezlepšuje uchovávání dlouhodobých vzpomínek zdravých kontrolních zvířat ani modelových zvířat Angelmanova syndromu, nemá vliv na koordinaci ani motorickou či lokomotickou aktivitu zvířat a nezlepšuje jejich sociální komunikaci. Jediný, ale velmi zajímavý, dopad IGF2 na organismus zvířat byl zaznamenán při měření intenzity mozkových (konkrétně kortikálních a hipokampálních) delta vln, které se významně snižovaly již hodinu po periferním podání IGF2. Tyto vlny jsou v případě zvířat simulujících Angelmanův syndrom zvýšené a IGF2 je účinně snižuje. Podání IGF2 má tedy evidentně vliv na funkci mozku, ale o míře tohoto vlivu a molekulárním mechanismu působení na behaviorální chování se však stále diskutuje.

Jisté je, že efekty IGF2 na působení v mozku a případně na behaviorální chování jsou zprostředkované hlavně IGF2R a nikoli tyrosinkinasy receptory ostatních inzulínu podobných peptidů (tedy IR-A, IR-B a IGF1R)

(cit.<sup>57,58,63</sup>). Nově navržený mechanismus působení IGF2 přes IGF2R úzce souvisí s jeho zmíněnou schopností navádění ligandů do endosomů a následně do lysosomů – tedy s vezikulárním transportem. Alberini<sup>66</sup> navrhuje, že mobilizované endosomy mohou působit jako platformy pro translaci nově vznikajících mRNA. Tím může být umocněn vznik potřebných proteinů. Translace vázaná na endosomy je pro buňku vysoce výhodná. Umožňovala by vznik nových proteinů ve specifických částech buňky. Proteiny by tak přímo vznikaly v místě jejich potřeby, např. v rostoucích synapsích neuronů. Tím by IGF2 a IGF2R regulovaly proteinovou syntézu a proteinovou degradaci (lysosomální i autofagickou) a zajišťovaly by udržování stálé hladiny proteinů v buňce nezbytné pro zajištění neuronální plasticity, potažmo tedy pro formování dlouhodobé paměti<sup>66</sup>.

IGF2 figuruje i v mnohých studiích mechanismu psychiatrických a neurodegenerativních poruch. Například pacienti s Alzheimerovou chorobou mají oproti zdravým jedincům signifikantně nižší hladiny mRNA IGF2 i samotného IGF2 v mozku<sup>67</sup>. V tomto případě se proto mluví o využití endogenního IGF2 pro léčbu této choroby. Administrace IGF2 by mohla prospívat i pacientům s Parkinsonovou chorobou, Huntingtonovou chorobou či amyotrofičkou laterální sklerózou<sup>66</sup>. Všechny tyto choroby mají totiž společného jmenovatele, a sice hromadění agregátů špatně sbalených proteinů v buňkách<sup>68</sup>. Podpoření vezikulárního transportu a potažmo tedy mechanismu degradace proteinů a vzniku nových proteinů by tento problém možná řešilo. Administrace IGF2 se nabízí i pro léčbu pacientů se schizofrenií. U schizofreniků byla totiž prokázána vysoká hladina IGFBP2 v krvi, která výrazně snižuje množství biologicky dostupného IGF2 (cit.<sup>69</sup>). Stejně tak i syndrom fragilního X chromozomu, který je jedním z typů autismu, by mohl být léčen podáním IGF2. Jeho hladiny v hipokampu modelových myší jsou totiž prokazatelně nižší a přímé podání IGF2 významně zlepšuje kognitivní funkce mozku zvířat<sup>70</sup>.

### 2.3. Analogy IGF2

Jak je zřejmé z předchozích kapitol, IGF2 je molekula zastávající v těle mnoho různých funkcí. Tyto funkce zprostředkovávají tři různé receptory – IGF1R, IR a IGF2R. Kvůli této tzv. cross-reaktivitě je velmi těžké rozlišit od sebe dopady aktivace jednotlivých receptorů při vazbě IGF2 do jejich vazebných míst.

Pro výzkum fyziologických funkcí jednotlivých receptorů a konkrétních signálních transdukci, které spouštějí, lze využít čtyři různé strategie. Zprv je možné výzkum provádět na buněčných kulturách obsahujících jen jeden konkrétní receptor z inkriminované skupiny<sup>71</sup>. Z druhé lze vazebné místo nežádoucích receptorů blokovat specifickými protilátkami. Další možností je receptor cíleně mutovat tak, aby nebyl schopný vázat své ligandy a začtvrté lze produkovat mutované formy IGF2 s pozměněnou aminokyselinovou sekvencí, která zaručuje selektivitu analogu pouze k jednomu typu receptoru<sup>72</sup>.

Nejužívanějším přístupem je čtvrtá varianta, tedy produkce analogů nativní formy IGF2. Dnes je již známá přesná struktura IGF2 i IGF2R (obr. 3C), a tedy i konkrétní aminokyselinové zbytky, které se jejich vzájemné interakce účastní. Dříve byly analogy IGF2 využívány i pro získávání informací o struktuře vazebného místa receptoru a funkcích jednotlivých domén i konkrétních aminokyselin samotného IGF2 (cit. <sup>73,74</sup>). Dnes jsou analogy využívané nejen pro výzkum specifických funkcí IGF2R (cit. <sup>75,76</sup>), ale především je atraktivní myšlenka terapeutického využití analogů IGF2. Analogy se sníženou afinitou k IR a IGF1R a zároveň se zachovanou afinitou k IGF2R by se potenciálně daly využít pro léčbu neurodegenerativních a psychiatrických onemocnění, aniž by působily přehnaný buněčný růst prostřednictvím IGF1R a IR-A.

### 3. Závěr

IGF2 je nesmírně zajímavým hormonem a zároveň růstovým faktorem, jehož biologická role v prenatálním růstu a vývoji je poměrně dobře prozkoumaná, ale jeho fyziologická role v dospělosti není ve srovnání s IGF1 a inzulinem příliš dobře charakterizována. To je překvapivé zejména v kontextu několikanásobně vyšších hladin IGF2 v dospělosti v porovnání s hladinami IGF1 a inzulinu. Z tohoto pohledu je IGF2 molekulou vhodnou pro bližší objasnění jeho dalších fyziologických funkcí, a to zejména v mozku, kde by mohl být odpovědný za udržování normálních kognitivních funkcí. Molekulární mechanismus jeho působení, a to zejména skrze vazbu na IGF2R je ale zatím stále nejasný a bude třeba dalšího intenzivního výzkumu pro objasnění role IGF2 v organismu a pro případný vývoj terapeutik na bázi tohoto hormonu.

#### Seznam zkratk

IGF2	Inzulinu podobný růstový faktor 2
<i>Igf2</i>	Gen pro inzulinu podobný růstový faktor 2
IGF2R	Receptor pro inzulinu podobný růstový faktor 2
<i>Igf2r</i>	Gen receptoru pro inzulinu podobný růstový faktor 2
IR-A	Inzulinový receptor – izoforma A
IR-B	Inzulinový receptor – izoforma B
<i>Ins</i>	Gen pro inzulin
<i>H19</i>	Neproteinogenní gen <i>H19</i>
3'UTR	3' netranslatovaná část genu (z angl. 3' untranslated region)
ICR1	Kontrolní oblast imprintingu 1 (z angl. imprinting control region 1)
CTCF	Transkripční represor CTCF
PC4	Pro-protein konvertasa 4
IGFBP	Vazebné proteiny inzulinu podobných růstových faktorů
GPCR	Receptor spřažený s G-proteinem (z angl. G-protein coupled receptor)
Cryo-EM	Kryoelektronová mikroskopie

ALS	Kyselá labilní podjednotka (z angl. acid-labile subunit)
PCOS	Syndrom polycystických ovarií
LOI	Ztráta imprintingu (z angl. loss of imprinting)
CREB	cAMP response element binding protein
C/EBPβ	CCAAT zesilovací vazebný protein β (z angl. CCAAT enhancer binding protein β)
IEG	časné geny (z angl. immediate early gene)

*Tento článek byl podpořen grantem GAČR 23-05805S, Národního ústavu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění ČR (program EXCELES, projekt LX22NPO5104, financovaný Evropskou unií – Next Generation EU) a Akademií věd ČR (výzkumný záměr RVO:6138963).*

#### LITERATURA

- Shabanpoor F., Separovic F., Wade J. D., v knize: *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* (Litwack G., ed.), 80. díl, str. 1. Elsevier Academic Press Inc., San Diego 2009.
- Brissenden J. E., Ullrich A., Francke U.: *Nature* 310, 781 (1984).
- Sélénou C., Brioude F., Giabicani E., Sobrier M. L., Netchine I.: *Cells* 11, 1886 (2022).
- de Pagter-Holthuizen P., van Schaik F. M., Verduijn G. M., van Ommen G. J., Bouma B. N., Jansen M., Sussenbach J. S.: *FEBS Lett.* 195, 179 (1986).
- Reik W., Murrell A.: *Nature* 405, 408 (2000).
- Phillips J. E., Corces V. G.: *Cell* 137, 1194 (2009).
- Rotwein P.: *J. Biol. Chem.* 293, 4324 (2018).
- Qiu Q., Basak A., Mbikay M., Tsang B. K., Gruslin A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11047 (2005).
- Forbes B. E., McCarthy P., Norton R. S.: *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3, 38 (2012).
- Terasawa H., Kohda D., Hatanaka H., Nagata K., Higashihashi N., Fujiwara H., Sakano K., Inagaki F.: *EMBO J.* 13, 5590 (1994).
- Morrione A., Valentini B., Xu S. Q., Yumet G., Louvi A., Efstratiadis A., Baserga R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3777 (1997).
- Ye L., Maji S., Sanghera N., Gopalasingam P., Gorbunov E., Tarasov S., Epstein O., Klein-Seetharaman J.: *Drug Discovery Today* 22, 1092 (2017).
- Li J., Choi E., Yu H., Bai X.: *Nat. Commun.* 10, 4567 (2019).
- Menting J. G. a 16 spoluautorů: *Nature* 493, 241 (2013).
- Scapin G., Dandey V. P., Zhang Z., Prosser W., Hruza A., Kelly T., Mayhood T., Strickland C., Potter C. S., Carragher B.: *Nature* 556, 122 (2018).
- Uchikawa E., Choi E., Shang G., Yu H., Bai X. C.: *eLife* 8, e48630 (2019).
- Wu C., Huang X., Dong F., Tang W., Shi J., Lu X., Shu Q., Zhang X.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 636, 121 (2022).

18. Zhang X., Wu C., Wei T., Lu Y., Liu C., Zhang J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 618, 148 (2022).
19. Xu Y., Kirk N. S., Venugopal H., Margetts M. B., Croll T. I., Sandow J. J., Webb A. I., Delaine C. A., Forbes B. E., Lawrence M. C.: *Structure* 28, 786 (2020).
20. Gutmann T., Schafer I. B., Poojari C., Brankatschk B., Vattulainen I., Strauss M., Coskun U.: *J. Cell Biol.* 219, e201907210 (2020).
21. Brown J., Esnouf R. M., Jones M. A., Linnell J., Harlos K., Hassan A. B., Jones E. Y.: *EMBO J.* 21, 1054 (2002).
22. El-Shewy H. M., Luttrell L. M.: *Vitam. Horm.* 80, 667 (2009).
23. Brown J. a 10 spoluautorů: *EMBO J.* 27, 265 (2008).
24. Olson L. J., Yammani R. D., Dahms N. M., Kim J. J.: *EMBO J.* 23, 2019 (2004).
25. Williams C. a 15 spoluautorů: *Science* 338, 1209 (2012).
26. Wang R., Qi X., Schmiege P., Coutavas E., Li X.: *Sci. Adv.* 6, eaaz1466 (2020).
27. Byrd J. C., Park J. H., Schaffer B. S., Garmroudi F., MacDonald R. G.: *J. Biol. Chem.* 275, 18647 (2000).
28. Williams C., Rezgui D., Prince S. N., Zaccheo O. J., Foulstone E. J., Forbes B. E., Norton R. S., Crosby J., Hassan A. B., Crump M. P.: *Structure* 15, 1065 (2007).
29. El-Shewy H. M., Johnson K. R., Lee M. H., Jaffa A. A., Obeid L. M., Luttrell L. M.: *J. Biol. Chem.* 281, 31399 (2006).
30. Clemmons D. R.: *J. Mol. Endocrinol.* 61, T139 (2018).
31. Alberini C. M., Chen D. Y.: *Trends Neurosci.* 35, 274 (2012).
32. Savage M. O., Burren C. P., Rosenfeld R. G.: *Clin. Endocrinol. (Oxford, U. K.)* 72, 721 (2010).
33. Sacks D. A.: *Curr. Diabetes Rep.* 4, 281 (2004).
34. Ziegler A. N. a 12 spoluautorů: *Stem Cell Rep.* 12, 816 (2019).
35. Florini J. R., Ewton D. Z., Magri K. A.: *Annu. Rev. Physiol.* 53, 201 (1991).
36. Alfares M. N., Perks C. M., Hamilton-Shield J. P., Holly J. M. P.: *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* 315, E1098 (2018).
37. Rancourt R. C., Harris H. R., Barault L., Michels K. B.: *FASEB J.* 27, 3335 (2013).
38. Louvi A., Accili D., Efstratiadis A.: *Dev. Biol.* 189, 33 (1997).
39. Brouwer-Visser J., Huang G. S.: *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 371 (2015).
40. Gallagher E. J., LeRoith D.: *Curr. Diabetes Rep.* 10, 93 (2010).
41. Abi Habib W. a 10 spoluautorů: *Hum. Mutat.* 38, 105 (2017).
42. Ravenel J. D., Broman K. W., Perlman E. J., Niemitz E. L., Jayawardena T. M., Bell D. W., Haber D. A., Uejima H., Feinberg A. P.: *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1698 (2001).
43. McCann A. H., Miller N., O'Meara A., Pedersen I., Keogh K., Gorey T., Dervan P. A.: *Hum. Mol. Genet.* 5, 1123 (1996).
44. Morison I. M., Reeve A. E.: *Mol. Med. Today* 4, 110 (1998).
45. Mancarella C., Morrione A., Scotlandi K.: *Cells* 10, 2075 (2021).
46. Wang Y., Hua S., Tian W., Zhang L., Zhao J., Zhang H., Zhang W., Xue F.: *Gynecol. Oncol.* 125, 734 (2012).
47. Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R.: *Endocr. Rev.* 30, 586 (2009).
48. Pandini G., Frasca F., Mineo R., Sciacca L., Vigneri R., Belfiore A.: *J. Biol. Chem.* 277, 39684 (2002).
49. Dynkevich Y. a 13 spoluautorů: *Endocr. Rev.* 34, 798 (2013).
50. Potalitsyn P. a 11 spoluautorů: *Commun. Biol.* 6, 863 (2023).
51. Greenall S. A., Bentley J. D., Pearce L. A., Scoble J. A., Sparrow L. G., Bartone N. A., Xiao X., Baxter R. C., Cosgrove L. J., Adams T. E.: *J. Biol. Chem.* 288, 59 (2013).
52. LeRoith D., Roberts C. T., Jr.: *Cancer Lett.* 195, 127 (2003).
53. Hawkes C., Kar S.: *J. Comp. Neurol.* 458, 113 (2003).
54. Bondy C., Werner H., Roberts C. T., Jr., LeRoith D.: *Neuroscience* 46, 909 (1992).
55. Couce M. E., Weatherington A. J., McGinty J. F.: *Endocrinology* 131, 1636 (1992).
56. Bailey C. H., Kandel E. R.: *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397 (1993).
57. Chen D. Y., Stern S. A., Garcia-Osta A., Saunier-Rebori B., Pollonini G., Bambah-Mukku D., Blitzer R. D., Alberini C. M.: *Nature* 469, 491 (2011).
58. Stern S. A., Kohtz A. S., Pollonini G., Alberini C. M.: *Neuropsychopharmacology* 39, 2179 (2014).
59. Agis-Balboa R. C. a 11 spoluautorů: *EMBO J.* 30, 4071 (2011).
60. Steinmetz A. B., Johnson S. A., Iannitelli D. E., Pollonini G., Alberini C. M.: *Neurobiol. Aging* 44, 9 (2016).
61. Mellott T. J., Pender S. M., Burke R. M., Langley E. A., Blusztajn J. K.: *PLoS One* 9, e94287 (2014).
62. Pascual-Lucas M., Viana da Silva S., Di Scala M., Garcia-Barroso C., González-Aseguinolaza G., Mulle C., Alberini C. M., Cuadrado-Tejedor M., Garcia-Osta A.: *EMBO Mol. Med.* 6, 1246 (2014).
63. Adam B. S., Sarah A. S., Amy S. K., Giannina D., Cristina M. A.: *J. Neurosci.* 38, 1015 (2018).
64. Cruz E., Descalzi G., Steinmetz A., Scharfman H. E., Katzman A., Alberini C. M.: *Autism Res.* 14, 29 (2021).
65. Berg E. L., Petkova S. P., Born H. A., Adhikari A., Anderson A. E., Silverman J. L.: *Mol. Autism* 12, 59 (2021).
66. Alberini C. M.: *Trends Neurosci.* 46, 488 (2023).

67. Steen E., Terry B. M., Rivera E. J., Cannon J. L., Neely T. R., Tavares R., Xu X. J., Wands J. R., de la Monte S. M.: *J. Alzheimer's Dis.* 7, 63 (2005).
68. Soto C.: *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49 (2003).
69. Zhang X. a 10 spoluautorů: *J. Clin. Psychiatry* 74, e287 (2013).
70. Pardo M., Cheng Y., Velmeshev D., Magistri M., Eldar-Finkelman H., Martinez A., Faghihi M. A., Jope R. S., Beurel E.: *JCI Insight* 2, e91782 (2017).
71. Tally M., Enberg G., Li C. H., Hall K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 1206 (1987).
72. Sakano K., Enjoh T., Numata F., Fujiwara H., Marumoto Y., Higashihashi N., Sato Y., Perdue J. F., Fujita-Yamaguchi Y.: *J. Biol. Chem.* 266, 20626 (1991).
73. Roth B. V., Bürgisser D. M., Lüthi C., Humbel R. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 907 (1991).
74. Francis G. L., Aplin S. E., Milner S. J., McNeil K. A., Ballard F. J., Wallace J. C.: *Biochem. J.* 293, 713 (1993).
75. Rosenthal S. M., Hsiao D., Silverman L. A.: *Endocrinology* 135, 38 (1994).
76. Hawkes C., Jhamandas J. H., Harris K. H., Fu W., MacDonald R. G., Kar S.: *J. Neurosci.* 26, 585 (2006).

**T. Turnovská, J. Jiráček, and L. Žáková** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **IGF2: Overlooked Peptide from Insulin-Like Family of Hormones with Great Therapeutical Potential**

Insulin-like growth factor 2 (IGF2), along with several other insulin-like peptides, belongs to an evolutionarily conserved family of signalling molecules essential for normal cell proliferation and brain development. Previous studies have mainly focused on its role in embryonic development and carcinogenesis. In recent years, new insights revealed the role of IGF2 in the central nervous system, particularly its importance in learning, memory consolidation and enhancement. Despite the still not fully explored physiological role of IGF2, in this article we aim to describe and explain its known functions in more detail and discuss its potential uses, including its possible application in the treatment of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** IGF2, insulin, insulin receptor, IGF2 receptor, carcinogenesis, neurodegenerative diseases, embryogenesis

*Acknowledgements*

*This project was supported by a grant GAČR 23-05805S, National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases of the Czech Republic (Program EXCELES, Project LX22NPO5104, funded by the European Union-Next Generation EU) and by the Czech Academy of Sciences (Research Project RVO:6138963).*



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.



## KDO BYL THOMAS MIDGLEY, JR.

PETR HOLÝ

Česká společnost chemická, redakce Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 00 Praha, Česká republika  
pholy382@seznam.cz

Došlo 26.3.24, přijato 25.4.24.

Thomas Midgley, Jr. (1889–1944) byl americký vědec a vynálezce. Za svého života se stal velmi uznávanou osobností. Nejvíce se proslavil svými objevy tetraethylolova a freonů. Teprve na konci 20. století začal být obviňován z rozsáhlých škod na životním prostředí, které tyto látky způsobily. Článek se snaží shrnout dostupné údaje o všech okolnostech jeho výzkumné práce a ukázat tak, do jaké míry je zodpovědný za jejich škodlivé účinky na životní prostředí.

Klíčová slova: Thomas Midgley, Jr., Charles Franklin Kettering, tetraethylolovo, olovnatý benzín, otrava olovem, freony, ozonová díra

### Obsah

1. Úvod
2. Start vědecké dráhy Thomase Midgleye
3. Příběh tetraethylolova
  - 3.1. Hledání příčiny klepání benzínových motorů
  - 3.2. Vývoj účinného antidetonačního činidla
  - 3.3. Start průmyslové výroby tetraethylolova
  - 3.4. Problémy s toxicitou tetraethylolova
  - 3.5. Vliv olovnatých benzínů na zamoření životního prostředí olovem
4. Příběh freonů
  - 4.1. Sporný rok vzniku freonů
  - 4.2. Nejasnosti kolem struktury prvního freonu
  - 4.3. Výroba a použití freonů
  - 4.4. Štěpení freonů ve stratosféře a ozonová díra
5. Závěr



Obr. 1. Thomas Midgley, Jr. (cit.<sup>1</sup>)

### 1. Úvod

Thomas Midgley, Jr. byl významným americkým vědcem a vynálezcem<sup>1,2</sup> (obr. 1, cit.<sup>1</sup>). Je autorem či spoluautorem více než stovky patentů. V průběhu své bohaté kariéry obdržel řadu cen, včetně Nicholsovy medaile (1923), Longstrethovy medaile (1925), Perkinovy medaile (1937), Priestleyho medaile (1941) a medaile Willarda Gibbse (1942). Dlouhou dobu byl činný v Americké chemické společnosti, které 14 let předsedal a v roce 1944 se stal jejím prezidentem. Byl americkým delegátem na Mezinárodním chemickém kongresu v Římě v roce 1938. V roce 1942 byl zvolen do Národní akademie věd. V letech 1940 až 1944 byl ředitelem a viceprezidentem Výzkumné nadace Ohio State University. Zemřel tragicky dne 2. 11. 1944 ve věku pouhých 55 let.

Je velmi neobvyklé až zarážející, že tento významný vynálezce, který byl za svého života považován za génia a jehož výzkumné výsledky byly dlouhou dobu vysoce oceňovány, je mnoho let po své smrti označován za nejškodlivějšího vynálezce v historii<sup>3</sup>, podle jiného pramene za vynálezce dvou nejsmrtelejších látek 20. století<sup>4</sup>. Historik životního prostředí John McNeill ve své knize *Something New Under the Sun: An Environmental History of the Twentieth-Century World* vyjádřil negativní ekologický dopad jeho vynálezů tvrzením, že Thomas Midgley „měl větší vliv na atmosféru než kterýkoli jiný živý organismus v historii Země“ (cit.<sup>1,5</sup>). I v českých médiích byl v nedávné době zmíněn Thomas Midgley jako (anti)hrdina minulého století, jenž byl kdysi považován za génia

a později za vraha planety<sup>6</sup>, který svými vynálezy vyšlal cestu k vyhlazení lidstva<sup>7</sup>.

Takový zvrat v pohledu na tohoto vynálezce spočívá v tom, že Thomas Midgley svými objevy odstartoval používání olovnatého benzínu a freonů, přičemž oba tyto produkty se zásadním způsobem podílely (a stále ještě podílejí) na zhoršení životního prostředí na Zemi. Jejich nesmírná škodlivost spočívá v celosvětovém rozšíření a ve skutečnosti, že celá společnost je mohutně využívala až téměř do konce 20. století. Teprve na základě nezvratných důkazů o jejich ekologické škodlivosti byly tyto produkty postupně z použití stahovány a s určitými potížemi nahrazovány neškodnými či spíše méně škodlivými látkami.

Pro zvážení, do jaké míry jsou poněkud novinářská označení Thomase Midgleye jako ekologického zloducha spravedlivá, je třeba znát celý příběh jeho „objevů“ s pozadím tehdejšího stavu technického a lékařského poznání a obchodních praktik první poloviny 20. století. Základní údaje o životě a pracovní dráze Thomase Midgleye jsou uvedeny ve stručných neutrálně laděných encyklopedických textech, např.<sup>1,2</sup>. Některé již zmíněné kritické články jsou obsáhlejší<sup>3,6</sup> a lze v nich nalézt podrobnější informace o Midgleyově vědecké práci. K tomu poslouží i další životopisné články<sup>8–11</sup>. Také odborné publikace týkající se tetraethylolova<sup>12,13</sup>, respektive freonů<sup>14,15</sup>, popisují Midgleyův způsob řešení zadaných úkolů, který vyústil v nalezení látek požadovaných vlastností. Jeho postoj k toxicitě tetraethylolova a k zavádění olovnatých benzínů na pozadí tehdejšího ekonomicko-společenského pozadí popisuje obsáhlý velice kritický článek z roku 2000 (cit.<sup>16</sup>). Vzpomínkové publikace ukazují, jak Thomase Midgleye v práci i v soukromí viděli jeho přátelé a spolupracovníci<sup>17,18</sup>.

## 2. Start vědecké dráhy Thomase Midgleye

Thomas Midgley, Jr. se narodil 18. května 1889 v městě Beaver Falls v Pensylvánii. Jeho otec byl vynálezce v oboru automobilových pneumatik, po něm zdědil jeho syn objevitelský talent. Ačkoliv Thomas Midgley je považován za úspěšného chemika, jeho studium nebylo zaměřeno na chemii<sup>13,17,18</sup>. Po absolvování Bettsovy akademie ve Stamfordu v Connecticutu dále pokračoval na Cornellově univerzitě v New Yorku, kde v roce 1911 promoval s titulem strojního inženýra<sup>1,2,8,13</sup>. Jeho pozdější výzkumnou strategií však zásadním způsobem ovlivnil už jeho učitel chemie ve Stamfordu H. M. Robert, který ho seznámil s užitečností periodické tabulky prvků<sup>8,13</sup>. Po studiu nastoupil Midgley jako kreslič do National Cash Register Company v Daytonu v Ohiu, kde se poprvé setkal s Charlesem F. Ketteringem<sup>11</sup>. Z této firmy brzy odešel, aby se ve firmě svého otce jeden rok věnoval zlepšování vlastností pneumatik<sup>1,13,16</sup>. V roce 1916 přijal místo ve výzkumném týmu ve firmě DELCO (Dayton Engineering Laboratories), kterou vlastnil a vedl Charles Kettering<sup>11</sup>. Začlenění do jeho týmu mělo pro Thomase Midgleye zásadní význam. Charles Kettering (o 13 let starší než Midgley) měl

vynikající technické znalosti a obchodní talent, již v té době byl známým vynálezcem a držitelem mnoha patentů<sup>10,19</sup>, byl zakladatelem společnosti DELCO a po několika letech se stal vedoucím výzkumu u společnosti General Motors. Pod jeho vedením a ve spolupráci s ním si Midgley vybudoval celou svou objevitelskou kariéru. Také Kettering si spolupráce s Midgleyem velice vážil, oceňoval jeho pracovní zápal, s kterým se vrhal do problémů přesahujících do několika oborů. Podle něj Midgley těžil ze své inteligentní nevědomosti („intelligent ignorancy“), která mu dovozovala zkoušet věci, o kterých odborníci „věděli“, že nebudou fungovat, a tak možná vyřešit nemožné<sup>9</sup>. Když se něco nedařilo, nezastavil se a hledal další možnosti, jak potíže odstranit<sup>17</sup>. Kromě toho Midgley obvykle pracoval velmi rychle, a tak Ketteringa překvapoval otázkou: „What do you want me to do next, Boss?“ (cit.<sup>11,13,17</sup>).

## 3. Příběh tetraethylolova

### 3.1. Hledání příčiny klepání benzínových motorů

Od nástupu do firmy DELCO se Midgley kromě řady drobnějších úkolů věnoval hlavně řešení nepříjemného klepání benzínových motorů. Tento problém šéfa Ketteringa velice trápil, protože mu byl přičítán (jak se ale později ukázalo neprávem). V roce 1911 totiž Kettering patentoval v té době revoluční způsob automobilového zapalování s rozdělovačem, akumulátorem a dynamem<sup>6,10,11,19</sup>, které umožnilo opustit poněkud nebezpečné startování ruční klikou. Novinku společnost GM hned zavedla u svých modelů Cadillac, což mnoho řidičů<sup>16</sup> (zvláště žen) velmi ocenilo, naopak u Fordu T ještě zůstalo starší magnetové zapalování a startování ruční klikou. Zatímco jednodušší motory ve Fordu T běžely celkem klidně, chod motorů v Cadillacu s novým zapalováním rušilo silné klepání.

Midgley<sup>17,18,21</sup> si všiml, že plazivý keřík trailing arbutus (*Epigaea repens*) roste i v zimě díky svým silně zbarveným listům, které jsou schopny zachytit dostatek energie. Proto uvažoval, že obarvené palivo by také absorbovalo více tepla, čímž by se zlepšilo jeho hoření a odstranilo klepání. Tato úvaha byla sice v principu chybná, ale přesto první pokus přinesl úspěch. Při obarvení benzínu jodem klepání pokusného motoru ustalo<sup>6,13,17,18</sup>. Následně však takto fungoval i přídavek bezbarvého jodethanu<sup>13,18</sup>. Žádná z těchto látek se sice pro praxi nehodila, ale odstranění klepání znamenalo, že problém není v Ketteringově systému zapalování, ale v tehdejší palivu. To také potvrdilo snímání tlaku a optické sledování hoření za chodu motoru<sup>11,13,17</sup>, které ukázalo, že klepání způsobují samozápalové směsi. Kettering i Midgley dále sledovali dva způsoby zlepšení paliva. Prvním bylo přidání vysokoprocenní složky do stávajícího benzínu, druhou možností bylo nalezení činidla, u něhož by stačil minimální přídavek<sup>11</sup>. Vysokoprocenní složka byla brzy nalezena – už méně než 20 % ethanolu v tehdejší benzínu spolehlivě zabraňova-

lo klepání motoru. V únoru 1920 podal Midgley patentovou přihlášku na směs alkoholu a benzínu jako bezdetonační palivo<sup>1,11,16</sup>. V říjnu 1921 jel Thomas Midgley autem z Daytonu na setkání Společnosti automobilových inženýrů v Indianapolisu na benzín s 30 % ethanolu. Na shromáždění deklaroval výhody alkoholu spočívající v jeho čistém spalování a v možnosti vysoké komprese paliva v motoru, která umožňuje značně zvýšit výkon<sup>9,10,11,16</sup>. Thomas Midgley v letech 1919–1921 řešil klepání motoru založené na obou možnostech, tedy přidavkem jak vysokoprocentní, tak i nízkoprocentní složky. V roce 1923 obdržel své první vysoké ocenění (Nicholsovu medaili) nikoliv speciálně za objev tetraethylolova, ale obecně za antidetonační činidla pro motorová paliva<sup>1,5,8</sup>.

Kettering i Midgley spatřovali ve vysokém lihovém podílu také opatření proti palivové krizi, která byla předpovídána při tehdejší pomalém rozvoji těžby ropy<sup>9–11</sup>. Ovšem kvasný způsob výroby lihu byl nepatentovatelný (tudíž komerčně nezajímavý<sup>1</sup>) a jiná technologie byla v té době nedostupná<sup>16</sup>. Průzkumem se také ukázalo, že tehdejší kvasná výroba lihu by kapacitně nepostačovala<sup>11</sup>, také zpracování celulosových odpadů se zdálo ekonomicky nevýhodné<sup>11</sup>. Lihu také nepřála zavedená prohibice, která komplikovala i jeho průmyslové použití<sup>9,11</sup>. Kromě toho vznikala oboustranně výhodná vazba GM a těžářských společností, kterým by lihová konkurence nevyhovovala. Alfred P. Sloan jako viceprezident GM, pod který firma DELCO od roku 1919 spadala, proto vysokoprocentní variantu zamítl<sup>3</sup>.

### 3.2. Vývoj účinného antidetonačního činidla

Po řešení válečných výzkumných úkolů, z nichž nejúspěšnější bylo zvládnutí hydrogenace benzenu pro výrobu vylepšeného leteckého paliva tvořeného směsí cyklohexanu a benzenu<sup>6,8,9,13</sup>, se Midgley vrátil do Daytonu, a to do nové Ketteringovy firmy Dayton Metal Products, která brzy nato přešla pod GM. V hledání nízkoprocentní antidetonační přísady pokračoval usilovně, ale úspěch dlouho nepřicházel. Píše se, že testoval každou látku, kterou našel („from melted butter and camphor to ethyl acetate and aluminum chloride... most of them had no more effect than spitting in the Great Lakes.“, cit.<sup>16</sup>). Vedení GM pro soutěžení s Henry Fordem a jeho modelem T antidetonační přísadu nutně potřebovalo<sup>3</sup>. Usilovalo o zlepšení výkonu svých aut pomocí vysoké komprese směsi, kdy se ale projevilo škodlivé klepání výrazněji než u jednodušších motorů v konkurenčním Fordu T. Tím se výzkum v DELCO dostal pod značný tlak a šéf Kettering to musel týmu oznámit slovy: „By God, if you don't come up with something within the next three to six months you're all fired.“ (cit.<sup>9</sup>).

Presný počet testovaných sloučenin se v různých zdrojích dramaticky liší<sup>13</sup>. Brožura z roku 1927 „The Story of Ethyl Gasoline“ uvádí, že bylo studováno 33 tisíc sloučenin<sup>9,10</sup>. Tak vysoký počet dobře ilustruje intenzivní hledání. Naproti tomu v prohlášení společnosti Ethyl Corporation z roku 1980 se uvádí pouze 144 zkoumaných lá-

tek<sup>16</sup>. Toto velmi nízké číslo vychází z deníků GM, které ale byly později „vyčištěny“, aby sloužily jako dokumentace racionálního vědeckého bádání, které dovedlo Midgleye ke konečnému úspěchu<sup>16</sup>. Skutečnost je taková, že Midgley dospěl od počáteční metody pokus-omyl dokonce k systematickému hledání, jak sám ve své publikaci<sup>20</sup> píše: „... we profitably abandoned the Edisonian method (i.e., trial and error) in favor of a correlational procedure based on the periodic table“. Popis myšlenkového pochodu, kterým dospěl Midgley k racionálnímu hledání s pomocí periodické tabulky prvků, slouží jako případová studie pro učitele chemie<sup>21</sup>.

Po dlouhé době neúspěšného hledání zkusal Midgleyův spolupracovník Thomas Boyd dne 30. ledna 1919 anilin, který se ukázal jako do té doby nejúčinnější antidetonační<sup>10</sup>. Brzy nato následovalo podání patentu (obr. 2, cit.<sup>22</sup>). Nedalo se ale mluvit o úspěchu, protože benzín s anilinem při spalování produkoval takový zápach, že Midgley byl doma vykázán na spaní do garáže<sup>9</sup>. Kettering pak navrhl Midgleyovi vyzkoušet oxychlorid seleničitý<sup>13,17</sup>, jenž byl sice poněkud účinný, ale silně korozivní. Také testování diethylselanu bylo opuštěno pro jeho slabý účinek a produkci silného charakteristického česnekového

Patented Feb. 2, 1926.

1,571,862

## UNITED STATES PATENT OFFICE.

THOMAS MIDGLEY, JR. OF DAYTON, OHIO, ASSIGNOR, BY MESSRS ASSIGNMENTS, TO GENERAL MOTORS CORPORATION, OF DETROIT, MICHIGAN, A CORPORATION OF DELAWARE.

### PREVENTION OF FUEL KNOCK.

No Drawing. Continuation of application Serial No. 419,763, filed October 26, 1920. This application filed September 18, 1925. Serial No. 663,505.

To all whom it may concern:

Be it known that I, THOMAS MIDGLEY, JR., a citizen of the United States of America, residing at Dayton, county of Montgomery, and State of Ohio, have invented certain new and useful Improvements in the Prevention of Fuel Knock, of which the following is a full, clear, and exact description.

10 The present invention relates to the prevention of the so-called fuel knock in internal-combustion engines.

In its preferred form, it relates more specifically to a composition of matter for injection or addition to the fuel mixture of an internal-combustion engine before the combustion of the same.

15 This application is a continuation of my application Serial No. 419,763, filed October 26, 1920.

In application, Serial No. 553,040, filed April 15, 1922, there is described a method and apparatus for preventing knock in internal-combustion engines, wherein aniline and other anti-knock materials are injected into the fuel-air mixture prior to its combustion.

20 In application Serial No. 553,040, filed April 15, 1922, there is described the use of these materials without specific preparation. These materials however, are somewhat unsatisfactory under certain conditions and it is the object of the present invention to provide a composition of matter containing anti-knock material which will have satisfactory physical properties under all ordinary operating conditions.

Aniline, which is the most readily available anti-knock material, freezes when cooled to temperatures as low as about -6° C. and consequently would not give satisfactory operation at temperatures approximating this point.

25 In order to overcome this tendency of aniline to freeze, a substance is added which will lower the freezing point of the aniline or form a mixture which has a sufficiently low freezing point. Such a substance should preferably be one which does not interfere with the operation of the engine or with the function of the aniline as an anti-knock material. A satisfactory material for this purpose is ortho toluidine, which is itself an anti-knock material. Another suitable material for the purpose is xylidine, which is also an anti-knock material. A relatively small proportion of either one or a mixture of these two materials will reduce the freezing point of aniline, or the mixture of aniline with the addition, to temperatures considerably below the freezing point of the aniline by itself.

30 This mixture of materials however becomes too viscous to allow its use in injectors at these low temperatures, and it becomes desirable to add a material which will reduce the viscosity and which will reduce the rate of increase in viscosity on cooling.

A material which is satisfactory for this purpose is unsaturated gasoline (unsaturated in hydrogen, for example, the olefinic series including decylene and monylene) and the preferred unsaturated gasoline is one having an unsaturation of approximately 38 to 40%.

35 In cases where the anti-knock liquid is to be used under conditions in which the temperature never reaches a point below about 0° C., it will be found that the mixture of aniline and unsaturated gasoline will give satisfactory operation, however if this mixture without the blending agent is reduced to temperatures as low as -6 or -7° C. the aniline will begin to separate out.

40 The preferred composition and one that has been found to possess the desired physical and chemical characteristics within a temperature range of approximately 30° C. to approximately -30° C. is composed of aniline, six parts; unsaturated gasoline (having substantially 38 to 40% unsaturation) three parts; and the blending agent (consisting of substantially equal parts of ortho toluidine and xylidine) two parts.

45 Instead of the mixture of equal parts of ortho toluidine and xylidine as indicated in the last paragraph, being used as a blending agent, either one of these materials may be used.

50 While the specific proportions mention aniline as the anti-knock material to be used, it should be understood that other anti-knock materials may be substituted therefor, such as other aromatic amines and that other

Obr. 2. První strana patentu o účinku anilinu<sup>22</sup>

zápachu. Pro další směřování výzkumu použil Midgley periodickou tabulku prvků v úpravě podle R. E. Wilsona, která řadí prvky do sloupců podle počtu neobsazených míst ve vnější elektronové slupce<sup>9,11,13,21</sup>. Proto po selenu jako další prvek ve sloupci zvolil tellur, jehož diethylderivat byl jako antidetonátor velice účinný, ale v praxi opět nepoužitelný pro ještě horší zápach, jímž byli všichni zúčastnění na čas společensky znemožněni<sup>9,11,13</sup>. Midgley usoudil, že antidetonační účinnost se u organokovových derivátů prvků řazených ve sloupcích tabulky zvyšuje směrem dolů k těžším prvkům, takže po nadějném efektu tetraethylstannanu očekával další pokrok s obdobným derivátem olova<sup>13,20</sup>.

Tetraethylolovo (správným názvem tetraethylplumban) bylo již známé. První jej totiž připravil už v roce 1853 Carl Jacob Löwig reakcí jodethanu se slitinou sodíku a olova, v čisté formě pak George Bowdler Buckton v roce 1859 reakcí diethylzinku s chloridem olovnatým<sup>12,13</sup>. Carroll Hochwalt, chemik v Midgleyově týmu, zvolil stejnou reakci jako Buckton pro přípravu malého množství tetraethylolova, které pak dne 9. prosince 1921 použili pro zkoušky v pokusném motoru<sup>9,11,13</sup>. Nejprve namíchali směs tetraethylolova (dále označovaného zkratkou TEL)

a benzínu v poměru 1 : 100. Motor běžel bez klepání a stejně tak i potom, kdy snížili množství TEL na polovinu. Nakonec se ukázalo, že pouhých 0,025 % TEL stačilo k zamezení klepání motoru<sup>9</sup>. Tím, že účinnost byla spolehlivá už při tak velkém zředění, jevílo se tetraethylolovo jako ideální nízkoprocentní přísada. Kettering začal cítit úspěch, a i když bylo třeba ještě vyřešit některé problémy, rozhodl se co nejrychleji uvést produkt na trh<sup>16</sup>. Zvolil pro něj název „ETHYL“, který byl odvozen ze struktury TEL, ale neobsahoval slovo „olovo“, které by vzbuzovalo obavy z toxicity produktu<sup>6,9,11,16</sup>. První patent na TEL byl podán v září 1922 (obr. 3, cit.<sup>23</sup>).

### 3.3. Start průmyslové výroby tetraethylolova

Na Midgleye a jeho tým místo oslav úspěchu čekala další horečná práce<sup>13</sup>. První problém s TEL byla tvorba úsad oxidu olovnatého na všech povrchích spalovacího prostoru. Midgleyův spolupracovník Thomas Boyd našel řešení v přidavku 1,2-dibromethanu, který přeměnil olovnaté povlaky na těžký bromid olovnatý, který odchází do výfuku<sup>13</sup>. Zásadním úkolem však bylo vypracování průmyslově použitelného způsobu výroby TEL. Ten v začátku vycházel z postupu, který použil už Löwig, totiž z reakce jodethanu se slitinou sodíku a olova<sup>13</sup>. Pro vysokou cenu jodu musel být v průmyslovém měřítku jodethan nahrazen bromethanem. Tím se ale musela vyřešit dostupnost většího množství bromu (nutného současně i pro výrobu 1,2-dibromethanu). Midgley proto dostal úkol vypracovat způsob získávání bromu z mořské vody, což se mu skutečně podařilo<sup>3,13</sup>. Firma Ethyl-Dow Chemical Company spustila v roce 1925 produkci bromu<sup>13</sup> podle jeho postupu. Výrobu TEL světila společnost GM chemickému gigantu DuPont, který otevřel výrobu ethylbromidovým postupem v prvním provozu v roce 1923 v Daytonu v Ohio (cit.<sup>13,16</sup>). Mezitím firma Standard Oil Company v New Jersey, která byla již dříve v kontaktu s Ketteringem, hledala výhodnější postup výroby TEL s užitím levnějšího chlorethanu. Především spoluprací s profesorem Charlesem Krausem, odborníkem na organokovové sloučeniny, se podařilo vypracovat výrobní postup na TEL reakcí slitiny Na/Pb s chlorethanem. Tento výrobní postup byl sice technologicky náročnější, ale nákladově výhodnější (za svou práci obdržel Kraus Nicholovu medaili<sup>13</sup>, rok po Midgleyovi). Firma Standard Oil Company si postup patentovala. Protože GM vlastnila základní patent na TEL a Standard Oil Company měla patent na levnější výrobu, byla těmito dvěma partnery vytvořena společnost Ethyl Gasoline Corporation<sup>9,16</sup>, ve které byl Kettering jmenován prezidentem a viceprezidenty se stali Midgley za GM a Frank A. Howard za Standard Oil. Firma Ethyl Gasoline Corporation otevřela svou první poloprovozní jednotku v roce 1924. První velkokapacitní výrobní jednotka firmy DuPont byla otevřena roku 1925 v městě Deepwater v New Jersey<sup>13</sup>. Podrobnější popis výroby TEL v provozech firem DuPont a Standard Oil Company a vývoj modernějších postupů v dalším období podává obsáhlý článek Dietmara Seyfertha<sup>13</sup>.

Patented Feb. 23, 1926.

1,573,846

## UNITED STATES PATENT OFFICE.

THOMAS MIDGLEY, JR., OF DAYTON, OHIO, ASSIGNOR, BY MESSE ASSIGNMENTS, TO GENERAL MOTORS CORPORATION, OF DETROIT, MICHIGAN, A CORPORATION OF DELAWARE.

### METHOD AND MEANS FOR USING MOTOR FUELS.

Application filed April 15, 1922. Serial No. 553,579.

To all whom it may concern:

Be it known that I, THOMAS MIDGLEY, JR., a citizen of the United States of America, residing at Dayton, county of Montgomery, and State of Ohio, have invented certain new and useful Improvements in Methods and Means for Using Motor Fuels, of which the following is a full, clear, and exact description.

This invention relates to fuels, such, for example as kerosene and gasoline, employed in the operation of internal-combustion engines and to the art of burning the fuels in an engine. The present tendency is to produce lower grades of gasoline in order to obtain a sufficient output for the increasing demand for motor fuels and to reduce the compressions of the engines so that these lower grades of fuel may be used without knocking. As the lowering of engine compression reduces the efficiency of the engine, a still greater output of fuel is required to meet the increase in fuel required to operate larger and less efficient engines. The principal objects of the present invention are to overcome these difficulties and to provide a means for using either low or high grades of motor fuel more efficiently and so reduce the quantity of fuel used.

The present application is a continuation in part of my application Serial No. 461,985, filed April 27, 1921.

In the accompanying drawings: Fig. 1 is a side view of an automobile having an engine embodying the present invention and showing the comparative sizes of engines employed when using high and low engine compressions; and Fig. 2 is a longitudinal sectional view of an engine cylinder and shows the comparative sizes of combustion chambers employed when using fuels having high and low critical compression pressures.

Kerosene, gasoline and the heavier hydrocarbons have the characteristic that, when a combustible gaseous mixture containing one of these fuels and air is burned in an internal-combustion engine while subjected to a relatively high pressure, a fuel knock is produced, the engine heats rapidly, the efficiency of the engine is reduced and, if the initial pressure is very high, engine parts may be injured. The highest pressure at which a mixture may be burned in a cylinder without producing a fuel knock varies with the different fuels and, to some extent, with the temperature, position of spark plugs and other conditions within the engine. This pressure I term the "critical compression pressure" of the fuel.

The average critical compression pressure of kerosene is about 50 pounds, of the proper grades of gasoline about 75 pounds and of the better grades of gasoline about 125 pounds. The latter grade of gasoline is produced in limited quantities and is not available universally to the consumer. The commoner grades of fuel, such as kerosene and gasoline, having critical compression pressures below 75 pounds are used generally, and in internal-combustion engines for house lighting systems, trucks, tractors, and automobiles are designed to operate on these kinds of fuel.

I have found that the critical compression pressure of a fuel of the type mentioned above is increased by incorporating therewith any one of a large number of compounds containing metallic elements, i. e., compounded metallic elements.

By way of example, I may use a fuel consisting by volume of  $\frac{1}{4}$  of one percent of tetra ethyl lead and 99 $\frac{3}{4}$  percent of gasoline having a normal "critical compression pressure" of about 75 pounds. The tetra ethyl lead dissolves in the gasoline forming a fuel having a "critical compression pressure" of about 160 pounds. The presence of the lead compound changes the gasoline from a low compression fuel to a higher compression fuel, i. e., increases its "critical compression pressure." This gasoline may be used in an engine having a compression pressure of about 160 pounds, with a smaller fuel consumption for obtaining a given amount of work than is required to operate an engine having a compression pressure of 75 pounds on the untreated gas-

Obr. 3. První strana patentů o tetraethylolovu<sup>23</sup>

### 3.4. Problémy s toxicitou tetraethylolova

Závažnou komplikací při výzkumu i při zavádění do výroby byla vysoká toxicita TEL<sup>11</sup>. Midgleye před touto látkou varovalo několik chemiků, ten na tyto informace příliš nedbal<sup>13,16</sup>, i ke své vlastní škodě. V roce 1923 pocítil příznaky otravy a musel si dopřát rekonvalescenci na Floridě<sup>1,3,9,16</sup>. Také jeho spolupracovníci trpěli určitými potížemi<sup>9</sup>. Velice konkrétní popis nebezpečnosti TEL „že TEL je bezbarvá kapalina nasládlého zápachu, velmi jedovatá, pokud se vstřebává kůží, což má za následek otravu olovem téměř okamžitě“ mělo také od počátku vedení firmy DuPont<sup>16</sup>. První benzín s přísadou ETHYL se začal prodávat v únoru 1923 v Daytonu<sup>13,16</sup>. První zákazníci brzy zjistili, že se vyplatí dát za galon o pár centů navíc<sup>10,13</sup>, když se zbaví otravného klepání a výkon motoru citelně vzroste<sup>16</sup>. Ale už v roce 1922 americká Veřejná zdravotní služba varovala před nebezpečím výroby olovnatého paliva<sup>11,16</sup>. Aby čelil těmto varováním, obrátil se GM roku 1923 na Úřad pro doly („Bureau of Mines“), aby provedl testy na zvířatech, která měla určenou dobu inhalovat výfukové plyny motoru běžícím na benzín s ETHYLEM. Na základě příznivých výsledků těchto testů dospěl úřad Bureau of Mines k závěru, že není žádné nebezpečí z otravy olovem z výfuků automobilů<sup>13,16</sup>. V prosinci 1922 vedoucí lékař Americké veřejné zdravotní služby („Surgeon General“) H. S. Cumming navrhol, aby vzhledem k možnosti kumulativní otravy olovem se trvale sledovalo zdravotní riziko spojené s rozsáhlým používáním tetraethylolova v palivu. Nebyla ale pořízena žádná skutečná experimentální data. Midgley pouze Cummingovi sdělil, že firmy GM a DuPont věří, že „běžná ulice bude pravděpodobně tak bez olova, že bude nemožné ho detekovat nebo nějak absorbovat“ (cit.<sup>16,17,21</sup>).

Jedovatost TEL se ale brzy provalila při jeho výrobě, kde došlo k řadě neštěstí. Snaha rychle spustit výrobu vedla u obou prvních produkčních závodů k zanedbání řady bezpečnostních a hygienických opatření (některé výrobní operace se prováděly v otevřených nádobách bez dostatečné ventilace) a nedostatečnému školení obsluhy<sup>13,16</sup>. V malé továrně Standard Oil v Bayway v New Jersey došlo v říjnu 1924 k úmrtí 5 dělníků a 44 dalších muselo být hospitalizováno s vážnou otravou<sup>13</sup>. Midgley byl tím sklíčený, Kettering ho však přesvědčoval, že to je nevyhnutelná cena za pokrok<sup>10,11</sup>. Tragédie v továrně se chopil tisk<sup>16</sup>, který šířil paniku z úniku „šíleného plynu“. Na svolané tiskové konferenci společnost Standard Oil odmítla fámy o šíleném plynu. Přiznala, že zjištěné zdravotní škody vznikly otravou olovem, jejíž příčinou byly dočasné potíže při zavádění nového výrobního procesu a nedodržování bezpečnostních opatření ze strany zaměstnanců<sup>13,16</sup>. Na konferenci museli vystoupit Kettering i Midgley, kteří obhajovali TEL jako jediný dostupný prostředek k rozvoji automobilového průmyslu s významným dopadem na celé americké hospodářství<sup>16</sup>. Aby otupil obavy veřejnosti z jeho jedovatosti, Midgley neváhal riskovat své zdraví – před novináři si TEL potíral ruce a vdechoval jeho výparů<sup>6,9,13</sup>. Přesto firma Standard Oil musela

na podzim roku 1925 uzavřít svůj závod v Bayway a Kettering i Midgley museli opustit své funkce ve společnosti Ethyl Gasoline Corporation<sup>9,11,16</sup>. Některé státy jako New Jersey, New York a město Filadelfie v roce 1925 výrobu a distribuci TEL na svém území zakázaly<sup>13,16</sup>. Podobné problémy s úmrtím a otravou pracovníků v období 1923–1925 měly i továrny na TEL firmy DuPont<sup>13,16</sup>. Tyto případy ale nebyly tolik medializovány. Midgley v roce 1925 napsal ve své publikaci<sup>24</sup>: „The actual hazard involved in the general program of treating gasoline with tetraethyl lead has been found to exist only in the manufacture and handling of the concentrated material.“ Tím vlastně označil benzín vylepšený přídavkem TEL za bezpečný. Zvláštní výbor jmenovaný hlavním lékařem Cummingem 19. ledna 1926 vydal prohlášení<sup>13,16</sup>, že „neshledal žádné dobré důvody“ pro zákaz prodeje benzínu s TEL. Poté byly regulační bariéry postavené některými státy a zdravotnickými úřady zrušeny a TEL se od roku 1926 mohl nadále používat. Zůstalo pouze doporučení dále sledovat jeho účinky<sup>13,16</sup>. Společnosti prosazující olovnaté aditivum se rozhodly si pojistit příznivé odborné posudky. Charles Kettering proto najal lékaře-toxikologa Roberta A. Kehoea<sup>13,16,21</sup> z Univerzity v Cincinnati, který se v roce 1925 stal hlavním lékařským poradcem společnosti Ethyl Corporation a údajnou nezávadnost benzínů s TEL obhajoval dobrých 30 let až do svého odchodu do důchodu<sup>13,16</sup>.

### 3.5. Vliv olovnatých benzínů na zamoření životního prostředí olovem

Pro vysokou antidetonační účinnost TEL se jeho použití v USA rychle rozšířilo. V roce 1936 se přípravek ETHYL (v podstatě TEL naředěný benzínem s přídavkem 1,2-dibromethanu a 1,2-dichlorethanu pro odstraňování olovnatých zplodin a s červeným barvivem pro označování olovnatého paliva) používal již v 90 % automobilového benzínu<sup>3,16</sup>. V roce 1963 podíl olovnatého benzínu přesáhl 98 % (cit.<sup>3,13</sup>). Toto palivo si získalo všeobecnou oblibu, protože antidetonační efekt TEL umožnil zavedení vysokokompresních motorů, čímž se dramaticky zvýšila účinnost spalování, které se promítlo do výrazného snížení průměrné spotřeby automobilových motorů (která od roku 1924 do roku 1974 spadla na méně než polovinu<sup>16</sup>). Charles Kettering v roce 1958 odhadoval, že tím američtí řidiči uspořili 5 až 8 miliard dolarů ročně<sup>10</sup> a upozorňoval i na příznivý ekologický efekt v důsledku nespálení ušetřeného paliva. Ovšem podobný efekt by byl dosažitelný i při použití jiné (bezolovnaté) antidetonační přísady, například lihové, pokud by ovšem její použití bylo stejně efektivně prosazováno. Vedlejší pozitivní působení olovnatých benzínů spočívalo ve výrazném snížení opotřebení motorů, protože olovnaté zplodiny „promazávaly“ ventily a jejich sedla<sup>25</sup>. Po opuštění od jejich používání se musely přidávat do benzínů zvláštní přísady nebo bylo nutno motory pro bezolovnaté benzíny upravit.

Množství olova spotřebovaného na výrobu benzínu činilo v USA v roce 1930 asi 20 tisíc tun, které pak dramaticky vzrůstalo až na nejvyšší hodnotu 279 tisíc tun

olova pro rok 1970, poté už toto množství začalo pomalu klesat, protože se výroba olovnatých benzínů začala pomalu omezovat<sup>13</sup>. Nicméně celková suma takto spotřebovaného olova se jen v USA odhaduje na 7 milionů tun (cit.<sup>16</sup>).

Při spalování olovnatých benzínů se většina olova dostává do atmosféry ve formě aerosolu<sup>26</sup>, tvořeného jemnými částicemi oxidů a uhličitánů olova o velikosti od 0,1 do 2  $\mu\text{m}$ . Tyto aerosoly se mohou snadno prostřednictvím vzdušných proudů přesouvat na velké vzdálenosti a rozpustnost aerosolů olova v dešťové a povrchové vodě otvírá další cestu olova do životního prostředí<sup>26</sup>. Většina z ohromujícího množství olova pocházejícího z benzínů tak zůstává v půdě, vzduchu a vodě a v tělech živých organismů. Zpráva britské Královské komise pro znečišťování životního prostředí z roku 1983 dospěla k závěru, že olovo bylo ve dvacátém století člověkem rozptýleno tak široce, že „je pochybné, zda nějaká část zemského povrchu nebo jakákoli forma života zůstává nekontaminována antropogenním (člověkem vyrobeným) olovem“ (cit.<sup>16</sup>). I když olovo z těžby, barev, tavení a dalších zdrojů je stále vážným ekologickým problémem, zpráva americké vládní Agentury pro toxické látky a registr nemocí odhaduje, že spalování benzínu představuje 90 % olova umístěného do atmosféry od 20. let 20. století<sup>3,16</sup>. Podle článku z roku 1992 v časopise *The New England Journal of Medicine* jsou průměrné hladiny olova v kostech moderních lidí 625krát vyšší než u předkolumbovských obyvatel Severní Ameriky<sup>3,16</sup>. I když koncentrace olova na zemském povrchu i v atmosféře jsou relativně nízké, jeho toxický účinek je kumulativní. Významné nebezpečí zvláště pro dětský organismus je napadání nervového systému, což je příčinou zpomalení duševního vývoje a zvýšení duševních poruch v dospělosti. Světová zdravotnická organizace odhaduje, že 15 až 18 milionů dětí v rozvojových zemích (kde se nejdéle udrželo používání olovnatého paliva) trpí trvalým poškozením mozku v důsledku otravy olovem<sup>3</sup>.

První vědecké důkazy o celosvětové otravě životního prostředí olovem přinesl americký geochemik Clair Cameron Patterson v roce 1965 (cit.<sup>1,3,16,27</sup>). Ten v rámci svého projektu určování stáří hornin vypracoval přesnou metodu na stanovení stopových množství olova<sup>27</sup>. Zjistil, že kontaminace přírody olovem začala trvale a nebezpečně narůstat brzy poté, co se v pohonných hmotách začalo používat tetraethylolovo. Dlouho byla jeho zjištění zpochybňována a odmítána. Jeho tvrdým odpůrcem byl zejména již zmíněný Robert Kehoe<sup>27</sup>. Až v 70. letech 20. století byla Pattersonova práce přijata a jeho data uznána. Zvýšené povědomí o negativních účincích olovnatého benzínu na zdraví vedlo od 70. let k jeho postupnému vyřazování, které bylo dokončeno v USA sice až v roce 1995, ale přineslo prokazatelný efekt<sup>13</sup>, neboť koncentrace olova v krvi Američanů za období 15 let poklesla o 78 %. Zavádění katalyzátorů pro čistější provoz automobilů uspišilo konec používání olovnatých benzínů, protože olovené zplodiny by drahé katalyzátory zničily. Na úplný zákaz olovnatých benzínů došlo v EU roku 2001 (cit.<sup>25</sup>), také v České republice jeho prodej skončil k 1. lednu 2001 (cit.<sup>28</sup>).

## 4. Příběh freonů

Druhý objevitelský příběh Thomase Midgleye se týká freonů. Stejně jako v případě tetraethylolova mu přinesl nejdříve slávu a ocenění, po dlouhých letech pak odsuzování až hanbu. Na rozdíl od několikaletého strastiplného hledání antidetonačního činidla se tentokrát úspěch dostal velmi rychle, podle některých zdrojů<sup>2,9</sup> už během tří dnů. Popis vzniku freonů jako velmi úspěšného chladírenského média by tudíž mohl být velice stručný, kdyby ovšem nebyl provázen řadou nevyjasněných okolností, které umožňují různé pohledy na jednotlivé fáze výzkumu, které se dodnes diskutují<sup>14</sup>.

### 4.1. Sporný rok vzniku freonů

Objev freonů je spojen se společností Frigidaire a opět se jménem Charlese Ketteringa. Firma Frigidaire zažívala pod začleněním do koncernu GM ve dvacátých letech 20. století úspěšné období<sup>14</sup>. Americké domácnosti se tehdy začaly hromadně vybavovat ledničkami. Prodej 65 tisíc ledniček v roce 1925 vzrostl v roce 1929 až na 730 tisíc (cit.<sup>6,14</sup>), na čemž se významně podílela společnost Frigidaire, která prodala roku 1929 svou miliontou lednici. Hodlala dále expandovat, především v průmyslové oblasti do chlazených boxů a do mrazicích prodejních pultů, ale také do domácích klimatizačních jednotek<sup>14</sup>. V roce 1928 (údajně) se firma Frigidaire obrátila na Charlese Ketteringa, který byl šéfem vývojových laboratoří GM, s požadavkem na vývoj nového chladicího média, které by mělo mít teplotu varu v rozmezí 0 až  $-40$  °C a které by mělo být zvláště s ohledem na použití v domácích zařízeních bezpečnější, tedy nejedovaté a nehořlavé. Všechna tehdy používaná chladiva, jako amoniak, chlormethan, propan, oxid siřičitý a methyl-formiát, rozhodně tato bezpečnostní kritéria nesplňovala<sup>14,15,21</sup>. Charles Kettering tímto úkolem pověřil Thomase Midgleye<sup>10,14,21</sup>. Ten a jeho spolupracovníci Albert Henne a Robert McNary ihned začali hledat řešení<sup>20</sup>. Jako výhodná pomůcka jim opět posloužila periodická tabulka prvků. S její pomocí začali hledat prvkové složení chladiva<sup>9,15,20,21,29</sup>. Nejprve vyloučili kovové prvky, které neposkytovaly těkavé sloučeniny. Skupina vzácných plynů se nehodila pro jejich extrémně nízké teploty varu. Z nekovů jako perspektivní zůstaly vodík, uhlík, dusík, kyslík, síra a halogeny. Z dostupných dat odvodili, jak lze u uhlovodíků postupnou substitucí fluorem či chlorem ovlivňovat teploty varu halogenderivátů<sup>21,29</sup>. Tato substituce současně snižuje jejich hořlavost. U derivátů methanu zjistili<sup>21,29</sup>, že pro zadané rozmezí teploty varu bude nejvýhodnější sloučeninou dichlordifluormethan  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$  (dnešní hodnota t. v.  $-29,8$  °C). Spoléhalo se na pevnost vazby C–F (cit.<sup>1</sup>), a tudíž očekávali, že látka bude i bezpečná, protože se jejím rozkladem nebude uvolňovat toxický fluorovodík. Albert Henne neprodleně přistoupil k přípravě této sloučeniny<sup>29</sup>. Použil při ní Swartzovu reakci tetrachlormethanu s fluoridem antimonitým (dichlordifluormethan připravil takto patrně Swartz už v roce 1907, ale látku necharakterizoval a Hen-

ne jeho článek z roku 1908 zcela jistě neznal<sup>15</sup>). Hned byly provedeny první testy toxicity, které ukázaly, že zvířata (psi, opice, morčata) přežila několikahodinovou inhalaci vzduchu s 20 %  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$  (testy prováděl už dříve zmíněný Robert A. Kehoe). Prvotní nadšení z vyřešení zadaného úkolu vystřídal zděšení, neboť při opakovaných testech s novým preparátem pokusná zvířata uhynula<sup>20</sup>. Takový výsledek by zcela zmařil dosavadní úsilí v projektu bezpečného chladiva. Naštěstí se ukázalo, že otravu způsobil preparát ze šarže, kdy byl použit nečistý  $\text{SbF}_3$ , z kterého se uvolňoval fosgen. Proto se nadále pracovalo jen se sublimovaným materiálem<sup>20</sup>. Testování toxicity, popis poloprovodního zařízení i způsob izolace dichlordifluormethanu popisuje publikace<sup>29</sup> zasláná Midgleyovým týmem do časopisu Industrial and Engineering Chemistry dne 10. dubna 1930 krátce poté, co byl její obsah přednesen na schůzi Americké chemické společnosti. Při této přednášce demonstroval Thomas Midgley vdechováním par nového chladiva jeho netoxičnost a sfouknutím plamene svíčky i jeho nehořlavost<sup>3</sup>.

Dalo by se očekávat, že publikačnímu zveřejnění předcházelo podání patentu. Některé z již citovaných zdrojů<sup>3,4,6,8–10</sup> udávají, že freony byly objeveny již roku 1928.

Toto datování opírají o patent podaný Charlesem Ketteringem za společnost Frigidaire 31. prosince 1928 (U.S. Patent No. 1,886,339, cit.<sup>30</sup>). Ovšem tento patentní spis má titul „Refrigerated Apparatus“ (obr. 4) a popisuje konstrukci chladicího zařízení a o novém chladivu, konkrétně o  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$ , tam není ani zmínka. Skutečně první patent týkající se freonů s názvem „Manufacture of Aliphatic Fluoro Compounds“ je U.S. Patent No. 1,930,129, který podali Thomas Midgley, Albert Henne a Robert McNary dne 30. dubna 1930 (obr. 5, cit.<sup>31</sup>). Tento patent nárokuje prioritu přípravy fluorovaných derivátů uhlovodíků obecně (na principu Swartzovy reakce) a pro dichlordifluormethan udává i detailní popis optimálního řízení reakce a způsob izolace produktu (pouze na tento patent odkazuje i další publikace<sup>32</sup> o přípravě fluoruhlovodíků z roku 1934).

Pro dokreslení pozadí rozporného datování je významný rok 1929, kdy došlo v Chicagu a v Clevelandu ke dvěma rozsáhlým požárům, při nichž zahynulo přes sto osob. Oba požáry vznikly poruchami chladicích zařízení, ze kterých unikl hořlavý chlormethan<sup>14,33</sup>. To vyvolalo mnoho diskusí o bezpečnosti jeho používání. Tato kritika se sice přímo společnosti Frigidaire netýkala, protože ta

Patented Nov. 1, 1932

1,886,339

## UNITED STATES PATENT OFFICE

CHARLES F. KETTERING, OF DAYTON, OHIO, ASSIGNOR TO FRIGIDAIRE CORPORATION, OF DAYTON, OHIO, A CORPORATION OF DELAWARE

## REFRIGERATING APPARATUS

Application filed December 31, 1928. Serial No. 329,428.

This invention relates to refrigerating apparatus of the absorption type. One of the objects of the invention is to provide absorption refrigerating apparatus which may be readily and effectively cooled by air. Another object is to provide an apparatus using solid absorbent and which produces substantially continuous refrigeration. Still another object of the invention is to provide an improved and simplified arrangement of the component parts of the apparatus. Further objects and advantages of the present invention will be apparent from the following description, reference being had to the accompanying drawings, wherein a preferred form of the present invention is clearly shown. In the drawings: Fig. 1 is a diagrammatic illustration of a refrigerating system embodying the invention, certain parts being shown in section; Fig. 2 is a plan of a portion of the apparatus shown in Fig. 1; Fig. 3 is a section on the line 3–3 of Fig. 1; Fig. 4 is an enlarged section of a control valve; Fig. 5 is an enlarged section of a thermostat corresponding to Fig. 3; and Fig. 6 is a section of the thermostat on the line 6–6 of Fig. 5. The refrigerating system shown in the drawings includes two generator-absorbers 10 and 11 each of which is charged with a suitable absorbent, preferably a solid such as calcium chloride or activated charcoal. Each intermittently supplies liquid refrigerant, for example ammonia, to an evaporator 12 and intermittently withdraws gaseous refrigerant from the evaporator. The generator-absorber 10 is connected to one end of the evaporator by means of the conduit including the conduit 10a, condenser 10b and control valve 10c, while the generator-absorber 11 is similarly connected to the other end of the evaporator through the conduit 11a, condenser 11b and control valve 11c. When either generator-absorber is heated and the other generator-absorber is simultaneously cooled,

liquid refrigerant is supplied to the evaporator by the heated generator-absorber and its condenser and gaseous refrigerant is withdrawn from the evaporator by the cooled generator-absorber. This eventually exhausts the heated generator-absorber of its refrigerant and saturates the cooled generator-absorber with refrigerant. When one generator-absorber has thus been exhausted, the heating and cooling are reversed so that the saturated generator-absorber is now heated to distill refrigerant and the exhausted one cooled to absorb the refrigerant. Each generator-absorber may be formed in any suitable manner, for example by a pair of co-axial tubes 14 and 15, the space between which is closed by plates 16 to form a substantially annular chamber 17 in which the absorbent is placed. The inner tube 15 forms a flue both for heating and cooling the generator-absorber and for this purpose is provided on its interior surface with fins 18 to increase the rate of heat flow into or out of the generator-absorber. The outer tube 14 is provided with an inlet and outlet passage 19 for the chamber 17, connected to the conduit 10a or 11a. The means for heating either generator-absorber is a burner 22 which may be placed at the lower extremity of the flue provided by the tube 15. The means for cooling either generator-absorber is a flue with which is associated a fan or blower 24 and which may be placed to direct a current of air through the flue 15. As illustrated, the blower is of the centrifugal type having its intake at the connection 25, but the particular form of air-moving device is immaterial to the invention. The flue includes a stationary portion 25 and a movable portion 26 in the general form of a goose-neck which may be rotated about the connection 27 so that its intake end 28 may register with the flue in either generator-absorber 10 or 11. The burner is preferably surrounded by and supported in a shield 29 adapted to form an extension of the flue 15. The shield and intake end 28 of the flue are connected to and supported by a plate 34 which is keyed to a shaft 35 journaled in stationary bearings 36 which are in alignment

Patented Oct. 10, 1933

1,930,129

## UNITED STATES PATENT OFFICE

1,930,129

## MANUFACTURE OF ALIPHATIC FLUORO COMPOUNDS

Thomas Midgley, Jr., Worthington, Albert I. Henne, Columbus, and Robert R. McNary, Dayton, Ohio, assignors to Frigidaire Corporation, Dayton, Ohio, a corporation of Delaware

Application April 5, 1930. Serial No. 441,815

33 Claims. (Cl. 269–162)

This invention relates to the manufacture of fluorine derivatives of hydrocarbons. An object of our invention is to provide a process for the manufacture of fluorine derivatives and particularly for the manufacture of the fluorine derivatives of aliphatic hydrocarbons. In its generic aspect, our process comprises the novel combination of steps including the interaction of an aliphatic halide with a fluorinating agent to substitute at least one fluorine atom for halogen other than fluorine, the separation by dephlegmation and fractionation of the insufficiently fluorated products as they are formed, and the return from the dephlegmator directly to the reaction field, of the separated insufficiently fluorated products. The nature of the fluorinating agent is immaterial. In its more specific aspect, our process comprises controlling the conditions of the reaction to minimize the formation of over-fluorated products and controlling the temperature and pressure of the dephlegmator to approximate the vapor pressure curve of the fluorated product destined to thereby ensure practically complete separation by condensation of the insufficiently fluorated products. Our process, because it minimizes the formation of over-fluorated products and because it returns direct from the dephlegmator to the reaction field the insufficiently fluorated products, results in an extremely high yield of the fluorated product desired. For the purpose of more clearly disclosing our process we have shown in Figs. 1 and 2 diagrammatic illustrations of two forms of apparatus wherein the individual steps may be carried out. The apparatus disclosed in Fig. 1 comprises a reaction chamber 20 connected to a dephlegmator 24 through a fractionating column 23. The top of the dephlegmator is connected to two serially arranged washers 25 and 26 and washer 26 is in turn connected in series to a drier 27. At its upper end the drier 27 is connected through a condenser 32 to a liquid receiver 33. The reaction chamber 20 is provided with heating means, herein shown as a steam or hot fluid jacket 23a. The reaction chamber is also provided with an opening 22, which opening is covered by means of a removable cover, and an opening 22a is provided in the bottom of the reaction chamber. The opening 22 may be used for the supply of raw material while the opening 22a may be used for the removal of the residual products. The reaction chamber 20 may also, if desired, be provided with reacting materials from the supply chamber 21 by means of the pump 36 herein shown as a gas chamber. The reaction chamber 20 is also provided with a suitable safety release diaphragm 34 and with a pressure gauge 35. The dephlegmator is provided with cooling means which in Fig. 1 is shown in the form of a jacket 28 for cooling fluid. Washers 25 and 26 are provided with a diluted aqueous solution of caustic soda and this solution may be replenished periodically from supply chambers 29 and 30 respectively. The drier 27 contains a concentrated solution of sulphuric acid and this solution may likewise be replenished periodically from the supply chamber 31. The temperature of the dephlegmator 24 is controlled in accordance with the pressure employed so that the pressure temperature conditions are in the neighborhood of the vapor pressure curve of the compound desired. The pressure within the system is obtained in this particular case by correlating the discharge through the valve 32a to the reaction rate. This valve may be either manually or automatically controlled. As a specific example, dichloro-difluoro methane may be obtained by interacting carbon tetrachloride with a fluorinating agent in the presence of a catalytic agent in the reaction chamber 20 and removing the dichloro-difluoro methane from the dephlegmator as it is formed. For instance, carbon tetrachloride is introduced into the reaction chamber from the supply chamber 21 and a fluorinating agent  $\text{SbF}_5$  together with a catalyst such as  $\text{SnCl}_4$  are introduced into the reaction chamber 20 through the removably covered opening 22. The reaction may be initiated and accelerated by warming the reaction chamber 20 as for example by maintaining the steam jacket 23 under a steam pressure of about 90 lb. gauge. The gaseous reaction products rise through the fractionating column 23 and the reflux for the column is obtained from the dephlegmator 24. The temperature of the dephlegmator is maintained at approximately the proper temperature by circulating water through the jacket 28 at about a temperature of 15 to 20° C. when the pressure in the reaction chamber is maintained at about 30 lb. At this temperature and pressure,  $\text{CCl}_4\text{F}_2$  is obtained from the top of the dephleg-

Obr. 4. Ketteringův patent z roku 1928 (cit.<sup>30</sup>), 3. strana (na str. 1 a 2 jsou nákresy aparatur)Obr. 5. Patent o přípravě freonů z roku 1930 (cit.<sup>31</sup>), 3. strana (na str. 1 a 2 jsou nákresy aparatur)

tehdy používala jako chladivo oxid siřičitý<sup>14</sup>. Po katastrofických událostech v roce 1929 se ale řada domácností začala provozu domácích lednic obávat<sup>6,33</sup>. Takový stav nemohla společnost Frigidaire pro svou expanzi potřebovat a náladu veřejnosti mohl změnit objev bezpečného chladiva. To vysvětluje angažovanost koncernu GM ve vývoji nového bezpečného chladiva, přitom šéfům patrně velice záleželo na tom, aby se jeho vývoj datoval už rokem 1928 (podle Ketteringova patentu), a tudíž nebyl chápán až jako následná reakce na tragické události v roce 1929 (cit.<sup>14</sup>).

#### 4.2. Nejasnosti kolem struktury prvního freonu

Kromě dvojího datování vznikla ještě další otázka týkající se vzniku freonů, a to která sloučenina byla tou první, kterou Albert Henne jako cílové chladivo připravil. V přednášce na schůzi Americké chemické společnosti v roce 1930 Thomas Mitgley mluvil o dichlordifluormethanu  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$ , stejná sloučenina figuruje i v publikaci<sup>31</sup>, která je tištěnou formou přednášky. Také v patentu<sup>32</sup> je shodně uváděn dichlordifluormethan  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$ . Ovšem o 7 let později v přednášce na schůzi Americké chemické společnosti, při které Thomas Mitgley přebíral Perkinovu medaili za rok 1937, opakovaně hovořil o dichlormono-fluormethanu  $\text{CHFCl}_2$ . Jeho řeč byla přepsána do publikace<sup>20</sup>, a tak také v jejím textu je tento monofluorderivát několikrát písemně zmíněn jako první vyvinuté chladivo (proto článek<sup>15</sup> uvádí jako první syntetizovanou sloučeninu dichlorfluormethan R-21 a ne dichlordifluormethan R-12). Jmenování jiné než původně uváděné struktury<sup>32</sup> tak nelze vysvětlit jako náhodný omyl. Nabízí se ale vysvětlení, že v Midgleyově skupině se roku 1930 mluvilo i o dichlormonofluormethanu (například v souvislosti s optimalizací výroby  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$ ) a delší časový odstup (ve kterém se Midgley již zabýval jinými úkoly, hlavně v oblasti přírodního a syntetického kaučuku) tak zapříčinil záměnu, která vyvolala mnoho diskusí. V tomto případě všechny nejasnosti vysvětlil Albert Henne, který jako graduovaný chemik a hlavní aktér přípravy jednoznačně potvrdil, že první cílovou sloučeninou byl dichlordifluormethan  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$ .

#### 4.3. Výroba a použití freonů

V roce 1930 firmy General Motors a DuPont založily společnost Kinetic Chemical Company<sup>33,34</sup>, která v následujícím roce spustila výrobu velkého množství dichlordifluormethanu, prodávaného pod obchodním názvem Freon-12 (firma DuPont zavedla pro fluorované uhlovodíky obchodní značku freony<sup>33,34</sup>. Chlor-fluorované uhlovodíky se označují zkratkou CFC (Freon-12 se uvádí také jako CFC-12 nebo R-12, značení freonů viz cit.<sup>34</sup>). Do roku 1935 firma Frigidaire a další výrobci prodali ve Spojených státech 8 milionů nových chladniček<sup>33</sup> používajících Freon-12. V roce 1932 společnost Kinetic Chemical Company začala vyrábět rovněž trichlorfluormethan (Freon-11), který hned použila v první domácí klimatizač-

ni jednotce<sup>33</sup>. V roce 1936 začala (s odborným přispěním Midgleye<sup>9</sup>) vyrábět také hydrochlorofluoruhlovodíky HCFC, označované jako „měkké“ freony.

Freony se staly preferovaným chladivem ve velkých chladírenských zařízeních<sup>34,36,37</sup>. Koncem 50. a začátkem 60. let 20. století díky freonům došlo ke značnému rozšíření klimatizačních jednotek v domácnostech a kancelářských budovách a vzrostl zájem i o klimatizované automobily. Produkce freonů neustále vzrůstala, protože se freony používaly i jako hnací plyny ve sprejích sloužících jako barvy, prostředky proti hmyzu, laky na vlasy, kondicionéry, desinfekce a další produkty zdravotní péče. Před rokem 1987 se ve světě spotřebovávalo okolo 1,1 mil. tun freonů ročně, z toho na dnešní ČR připadalo přes 5500 tun, tedy přibližně 0,5 % světové spotřeby<sup>37</sup>.

#### 4.3. Štěpení freonů ve stratosféře a ozonová díra

Naprostá většina z vyrobeného obrovského množství freonů se dostávala do atmosféry. Přitom se negativně prosazuje jejich stálost. Životnost jednotlivých typů freonů v atmosféře je v desítkách až stovkách let<sup>35</sup> (u Freonu-12 je atmosférický poločas rozpadu 100 let<sup>35</sup>). Jejich přítomnost v atmosféře nezpůsobuje žádné zdravotní potíže, ale jejich molekuly se dostávají až do stratosféry, kde způsobují vážné problémy. V roce 1974 vědci M. J. Molina a R. S. Rowland ve svém článku v časopisu Nature<sup>38</sup> poukázali na možnost jejich rozkladu působením UV záření a na jejich následný vliv na ozonovou vrstvu. UV záření ve stratosféře štěpí molekuly chlorofluoruhlovodíků na radikály<sup>36</sup>. Nebezpečný je primárně vzniklý chlorový radikál  $\text{Cl}^\bullet$ , který následně reaguje s molekulou ozonu  $\text{O}_3$ , čímž vzniká nový radikál  $\text{ClO}^\bullet$ . Ten v reakci s další molekulou ozonu  $\text{O}_3$  regeneruje původní radikál. Tímto cyklem může jeden chlorový radikál rozložit až 100 000 molekul ozonu<sup>37</sup>. Freony tak výrazně snižují obsah ozonu ve stratosféře, což je znepekující, neboť ozonová vrstva působí jako filtr ultrafialového záření s vlnovou délkou 280–320 nm (typu B a C), které je karcinogenní a poškozuje zrak<sup>35,38</sup>.

V důsledku nízkých teplot a převažujícího cirkulárního proudění je rozklad ozonu nejvýraznější v polárních oblastech, kde vzniká tak zvaná ozonová díra<sup>39</sup>. Ozonová díra byla poprvé pozorována počátkem 80. let 20. století nad Antarktidou. V roce 1985 tam poklesla koncentrace ozonu na polovinu dlouhodobého průměru. Rekordní snížení bylo zaznamenáno v letech 1992 až 1993. Mechanismus zhoubného působení freonů na ozonovou vrstvu byl mnoha měřeními potvrzen a vědci Mario J. Molina a F. Sherwood Rowland spolu s Paulem J. Crutzenem se za svá zjištění dočkali v roce 1995 Nobelovy ceny za chemii<sup>39</sup>.

Pro zachránění ozonové vrstvy bylo třeba provést některá zásadní opatření. Ukázalo se, že k radikálové reakci, která ničí molekuly ozonu, nejvíce přispívají tzv. tvrdé freony (CFC). Proto byly do určité doby nahrazovány tzv. měkkými freony – hydrochlorofluoruhlovodíky (HCFC), jejichž stálost v atmosféře je nižší<sup>35,37</sup>. I to bylo vzhledem ke kritickému ohrožení ozonové vrstvy nepřijatelné. Navíc i měkké freony vykázaly výrazný příspěvek ke skleníko-



vému efektu<sup>35</sup>. Pod patronátem programu OSN na ochranu životního prostředí (UNEP) byla v roce 1985 podepsána Vídeňská úmluva, zavazující signatářské země omezit únik freonů do atmosféry. V roce 1987 byl podepsán prováděcí dokument známý jako Montrealský protokol<sup>36,41</sup>. V letech 1990 a 1992 byly přijaty dva zpřísnující dodatky (tzv. Londýnský a Kodaňský z roku 1992), cit.<sup>36,41</sup>. Na základě těchto zpřísnění průmyslové země ukončily výrobu freonů v roce 1996, státy Evropské unie již v roce 1994 (cit.<sup>39</sup>). V ČR je použití tvrdých freonů zakázáno od roku 1995, zákaz recyklovaných tvrdých freonů je platný od roku 2004 a úplný zákaz měkkých freonů vstoupil v platnost v roce 2015 (cit.<sup>40</sup>). Také asijské země měly ukončit produkci freonů do roku 2010, ve skutečnosti se tak zatím neděje, především Čína stále produkuje značné množství trichlorfluormethanu CFC-11 (cit.<sup>42</sup>). Navíc je stále třeba počítat s úniky freonů z vyřazovaných chladicích zařízení. NASA vypracovala předpověď (cit.<sup>43</sup>), podle které se má přibližně v roce 2060 kvalita ozonové vrstvy vrátit na úroveň roku 1980. Vzhledem ke stálým únikům freonů do atmosféry se tento optimistický předpoklad ale nemusí vyplnit.

## 5. Závěr

Olovnatý benzín a podobně i freony byly lidskou společností zavrženy až v samém konci 20. století. Má být s nimi zavržen i jejich původce Thomas Midgley, Jr., který byl v té době už 50 let po smrti? Vysoká škodlivost jeho produktů se projevila až s jejich obrovskou spotřebou. To ale znamená, že společnost v určité fázi svého vývoje kvalitní benzínu i bezpečná chladiva nutně potřebovala. Dalo by se říci, že Thomas Midgley svými produkty „trefil hřebík na hlavičku“. Přesnější ale je, že to byla trefa jeho šéfa, on byl „pouze“ osobou, která svým pracovním zápalem a kreativitou jejich zadání splnila (podle tehdejších kritérií) na podtrženou jedničku.

Od doby jeho činnosti musela uplynout dlouhá doba, než se svět naučil s vědeckými poznatky správně zacházet a s jejich uplatněním počkat až po vyjasnění všech jejich předností a nedostatků. Taková praxe a opatrnost nebyla v první polovině 20. století běžná a často ani uskutečnitelná. Firmy Frigidaire a DuPont (a tím ještě méně samotného Thomase Midgleye) není možno obviňovat z „neodpovědného“ uvedení freonů na trh, protože ve 30. letech 20. století nebyla možnost zkoumat fotolytické štěpení freonů ani jejich reakci s ozonem ve stratosféře.

Jiná situace byla při zavádění olovnatého benzínu. V tomto případě nemá Thomas Midgley čistý štít, ale hodně špíny spadá i na jiné. Od samého počátku Midgley věděl o vysoké toxicitě tetraethylolova a podílel se na jejím zatajování před veřejností, i když v tomto směru vykonali možná větší úsilí zejména Charles Kettering a Robert Kehoe. Thomas Midgley i ke své vlastní škodě hrubě podceňoval toxicitu olova a vůbec ji nebral v úvahu u spalín olovnatého benzínu. Nedokázal si představit (a možná ani nechtěl) množství olova, které se ze spalín dostane do

životního prostředí a považoval ho za zanedbatelné vedle jiných zdrojů. Zcela opustil ethanolové řešení nežádoucího klepání motorů, které zpočátku prosazoval. K jeho pozdějšímu postoji je možno jako omluvu uvést, že se podřídil nátlaku jeho šéfa Ketteringa i vedení firmy GM jako zaměstnavatele. Rozvoj olovnatých benzínů a potlačení všech obav z jejich užívání velice umožnily americké předpisy, které veškeré testy nových výrobků přenášely na jejich producenty. U přípravku ETHYL si tak firma GM prostřednictvím práce Roberta Kehoe mohla pohodlně a dlouhodobě zajišťovat příznivé výsledky.

Na začátku 40. let dvacátého století stanul Thomas Midgley na vrcholu své vědecké kariery a vydobyl si všeobecné uznání. V roce 1941 získal své nejprestižnější ocenění, když mu Americká chemická společnost udělila Priestleyho medaili. Cítil ale, že mu ubývají síly, omezil svá veřejná vystupování a pracovní aktivitu. Chtěl dát příležitost mladým. Jako prezident Americké chemické společnosti na výročním zasedání v roce 1944 přednesl svůj projev s názvem „Důraz na mládež“. Žádoucí podporu mladých zdůvodnil analýzou záznamů Patentového úřadu Spojených států amerických, které ukázaly, že 90 % ze skupiny vynikajících vynálezů podali muži mladší 45 let.

V roce 1940 se Midgley trvale přestěhoval do svého luxusního sídla ve Worthingtonu v Ohio, kde si chtěl užívat jeho pohodlí a klidu<sup>9</sup>. Do jeho plánů ale krutě zasáhla nemoc. Na podzim roku 1940 se stal po akutním záchvatu poliomyelitidy<sup>1,2,6,9,17</sup> rázem polovičním invalidou. Nemohl ovládat spodní polovinu svého těla. S touto tělesnou nemohoucností, která ho velmi tížila, bojoval svým technickým přístupem – vybudoval si systém kladek, které mu umožňovaly přesun v místnosti. Toto zařízení se mu ale stalo osudným. Dne 2. listopadu 1944 byl nalezen mrtev důsledkem uškrcení ve spleti lanek kladkového zařízení. Koroner do své zprávy uvedl, že šlo o sebevraždu<sup>18</sup>. Také Midgleyův přítel Boyd, když tuto zlou zprávu oznámil vdově, jí řekl, že nešlo o nehodu. Thomas Midgley byl ovšem tak váženou a uznávanou osobou, kterou se společensky nehodilo spojovat se sebevraždou, takže oficiálně se udávalo, že šlo o nešťastnou náhodu. Do možnosti plánované sebevraždy dobře zapadá Midgleyovo předcházející bilancování jeho života a dosti vypovídající epita<sup>6,18</sup>, který si několik měsíců před svou smrtí připravil: „This one did a lot of living in a mighty little while.“ (cit.<sup>18</sup>). Někdy se uvádí, že Midgleyův tragický konec je boží trest nebo důsledek prokletí<sup>6</sup>, které si vysloužil za ohrožení lidstva svými vynálezy. Ale spíše než kletba měl vliv na jeho smutný konec dlouhodobý kontakt s olovem a dalšími otravnými látkami, které postupně decimovaly celé jeho tělo i mozek.

Na Midgleyově pohřbu kazatel přečetl z Bible známý verš: „Nic jsme na svět nepřinesli a nic si také neodnese-me.“ (1 Tim 6,7). Při odchodu k tomu Charles Kettering poznamenal, že v případě Thomase Midgleye by bylo vhodné doplnit: „ale můžeme toho hodně nechat za sebou pro dobro světa.“ (cit.<sup>17</sup>). A nyní, 80 let od jeho smrti (2. 11. 1944), musíme záznam jeho životního příběhu

zakončit stále nevyřešenou otázkou: Bylo to vše pro dobro světa?

## LITERATURA

1. [https://en.wikipedia.org/wiki/Thomas\\_Midgley\\_Jr](https://en.wikipedia.org/wiki/Thomas_Midgley_Jr), staženo 1. 2. 2024.
2. <https://www.britannica.com/biography/Thomas-Midgley-Jr>, staženo 1. 2. 2024.
3. <https://www.bbvaopenmind.com/en/science/research/thomas-midgley-harmful-inventor-history/>, staženo 1. 2. 2024.
4. <https://www.smithsonianmag.com/smart-news/one-man-two-deadly-substances-20th-century-180963269/>, staženo 12. 2. 2024.
5. McNeill J. R.: *Something New Under the Sun: An Environmental History of the Twentieth-Century World*. Norton, New York 2001. Citováno podle recenze knihy, viz [https://web.archive.org/web/20040328013401/http://dizzy.library.arizona.edu/ej/jpe/volume\\_9/1101bess.html](https://web.archive.org/web/20040328013401/http://dizzy.library.arizona.edu/ej/jpe/volume_9/1101bess.html), staženo 1. 2. 2024.
6. <https://zpravy.aktualne.cz/ekonomika/auto/antihrdina-minuleho-stoleti-kdysi-byl-povazovan-za-genia-dne/r~95a23856e13011e99ec9ac1f6b220ee8/>, staženo 1. 2. 2024.
7. <https://zoom.iprima.cz/veda-a-technika/thomas-migley-olovo-freony>, staženo 1. 2. 2024.
8. <https://www.famousscientists.org/thomas-midgeley-jr/>, staženo 1. 2. 2024.
9. <https://www.daytoninnovationlegacy.org/midgley.html>, staženo 1. 2. 2024.
10. <https://www.daytoninnovationlegacy.org/kettering.html>, staženo 1. 2. 2024.
11. <https://environmentalhistory.org/people/charles-f-kettering-and-the-1921-discovery-of-tetraethyl-lead/>, staženo 6. 2. 2024.
12. Seyferth D.: *Organometallics* 22, 2346 (2003).
13. Seyferth D.: *Organometallics* 22, 5154 (2003).
14. Giunta C. J.: *Bull. Hist. Chem.* 31, 66 (2006).
15. McLinden M. O., Huber M. L.: *J. Chem. Eng. Data* 65, 4176 (2020); <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jced.0c00338>.
16. Kitman J. L.: *The Secret History of Lead*. The Nation, March 2000, <https://www.thenation.com/archive/secret-history-lead/>, staženo 2. 2. 2024.
17. Kettering C. F.: *Biographical Memoir of Thomas Midgley, Jr. 1889–1944*. Presented to the Academy at the Annual Meeting 1947; <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=memoir+of+Thomas+Midgley>, staženo 1. 2. 2024.
18. Boyd T. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2791 (1953).
19. [https://en.wikipedia.org/wiki/Charles\\_F.\\_Kettering](https://en.wikipedia.org/wiki/Charles_F._Kettering), staženo 3. 4. 2024.
20. Midgley T., Jr.: *Ing. Eng. Chem.* 29, 241 (1937).
21. Viana H. E. B., Porto P. A.: *J. Chem. Educ.* 90, 1632 (2013); [dx.doi.org/10.1021/ed300098d](https://doi.org/10.1021/ed300098d)
22. Midgley T., Jr. (GM Corporation): US patent No. U.S. 1,571,862 („Methods and Means for Using Motor Fuels“).
23. Midgley T., Jr. (GM Corporation): US patent No. U.S. 1,573,846 („Prevention of Fuel Knock“).
24. Midgley T., Jr.: *Ing. Eng. Chem.* 17, 827 (1925).
25. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tetraethyllead>, staženo 19. 2. 2024.
26. Navrátil T., Rohovec J.: *Vesmír* 85, 518 (2006).
27. [https://en.wikipedia.org/wiki/Clair\\_Cameron\\_Patterson](https://en.wikipedia.org/wiki/Clair_Cameron_Patterson), staženo 19. 2. 2024.
28. [https://cs.wikipedia.org/wiki/Olovnat%C3%BD\\_benz%C3%ADn](https://cs.wikipedia.org/wiki/Olovnat%C3%BD_benz%C3%ADn), staženo 19. 2. 2024.
29. Midgley T., Jr., Henne A. L.: *Ing. Eng. Chem.* 22, 542 (1930).
30. Kettering C. F. (Frigidaire Corporation): US 1886,339. („Refrigerating Apparatus“).
31. Midgley T. Jr., Henne A. L., McNary R. R. (Frigidaire Corporation): US 1,930,129. („Manufacture of Aliphatic Fluoro Compounds“).
32. Locke F. G., Brode W., R., Henne A. L.: *Ind. Eng. Chem.* 56, 1726(1934).
33. <https://www.thoughtco.com/history-of-freon-4072212>, staženo 19. 2. 2024.
34. <https://en.wikipedia.org/wiki/Freon>, staženo 19. 2. 2024.
35. [https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_refrigerants](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_refrigerants), staženo 19. 2. 2024.
36. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Freon>, staženo 19. 2. 2024.
37. <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/chlorofluorouhlovodiky-cfc>, staženo 19. 2. 2024.
38. Molina M. J., Rowland R. S.: *Nature* 249, 810 (1974).
39. [https://cs.wikipedia.org/wiki/Ozonov%C3%A1\\_d%C3%ADra](https://cs.wikipedia.org/wiki/Ozonov%C3%A1_d%C3%ADra), staženo 19. 2. 2024.
40. <https://achs.cz/rady-klimatizace/chladiva-poskozujici-ozonovou-vrstvu/>, staženo 19. 2. 2024.
41. [https://cs.wikipedia.org/wiki/Montrealsk%C3%BD\\_protokol](https://cs.wikipedia.org/wiki/Montrealsk%C3%BD_protokol), staženo 19. 2. 2024.
42. <https://www.e15.cz/magazin/vedci-zjistili-ze-nekdo-opet-ve-velkem-vypousti-freony-1347045>, staženo 7. 3. 2024.
43. <https://svs.gsfc.nasa.gov/30602>, staženo 19. 2. 2024.

**P. Holý** (*Czech Chemical Society, Chemické listy, Prague, Czech Republic*): **Who Was Thomas Midgley, Jr.**

Thomas Midgley, Jr. (1889–1944) was an American scientist and inventor. During his lifetime, he became a highly respected figure. He is best known for his discoveries of tetraethyllead and CFCs. Only as late as in the end of the 20th century he began to be blamed for the extensive environmental damage these substances caused. The article tries to summarize the available data on all the circumstances of his research work and thus show to what extent he is responsible for their harmful effects on the environment.

Keywords: Thomas Midgley, Jr., Charles Franklin Kettering, tetraethyllead, leaded gasoline, lead poisoning, CFCs, ozone hole



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.

## RYCHLEJŠÍ VÝVOJ KRYSTALIZAČNÍHO PROCESU DÍKY PROCESNÍM ANALYTICKÝM TECHNOLOGIÍM

ADÉLA BENÝŠEK BÁRTOVÁ<sup>a,b</sup> a ROMAN GABRIEL<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Teva Czech Industries s.r.o., Výzkum a vývoj, Ostravská 29, 747 70 Opava, <sup>b</sup> Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Česká republika  
Adela.Bartova@tevapharm.cz, Roman.Gabriel@tevapharm.cz

Došlo 5.2.24, přijato 4.4.24.

Vývoj procesních analytických technologií se neustále posouvá a dnes již umožňuje kombinovat několik technik do jedné měřicí sondy. V této práci jsme porovnali in-line data z FBRM sondy a sondy EasyViewer s off-line analýzami. Rekrystalizace intermediátu se ukázala být citlivá na délku domíchání, s časem docházelo k rozbíjení krystalického materiálu a k prodlužování následné filtrace. U krystalizace finální API látky jsme potvrdili správné nastavení krystalizačních parametrů, které umožnily izolaci materiálu s monomodální distribucí částic.

**Klíčová slova:** aktivní farmaceutická látka, procesní analytické technologie, krystalizace, technika FBRM, systém EasyViewer

### Úvod

Krystalizace je významnou jednotkovou operací ve farmaceutickém průmyslu, kde slouží nejenom k izolaci a čištění finálního produktu, ale, zejména v posledních letech, také k přípravě materiálu o požadovaných fyzikálně chemických vlastnostech<sup>1</sup> jako např. velikost částic, tvar krystalu (např. jehlicovité krystalky se nehodí pro přípravu látek používajících se jako nosní spreje), materiál o specifické ploše povrchu či polymorfní forma<sup>2</sup>. V posledních letech roste důležitost krystalizace, protože se zvyšují nároky na čistotu, fyzikálně chemické vlastnosti krystalického materiálu, syntetizují se komplikovanější molekuly a důraz je kladen také na opakovatelnost atributů izolovaného materiálu během vývoje a následné výroby<sup>3</sup>. Důležité z pohledu krystalizace jsou také jednotlivé intermediáty při syntéze aktivních farmaceutických látek (API), především jejich nečistotní profil a chování při následných operacích, jako je filtrace a sušení<sup>4</sup>. Se vzrůstajícími požadavky zákazníků a kontrolních úřadů na kvalitu nejen finálního materiálu se zlepšují in-line metody pro sledování krystalizace bez nutnosti odběru vzorků během procesu<sup>5</sup>. Rychlé porozumění, jak jednotlivé parametry ovlivňují proces krystalizace, je důležité pro rychlý a úspěšný vývoj. K tomu nám pomáhají stále více se rozvíjející procesní analytické technologie (PAT)<sup>5</sup>. PAT systémy slouží k analýze a monitorování procesu v reálném čase s cílem zajistit kvalitu finálního produktu. PAT nebo-li *in situ* analýzy jsou hojně používány ve farmacii<sup>6</sup> od vývoje až po výrobu a patří sem například kontinuální měření pH,

*in situ* spektroskopie<sup>7,8,9</sup>, PVM sonda<sup>10</sup>, která poskytuje mikroskopické snímky nebo FBRM sonda<sup>7,10</sup>, která zaznamenává distribuci velikosti částic.

Proces krystalizace můžeme kontrolovat vizuálně, off-line nebo in-line. Vizuální kontrola průběhu krystalizace je velmi nedokonalý způsob kontroly. Jsme schopni postřehnout např. počátek nukleace (i když oko je velmi nedokonalý nástroj) a v dnešní době je to téměř nemožný způsob kontroly. Snad jedinou výhodou je, že nepotřebujeme žádné analytické přístroje. Off-line techniky nám o vývoji krystalizace prozradí více, ale je potřeba v průběhu experimentu odebírat vzorky, které musí být částečně upraveny (např. usušeny) tak, aby byly vhodné pro analýzu. Tyto operace mohou způsobit změny ve zkoumaném materiálu a poskytnout nám tak mylný výsledek<sup>11</sup>. Off-line analýzy jsou také časově náročnější a vyžadují zapojení dalších kolegů. In-line monitoring poskytuje současně nejvíce informací o procesu v reálném čase bez nutnosti vzorkování. Sondy (Ramanova<sup>8</sup>, FTIR<sup>9</sup>, PVM<sup>10</sup>, FBRM<sup>7,10</sup>) lze použít od laboratorních reaktorů až po výrobní měřítka. Sledování procesu krystalizace *in situ* a in-line přímo ukazuje, jak jednotlivé změny procesních parametrů ovlivňují samotnou krystalizaci. Dříve platilo, jedna sonda rovná se jedna analytická technika. Abychom získali informace o distribuci částic, jejich morfologii, polymorfní formě a měnící se koncentraci během krystalizace, bylo nutné do reaktoru umístit čtyři sondy<sup>9</sup>. Takovéto uspořádání by mělo velký vliv na hydrodynamické a kinetické vlastnosti krystalizačního experimentu, nemluvě o cenové náročnosti. Technologický pokrok umožňuje kombinovat více ana-

lytických technik (mikroskopie, PSD, Ramanova spektroskopie) do jedné měřicí sondy, která poskytuje komplexní data o zkoumaném procesu<sup>6</sup>.

V této práci jsme porovnávali data získaná off-line analýzami, FBRM sondou, která monitoruje počet částic a jejich distribuci měřením těťivové délky, a data ze sondy EasyViewer, která navíc poskytuje mikroskopické snímky o vysokém rozlišení a měří turbiditu, distribuce částic vychází z obrazové analýzy. Krystalizovanými látkami byly dvě heterocyklické sloučeniny. U látky *A*, která je intermediátem při výrobě látky *B*, byla problematická filtrace během procesu „scaling-up“ do výrobního měřítka, proto bylo nezbytné správně pochopit a optimalizovat rekrystalizaci. Látka *B* je API, proto bylo třeba během vývoje procesu krystalizace co nejlépe a nejrychleji pochopit vliv jednotlivých parametrů na izolovaný materiál.

## Experimentální část

### Chemikálie a přístroje

Látka *A*, látka *B*, obě látky jsou heterocyklické sloučeniny bazického charakteru, a mravenčan látky *B* byly připraveny in-house. Dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol (EtOH) a vodný roztok amoniaku (25% v/v) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Experimenty byly provedeny ve 100 ml reaktoru EasyMax 102 (Mettler Toledo) a monitorovány sondou EasyViewer 100 (Mettler Toledo) nebo FBRM sondou (Mettler Toledo). SEM snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu TM 3030 Plus (Hitachi).

### Rekrystalizace látky *A*

Látka *A* (4 g) byla rozpuštěna ve 28 ml DMF zahřátím na 55 °C, vzniklý roztok byl ochlazen na 25 °C během 30 min a naočkován suspenzí látky *A* v EtOH (3 hm.%). Suspenze byla míchána po dobu 30 min při teplotě 25 °C. Následně byl během 15 min přidán EtOH (80 ml) jako

antisolvent, vzniklá suspenze byla míchána 4 hodiny. Vykrytalovaný materiál byl odfiltrován, promyt EtOH a sušen po dobu 8 h při 45 °C pod proudem dusíku. Celkový výtěžek rekrystalizace byl 90 %.

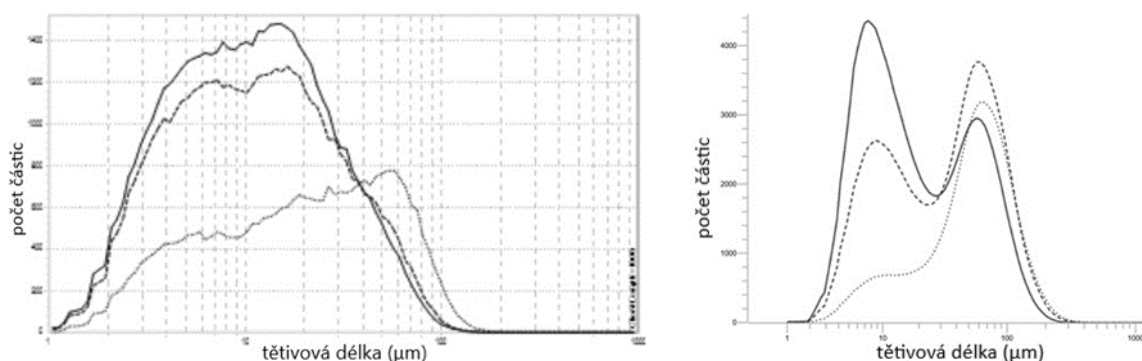
### Reakční krystalizace látky *B*

Formiát látky *B* (4 g) byl suspendován v 8 ml DMSO a 8 ml EtOH, suspenze byla zahřátá na 30 °C a pak byl přidán 25% v/v vodný roztok amoniaku (1,05 eq.). Vzniklý roztok byl naočkován suspenzí látky *B* v EtOH (3 hm.%). Okamžitě po naočkování byl do suspenze přidán EtOH (70 ml) během 30 min. Vzniklá suspenze byla 30 min míchána při 30 °C a dále ochlazená na 3 °C během 2 h. Izolovaný materiál byl promyt EtOH a sušen po dobu 8 h při 45 °C pod proudem dusíku. Celkový výtěžek krystalizace byl 75 %.

## Výsledky a diskuse

### Rekrystalizace látky *A*

Průběh rekrystalizace látky *A* jsme sledovali pomocí FBRM sondy a sondou EasyViewer. Cílem bylo porovnat jednotlivé trendy velikostí částic snímané sondami a optimalizovat proces tak, abychom zlepšili filtrovatelnost materiálu. Doba filtrace v poloprovozním měřítku byla až 12 h a ve výrobě by se čas ještě více prodloužil. Data z FBRM sondy jsou na obr. 1. První křivka (tečkovaná) odpovídá distribuci částic v suspenzi po přidavku EtOH. V suspenzi je široká distribuce velikosti částic od řádově mikronových až po částice/aglomeráty o velikosti okolo 100 μm. Během 30 min míchání po přidavku antisolventu je vidět malý nárůst drobnějších částic v rozmezí 2–40 μm. Velká změna přichází s ochlazením suspenze na 2 °C, kdy teplotní chladicí profil trval 2 h a v suspenzi jsou převážně částice o velikosti do 50 μm. K dalšímu zvětšování drobných částic dochází po celou dobu domíchání a na konci experimentu je v suspenzi

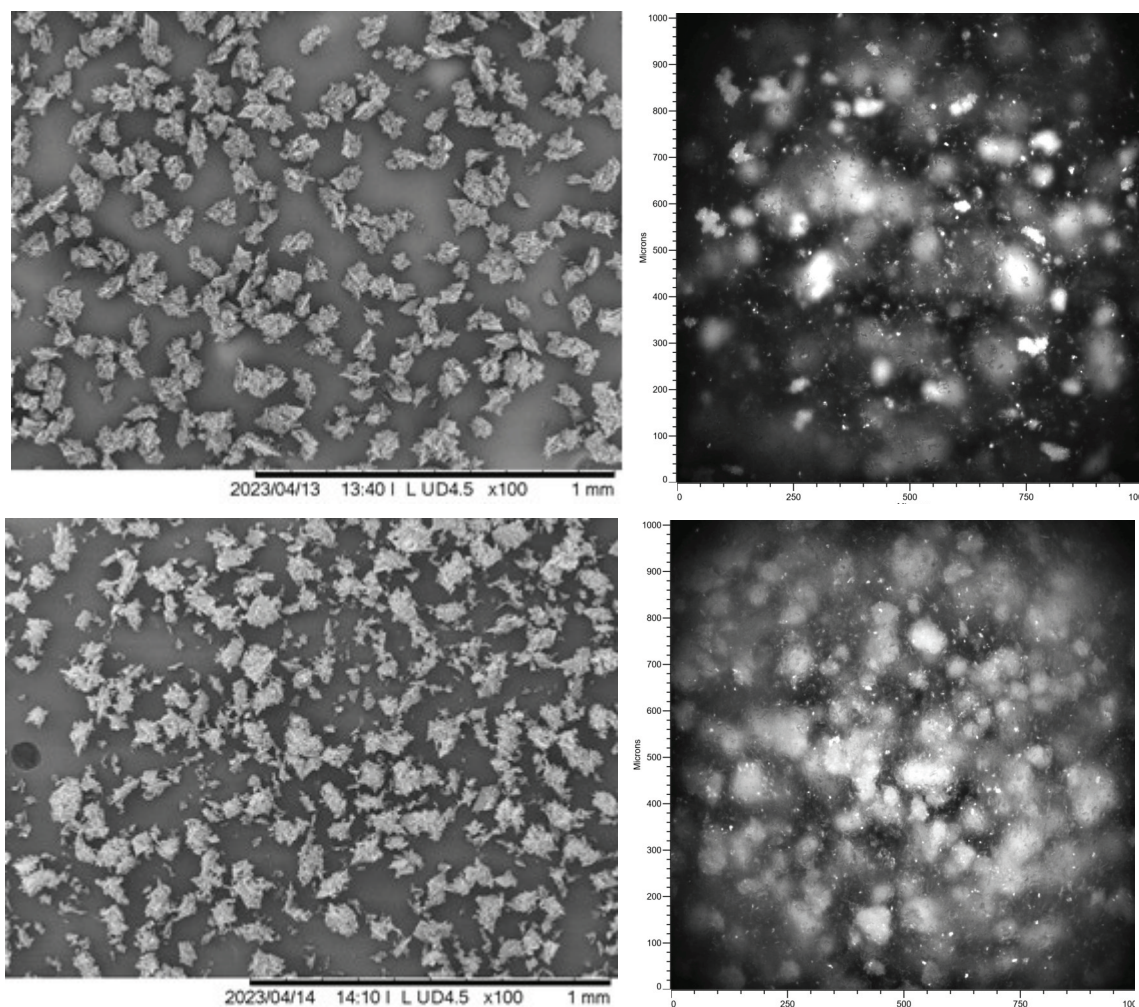


Obr. 1. Distribuce velikostí částic během rekrystalizace látky *A*; po přidavku antisolventu – tečkovaně, po vychlazení na 2 °C – čárkovaně, před filtrací – plná čára, z FBRM sondy (vlevo) a ze sondy EasyViewer (vpravo)

ještě významně větší podíl částic do 50  $\mu\text{m}$ . Na základě těchto dat můžeme usuzovat, že během přidavku EtOH dochází jak k růstu krystalujícího materiálu, tak k jeho aglomeraci. Během chlazení dochází k rozbíjení dříve vzniklých aglomerátů mícháním, otěrem, nárazy o stěny krystalizátoru a vzájemnou kolizí aglomerátů.

Stejná rekrystalizace byla monitorována sondou EasyViewer, která má v sobě navíc mikroskop s vysokým rozlišením. Po přidání EtOH jsou distribuční křivky jak u FBRM, tak u sondy EasyViewer prakticky totožné (obr. 1). První odlišnost sledujeme u distribuční křivky po domíchání (tečkovaně). V případě sondy EasyViewer vidíme velký nárůst větších částic 40–100  $\mu\text{m}$ . Během chladicího teplotního profilu jsou trendy zaznamenané sondami podobnější. Vidíme bimodální distribuci velikosti částic a v suspenzi je značný podíl malých částic (v jednotkách mikrometrů). S časem se tento trend ještě více umocňuje a klesá zastoupení větších částic stejně jako u FBRM son-

dy. Díky tomu, že máme k dispozici po celou dobu experimentu mikroskopické snímky o vysokém rozlišení, vidíme, že na začátku rekrystalizace jsou v suspenzi aglomeráty o velikosti okolo 100  $\mu\text{m}$  (obr. 2). S chlazením a prodlužující se dobou míchání dochází k jejich rozbíjení na drobné krystalky, které v další fázi zpomalují filtraci (obr. 2). Jak je vidět z obr. 1, střední velikost částic ve sledované suspenzi se začíná zmenšovat po přidavku EtOH, podobný trend vykazují i částice větší než 300  $\mu\text{m}$ . Naopak celkový počet částic v systému roste. Z informací, které nám poskytlo jedno měření sondou EasyViewer, víme, že suspenzi je třeba zfiltrovat co nejdříve po přidání antisolventu. Zabráníme tím následnému rozbití aglomerátů a tím urychlíme celý krystalizační proces. Ten byl na konec zkrácen z původní délky 24 hodin na 8 hodin, byl vynechán teplotní chladicí profil a domíchání krystalického materiálu při nižší teplotě. Významně se zkrátil také čas samotné filtrace z 12 hodin na 30 minut. Z měření



Obr. 2. Porovnání snímků SEM (vlevo) a snímků ze sondy EasyViewer (vpravo) z rekrystalizace látky *A* po přidavku antisolventu (nahore) a před izolací (dole)

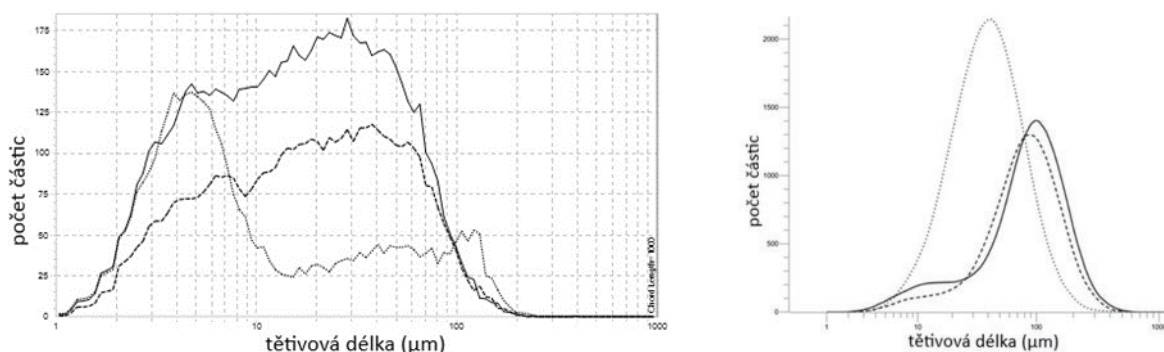
turbidity vyplývá, že chlazení dále nesnižuje rozpustnost, tudíž ani neovlivňuje výtěžek.

#### Reakční krystalizace látky B

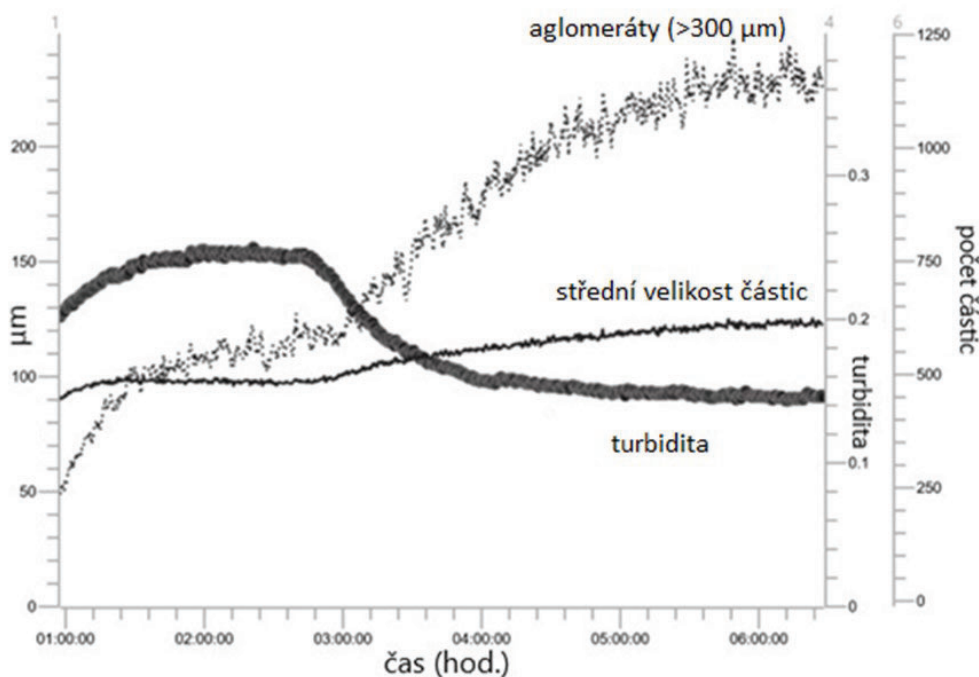
Ve druhém případě byla sledována reakční krystalizace látky B. Krystalizace byla monitorována jak FBRM sondou, tak také sondou EasyViewer. Cílem bylo zjistit, zda je proces správně nastaven nebo je možné ho dále optimalizovat. Z měření sondou FBRM vidíme, že po naočkování jsou v suspenzi částice do 10  $\mu\text{m}$  a nepatrný podíl větších částic/aglomerátů. Na změně distribuce po

přidávku antisolventu se buď uplatňuje růst krystalů nebo dochází k aglomeraci a sekundární nukleaci. Na konci experimentu před filtrací má systém podle FBRM sondy široké PSD od jednotek mikrometrů až po 100  $\mu\text{m}$  (obr. 3).

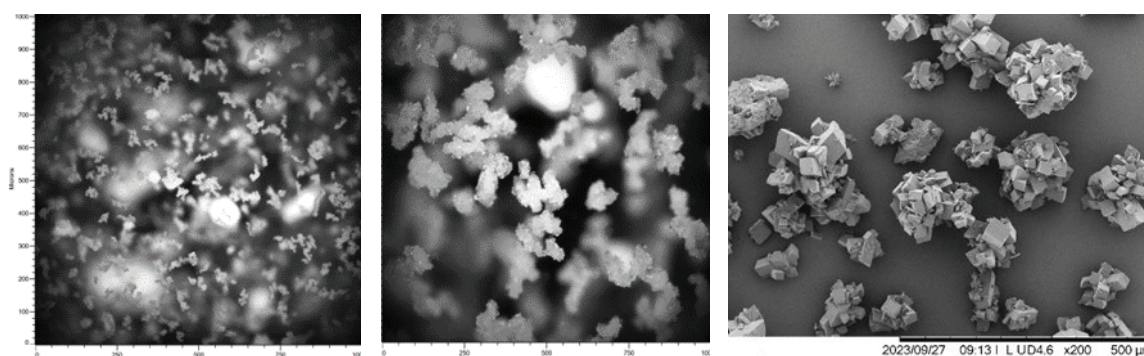
Více informací poskytlo měření sondou EasyViewer. Na začátku experimentu po naočkování máme monomodální distribuci částic (obr. 3). Během chlazení a následného domíchání se distribuce posouvá doprava k větším částicím, systém začíná aglomerovat. V malé míře dochází k sekundární nukleaci. Krystaly vzniklé sekundární nukleací se lépe projeví na inverzně vážených distribucích, kte-



Obr. 3. Distribuce velikosti částic během krystalizace látky B; po naočkování – tečkovaně, po přidávku antisolventu – čárkovaně, před filtrací – plná čára, z FBRM sondy (vlevo) a ze sondy EasyViewer (vpravo)



Obr. 4. Záznam trendů během krystalizace látky B ze sondy EasyViewer



Obr. 5. Porovnání mikroskopických snímků ze sondy EasyViewer po naočkování (vlevo), před izolací (uprostřed) a SEM snímkem izolované látky B (vpravo)

ré dávají větší váhu menším částicím. Sledované trendy jako turbidita, částice větší než 300  $\mu\text{m}$ , částice menší než 25  $\mu\text{m}$  a střední velikost částic, se začínají významně měnit zhruba v polovině chlazení při teplotě cca 15  $^{\circ}\text{C}$  (obr. 4). Turbidita začíná klesat, v systému roste počet aglomerátů (částice větší než 300  $\mu\text{m}$ ), zároveň klesá počet částic menších než 25  $\mu\text{m}$  a střední velikost částic mírně roste. Z tohoto je jasné, že primárně vzniklé krystaly aglomerují a tvoří agregáty o velikosti okolo 100  $\mu\text{m}$  (obr. 5). Během samotného domíchání velmi mírně klesá celkový počet částic a také turbidita. V systému dochází převážně k aglomeraci a sekundární nukleace je prakticky nulová. Izolace by tak měla proběhnout co nejrychleji po vychlazení. Domíchání nemá vliv na výtěžek a potlačíme další agregaci, která by mohla vést k bimodální distribuci částic a komplikovat následnou mikronizaci.

## Závěr

V této práci jsme ukázali výhody in-line PAT systémů, konkrétně FBRM sondy a sondy EasyViewer, kterými jsme monitorovali dvě krystalizace heterocyklických látek. Z měření jednotlivých trendů jako PSD, počet částic, aglomerátů či turbidity jsme byli schopni rychle a efektivně upravit krystalizační podmínky. V prvním případě jsme zkrátali celý krystalizační krok a významně urychlili čas filtrace materiálu díky optimalizaci tvaru krystalické látky. U druhé krystalizace jsme potvrdili správné nastavení krystalizačních podmínek. Izolovaný materiál má monomodální PSD, které je vhodné pro následnou mikronizaci. Stále ale platí, že je vhodné ověřit výsledky také off-line analýzami, které nám potvrdí závěry z in-line měření.

A. Benýšek Bártová děkuje Interní studentské grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_PrF\_2024\_017). Autoři také děkují společnosti Mettler Toledo a Teva Czech Industries za technickou podporu tohoto projektu.

## Seznam zkratk

API	Active Pharmaceutical Ingredient
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
PAT	Process Analytical Technologies
PSD	Particle Size Distribution
PVM	Particle Vision and Measurement
SEM	Scanning Electron Microscopy

## LITERATURA

- Gabriel R., Benýšek Bártová A., Sahníc D., Kratochvíl B.: Chem. Listy 116, 737 (2022).
- Durak L., Kennedy M., Langston M., Mitchell C., Morris G., Perlman M. E., Wendl K., Hicks F., Papageorgiou C. D.: Org. Process Res. Dev. 22, 296 (2018).
- Q7 Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients: Guidance for Industry (2021), doi: 10.1201/9781003189145-16.
- Murphy N. S., O'Connor D. C., Gavins G. C., James L., Lockett J. P., McManus J. A., Packer G., Lopez-Rodríguez R., Webb S. J., Burns M. J.: Org. Process Res. Dev. 27, 1812 (2023).
- Chanda A., Daly A. M., Foley D. A., LaPack M. A., Mukherjee S., Orr J. D., Reid G. L., Thompson D. R., Ward H. W.: Org. Process Res. Dev. 19, 63 (2015).
- Sirota E., Kwok T., Varsolona R., Whittaker A., Andreani T., Quirie S., Margelefsky E., Lamberto D. J.: Org. Process Res. Dev. 25, 308 (2021).
- Kim E. J., Kim J. H., Kim M. S., Jeong S. H., Choi D. H.: Pharmaceutics 13, 919 (2021).
- Nagy B., Farkas A., Borbás E., Vass P., Nagy Z. K., Marosi G.: AAPS PharmSciTech 20, 1 (2019).
- Powell K. A., Croker D. M., Rielly C. D., Nagy Z. K.: Chem. Eng. Sci. 152, 95 (2016).
- Kutluay S., Ceyhan A. A., Sahin Ö., Izgi M. S.: Ind. Eng. Chem. Res. 59, 9198 (2020).
- Liu F., Bagi S. D., Su Q., Chakrabarti R., Barral R., Gamekkanda J. C., Hu C., Mascia S.: Org. Process Res. Dev. 26, 3190 (2022).



**A. Benýšek Bártová<sup>a,b</sup> and R. Gabriel<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> *Teva Czech Industries s.r.o., Research & Development, Opava, Czech Republic,* <sup>b</sup> *Department of Physical Chemistry, Palacký University in Olomouc, Czech Republic*): **Faster Development of the Crystallization Process Thanks to Process Analytical Technologies**

The development of process analytical technologies is continuously advancing and today allows us to combine several techniques into a single measurement probe. In this work, we compared in-line data from the Focused Beam Reflectance Measurement probe and the EasyViewer probe with off-line analyses. The recrystallization of the intermediate appeared to be sensitive to the length of mixing. With time, the crystalline material was breaking down, which prolonged the subsequent filtration. For the crystallization of the final active pharmaceutical substance, we confirmed the correct setting of the crystallization parameters, which enabled us to isolate a material with a monomodal distribution of particles.

**Keywords:** active pharmaceutical ingredient, process analytical technology, crystallization, FBRM technique, EasyViewer system

#### *Acknowledgements*

*A. Benýšek Bártová thanks the Internal Student Grant Agency of the Palacký University in Olomouc, Czech Republic (IGA\_PrF\_2024\_017). The authors also acknowledge the Mettler Toledo and Teva Czech Industries for technical support of this project.*



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.

## ROZSAH A ZPRACOVÁNÍ TÉMATU CHEMICKÝCH VÝPOČTŮ V UČEBNICÍCH CHEMIE PRO STŘEDNÍ ŠKOLY

MARTIN RUSEK<sup>a</sup>, VERONIKA MACHKOVÁ<sup>b</sup>, DOMINIKA KOPEROVÁ<sup>a</sup>, IVETA BÁRTOVÁ<sup>c</sup>,  
VLADIMÍR SIROTEK<sup>d</sup> a JITKA ŠTROFOVÁ<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Pedagogická fakulta, Univerzita Karlova, M. Rettigové 4, 116 39 Praha 1, <sup>b</sup> Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové, Hradecká 1285, 500 03 Hradec Králové, <sup>c</sup> Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. 17. listopadu 12, 779 00 Olomouc, <sup>d</sup> Fakulta pedagogická, Západočeská univerzita v Plzni, Veleslavínova 42, 301 00 Plzeň, Česká republika  
martin.rusek@pedf.cuni.cz

Došlo 5.2.24, přijato 15.5.24.

Předložená studie byla zaměřena na analýzu rozsahu a pojetí výuky chemických výpočtů ve středoškolských učebnicích. Byla provedena detailní analýza vybraných učebnic zaměřená na: typy výpočtů, pojetí jejich výkladů, formu zadání příkladů, způsoby řešení a možnosti procvičování. Výsledky ukázaly značné rozdíly mezi jednotlivými učebnicemi v rozsahu zařazených témat a v pojetí výkladu daného učiva. To se může odrážet v nedostatečné připravenosti studentů nejen v oblasti chemických výpočtů, ale také např. v oblasti úvodních laboratorních kurzů. Tato práce poskytuje učitelům preferujícím učebnice pro přípravu výuky ucelený přehled pro informovaný výběr z dostupných učebnic. Pro výzkumníky v oblasti didaktiky chemie a tvůrce vzdělávací politiky nabízí doporučení pro zlepšení výukových strategií a podporuje hlubší porozumění významu a implementaci chemických a matematických kompetencí ve vzdělávání.

Klíčová slova: chemické výpočty, analýza učebnic, výuka chemie

### Úvod

V době revize kurikula se do popředí dostává otázka kritických míst a možností, jak podporovat učitele v dosahování cílů vzdělávání. Chemické výpočty dlouhodobě patří mezi tři nejproblematictější části učiva chemie<sup>1</sup>, což se konstantně projevuje i v připravenosti studentů prvního ročníku vysokých škol (zjišťováno na JU, MUNI, UHK, UK, UPOL, ZČU v oborech zaměřených na učitelství chemie i konkrétní chemické disciplíny)<sup>2,3</sup>. Problém není nedostatek znalostí různých typů chemických výpočtů, ale spíše v nedostatečné schopnosti studentů řešit výpočetní úlohy v kontextu chemie a aplikovat základní matematické operace s fyzikálně-chemickými veličinami.

V minulosti byly realizovány analýzy Rámcových vzdělávacích programů (RVP) pro střední vzdělávání a Školních vzdělávacích programů (ŠVP) vybraných škol<sup>4</sup>, které naznačují nefunkčnost dvoustupňového systému kurikula – ŠVP je spíše dokument vytvořený z povinnosti nežli dokument jasně ukazující profilaci školy<sup>4</sup>. Významnou roli ve vzdělávacím procesu hrají učebnice, jež mnohdy přebírají roli kurikulárních dokumentů (viz níže)<sup>5–8</sup>. V situaci, kdy kurikulum pro obory středního vzdělávání (gymnaziální i střední odborné vzdělávání) hovoří velmi vágně (uvádí pouze učivo „chemické výpočty“), je zřejmé, že rozsah výuky tématu výpočtů bude silně řízen právě

učebnicemi (srov. cit.<sup>6,9</sup>). Zmapování rozsahu a zpracování tématu chemických výpočtů ve středoškolské výuce chemie tak může nabídnout cenné poznatky jinak získatelné pouze sledováním velkého počtu vyučovacích hodin. Analýza středoškolských učebnic přinese hlubší pochopení rozdílů mezi středoškolským a začátkem vysokoškolského chemického vzdělávání, které zatím byly zkoumány pouze okrajově<sup>9–11</sup>. Tyto informace by mohly přispět k harmonizaci vzdělávacích standardů, sladění očekávání vysokých škol (přijímací řízení i úvodní kurzy), stejně jako k rozvoji specifických pedagogických strategií a vzdělávacích materiálů pro lepší přípravu středoškoláků na vysokoškolské studium. Měly by také podpořit revizi Rámcových vzdělávacích programů a učebnic. Studie má ambici sloužit jako zdroj pro výzkumníky v oblasti didaktiky chemie, poskytovat cenné informace pro tvůrce vzdělávací politiky a napomoci k hlubšímu porozumění významu a implementaci matematických dovedností i kompetencí v kontextu chemického vzdělávání.

### Teoretická východiska

Tématu chemických výpočtů byla v minulosti věnována soustředěná pozornost jak v českém kontextu<sup>2,3,10,11</sup>, tak i v zahraničí<sup>12–15</sup>. Jednotlivé výzkumy konzistentně

poukazují na to, že schopnost žáků, potažmo studentů provádět chemické výpočty nedosahuje optimální úrovně<sup>2,3,16</sup>. Tento stav byl analyzován z pohledu celkových výsledků<sup>2,3,11</sup> úrovně připravenosti žáků či studentů na řešení (problémových) úloh<sup>17,18</sup>, matematických dovedností<sup>3,13</sup>, nebo se autoři soustředili na specifické problémy, jako jsou miskoncepce studentů při výpočtech z chemických rovnic<sup>14</sup>. V uvedených pracích se pak objevují implikace pro další výzkumy nebo samotnou praxi v podobě potřeby dalšího zkoumání problémových pasáží<sup>2,11,15</sup> či využívání alternativních přístupů k výuce<sup>10</sup>.

Ve dvou citovaných pracích<sup>10,11</sup> byla zahrnuta také teoretická východiska, jako jsou Rámcové vzdělávací programy (RVP) či Školní vzdělávací programy (ŠVP) škol i přítomnost tématu chemických výpočtů v maturitní zkoušce z chemie, kterou studenti čerstvě nastupující na vysokou školu absolvovali. Dosud však chybí ucelené informace o zpracování tématu chemických výpočtů v učebnicích, které jsou podstatné pro porozumění celkovému kurikulu<sup>19</sup>. Učebnice jsou učiteli obecně vnímány jako předpis kurikula<sup>6–8</sup>, a to bez ohledu na vzdělávací obor. Dále se ukázalo, že jsou učebnice pro mnohé učitele i primárním zdrojem vyučovacích metod<sup>20</sup>, a tím se stávají i zdrojem námětů pro plánování a realizaci výuky<sup>21</sup>.

Lze předpokládat, že jednotlivé typy chemických výpočtů, způsob jejich zavádění, modelová řešení i samotná povaha dalších úloh k procvičování v dostupných učebnicích formují předpis pro realizované kurikulum. Takto vedený výzkum tak může doplnit stávající informace o této problematice<sup>2,3,9–11</sup>.

## Cíle a metody

Jelikož kurikulární dokumenty nenabízí jasné vymezení požadovaného rozsahu daného tématu, další konkrétní zamýšleného kurikula tak nabízejí učebnice. Pro ucelený přehled je zapotřebí sladit požadavky prezentované jednotlivými učebnicemi a následně optimalizovat požadavky vysokých škol.

Cílem této studie proto bylo posoudit *učebnicemi vymezené pojetí a rozsah výuky chemických výpočtů, konkrétně v učebnicích chemie pro střední školy*.

Pro analýzu byly vybrány pouze učebnice v nejužším slova smyslu<sup>22</sup>. Jelikož oproti učebnicím chemie pro základní školy<sup>5</sup> není k dispozici aktuální studie, na jejímž základě by bylo možné výběr provést, byly proto využity dílčí studie a šetření<sup>9,23,24</sup>, které se učebnicemi využívanými na středních školách zabývaly.

Do analýzy byly zařazeny publikace uvedené v tabulce I. Do výběru nebyla zahrnuta úspěšná učebnice *Základy přírodovědného vzdělávání: Chemie* (Pumpr a spol.), jelikož je svým rozsahem a zaměřením určena výhradně žákům studujícím obory, kde chemie není vyučována ve vyšším rozsahu.

V daných publikacích byly vyhledány příslušné kapitoly věnované chemickým výpočtům, které byly poté analyzovány s ohledem na:

- typ výpočtu,
- prezentace definičního, popř. výpočetního vztahu,
- operacionalizace členů v definičním, popř. výpočetním vztahu,
- modelové/řešené úlohy,
- zadání úloh na procvičení,
- zpětná vazba (výsledky pro kontrolu),
- prezentace alternativních postupů (sem patří trojčlenka, procento, postupné dosazování do jednotlivých vztahů, křížové pravidlo apod.).

Tabulka I  
Přehled analyzovaných učebnic chemie

Zkratka	Autoři	Rok vydání	Název učebnice	Nakladatelství
ChSŠ	Banýr J., Beneš P., Hally J., Holada K., Novotný P. a kol.	1995	Chemie pro střední školy <sup>29</sup>	SPN
ChSOŠ	Blažek J., Fabini J.	2005	Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření <sup>30</sup>	SPN
ChSOŠNech	Čapek Adamec M. a kol.	2022	Chemie pro SOŠ nechemického zaměření	Eduko
ChGI	Flemlr V., Dušek B.	2001	Chemie I pro gymnázia <sup>31</sup>	SPN
Ch4G	Mareček A., Honza J.	1998	Chemie pro čtyřletá gymnázia, 1. díl <sup>32</sup>	Nakladatelství Olomouc
Ch4G	Mareček A., Honza J.	2005	Chemie pro čtyřletá gymnázia, 3. díl <sup>33</sup>	Nakladatelství Olomouc
OACH	Šrámek V.	2005	Obecná a anorganická chemie <sup>34</sup>	Nakladatelství Olomouc
UG	Švandová V., Šáfrová A., Žabová I., Kostura B.	2023	Učebnice pro gymnázia <sup>35</sup>	Taktik
PSCh	Vacík J.	1999	Přehled středoškolské chemie <sup>36</sup>	SPN

## Výsledky a diskuse

Z výsledků analýzy vyplývá konsenzus mezi autory učebnic ohledně obsahu tohoto tématu. Toto zjištění potvrzuje dříve popsanou silnou tradici v představě o pojetí učebnice<sup>25</sup>. Učebnice využívané na gymnáziích zahrnují všechny uvedené typy chemických výpočtů, což potvrzuje i předchozí zjištění<sup>9</sup>. Učebnice pro jiné obory vyššího sekundárního vzdělávání některé typy výpočtů vynechávají. To potvrzuje vhodnost původního výběru pro testování výsledků žáků<sup>2</sup>.

Analýzou byly odhaleny výrazné rozdíly mezi jednotlivými učebnicemi, a to jak v rozsahu zařazených témat z chemických výpočtů, tak v pojetí výkladu daného učiva či rozsahu jeho procvičování. Jelikož je rozsah závazného učiva ve stávajících RVP definován velmi obecně, volba konkrétních témat zůstává na učitelích. Je tedy pravděpodobné, že se budou i v tomto řídit obsahem učebnice<sup>6,7,21</sup>. Toto zjištění částečně umožňuje interpretaci předešlých výsledků o úspěšnosti studentů v jednotlivých typech úloh. Například výpočty hmotnostního zlomku nebo látkové koncentrace – témata, kterým se věnují všechny učebnice – patří z hlediska výsledků žáků mezi nejméně problematické<sup>2,3</sup>. Tento typ výpočtů je, co se týče požadovaných kroků, myšlenkových operací a práce s oborovými koncepty jednodušší např. v porovnání s výpočty z chemických rovnic. Nicméně právě témata, která obvykle způsobují studentům největší obtíže (výpočty z chemických rovnic, výpočty pH, směšovací rovnice)<sup>2,3</sup>, jsou v učebnicích zastoupena v menším rozsahu. Výjimku tvoří pouze výpočty z chemických rovnic, jimž je v učebnicích naopak spolu s hmotnostním zlomkem věnováno nejvíce příkladů. Do výsledků žáků se to však nepromítá<sup>2</sup>.

Tím učebnice naznačují určitou důležitost témat, kdy množství pozornosti věnované danému typu výpočtu může značit jeho důležitost. Vzhledem k rozdílnému množství příkladů je tato varianta méně pravděpodobná a lze se domnívat, že autoři učebnic tuto skutečnost nebrali v potaz. V případě, že by učitelé chtěli daným typům výpočtů věnovat rovnocennou pozornost, je tak hledání nebo tvorba dalších úloh na nich samotných.

Mimo počtu příkladů v analyzovaných učebnicích se také liší zpracování jednotlivých kapitol. Nesoulad panuje ve stylu prezentace tématu v různých typech chemických výpočtů. Autoři u některých typů příkladů postupují systematicky: zavádějí vzorec pro výpočet dané veličiny, uvedou i alternativní postup řešení, postup demonstrují na modelovém příkladu a následně poskytnou další úlohy pro ověření porozumění a upevnění učiva. U jiných typů výpočtů jsou některé kroky opomenuty. To je částečně ovlivněno povahou samotných výpočtů (např. řešení výpočtu pH pouze pomocí úměry nelze). Nicméně u typu úloh, ve kterých je možné využít matematické operace, tj. pouze operace s čísly nebo výpočetní vztah, tj. dosazování do vzorců pro výpočet, byla zaznamenána nejednotnost v přístupu k výkladu.

Souhrnné výsledky také ukazují typický způsob zadání výpočetních úloh. Všechny analyzované učebnice s výjimkou nejnovější učebnice UG představují zadání v podobě slovní úlohy bez širšího kontextu (srov. cit.<sup>9</sup>). V tom se tyto učebnice liší od zahraničních učebnic<sup>9</sup>. To může potenciálně snižovat motivaci žáků věnovat se výpočtům (viz cit.<sup>26</sup>). Na druhou stranu je tímto způsobem minimalizován potenciálně negativní vliv omezené úrovně čtenářské gramotnosti na řešení chemických výpočtů, která se projevuje jako neschopnost žáků ze slovní úlohy vyjádřit (přepsat) chemické veličiny<sup>9</sup> a také jejich nedostatečně rozvinuté chemické myšlení (srov. cit.<sup>9,27</sup>), jistoty v matematických operacích<sup>9,27</sup> i obecné schopnosti řešit problémové úlohy (viz cit.<sup>17</sup>).

## Pojetí výkladu jednotlivých typů chemických výpočtů v učebnicích chemie

### Hmotnostní zlomek

Jak již bylo dříve zmíněno, hmotnostní zlomek se řadí mezi základní chemické výpočty, a je proto zahrnut v každé učebnici. Prezentace tohoto tématu je v učebnicích téměř unifikovaná: je zaveden vzorec pro výpočet, operacionalizovány proměnné a následně je výpočet demonstrován na řešeném příkladu, po kterém následuje cvičný příklad. Zde se však učebnice liší. Pouze Ch4G a ChSOŠ zahrnují také výsledek pro kontrolu. S výjimkou UG, ChSOŠNech a ChGI, většina autorů učebnic nabízí alternativní postupy řešení založené na úvaze a využití trojčlenky.

### Směšovací rovnice

Většina učebnic prezentuje vzorec pro výpočet, který pak, s výjimkou učebnic ChGI a ChSOŠNech, operacionalizují. Následuje modelový, řešený příklad. V tomto jsou mezi učebnicemi rozdíly. ChGI, ChSŠ a ChSOŠNech uvádějí pouze jeden řešený příklad, zatímco ostatní jich uvádějí více. To ovlivňuje i podporu procvičování – zmíněné dvě učebnice obsahují pouze jeden příklad, zatímco ostatní až šest. Podobně jako u hmotnostního zlomku, pouze Ch4G uvádí správné výsledky řešení. Učebnice ChGI a ChSŠ se v tomto typu výpočtu omezují pouze na vzorec pro výpočet. Ostatní učebnice, které zařazují směšovací rovnice, představují také alternativní postup, jako je křížové pravidlo. Ozvláštněním je v tomto ohledu přístup ChSOŠNech, ve které autoři obcházejí klasickou směšovací rovnici a na konkrétním případě ředění roztoků demonstrují danou problematiku s oporou o schematicky znázorněný postup. Problematiku spojují rovnou s hmotnostním zlomkem a látkovou koncentrací.

V učebnici Ch4G je používán ve směšovací rovnici vyjádřené pomocí hmotnostních zlomků znak  $c$  (běžně používán pro označení molární (látkové) koncentrace) ve významu hmotnostního zlomku, což je zavádějící.

## Látková koncentrace

Látková koncentrace, v učebnicích označovaná též *molární koncentrace*, není zahrnuta pouze v učebnici ChSOŠ. Ostatní učebnice standardně prezentují vzorec pro výpočet a operacionalizují jednotlivé proměnné. V souladu s předchozími tématy, učebnice Ch4G, OACH, UG, ChSOŠNech a PSCh demonstrují postup na řešených příkladech, zatímco ostatní učebnice řešené příklady neobsahují. Překvapující je, že učebnice ChGI poskytuje pouze vzorec pro výpočet bez dalšího příkladu. Ostatní učebnice nabízejí 2–3 úlohy k procvičení, s výjimkou Ch4G, která obsahuje 10 úloh. Pouze v učebnici Ch4G jsou poskytnuty výsledky řešení úloh. Společně s UG je Ch4G jednou z mála učebnic, která nabízí alternativní řešení, zatímco v PSCh se alternativní postupy objevují v kontextu stechiometrických výpočtů. Učebnice ChSOŠNech navíc problematiku spojuje s ředěním roztoků a kontextualizuje pojmy nasycený, koncentrovaný, zředěný roztok.

## Výpočty z chemických rovnic (stechiometrické výpočty)

Tématu se věnují všechny analyzované učebnice. Pouze učebnice Ch4G a UG nezavádějí vzorec pro výpočet z chemické rovnice a postupují úvahou. Zbylé učebnice zavádějí vzorec pro výpočet, ale postupují rozdílně. V ChGI autoři na jednom příkladu ukazují průběh výpočtu založený na postupném dosazování do jednotlivých výpočetních vztahů, na druhém příkladu pak postupnou úpravu obecného výpočetního vztahu a dosazení. V OACH autor nejprve prezentuje již upravený vzorec pro výpočet, ve druhém příkladu ukazuje řešení postupným dosazováním do výpočetního vztahu. V učebnici PSCh jsou uvedeny tři postupy: dosazení do celkového upraveného vzorce

$$m(\text{B}) = \frac{b}{a} \cdot \frac{M(\text{B})}{M(\text{A})} \cdot m(\text{A}),$$

postupné dosazování do jednotlivých vztahů a výpočet přes podíly látkových množství. Právě postup přes podíly látkových množství je volen i v učebnicích ChGI a OACH. Z didaktického hlediska je však méně zdařilé, že uvádějí pouze příklad, kdy jsou látková množství v poměru 1:1 a počítání s jiným poměrem, které činí problémy<sup>2</sup>, není zařazeno. Tento nedostatek není odstraněn ani v případě učebnic, které počítají se vztahem, který tuto potřebnou úvahu obchází. Teoreticky tak tento přístup může stát za problémy s aplikací stechiometrie při popisu chemických dějů, např. když se žáci nebo studenti dostanou k výpočtům souvisejícím s titracemi. V tomto duchu téma prezentují autoři ChSOŠNech, kteří celou problematiku zdařile prezentují na reakci hliníku s kyselinou chlorovodíkovou.

Jednotlivé učebnice pak odlišně přistupují i k fixaci učiva. Zatímco Ch4G ke třem řešeným úlohám přidává devět úloh na procvičení (tradičně s poskytnutými výsledky), OACH pět a CHSŠ tři příklady, ve zbylých učebnicích je uveden pouze jeden až dva příklady. V tomto se projevuje odlišná představa autorů o funkci učebnice.

## Výpočty pH

U výpočtů pH se jinak poměrně homogenní pojetí zpracování učebnic rozchází. V učebnicích ChSŠ, ChSOŠNech a ChSOŠ není téma zařazeno vůbec. Tři učebnice se věnují pH silných kyselin, nikoli pOH, a pouze v učebnicích OACH a CH4G je představen i vzorec pro výpočet pOH a v učebnici UG se s výpočtem pOH seznámíme až v řešené úloze. Učebnice CH4G zahrnuje navíc také řešené úlohy zaměřené na výpočet pH roztoku slabé kyseliny anebo zásady. Rozdíly mezi učebnicemi jsou opět v práci s příklady. ChGI oproti ostatním učebnicím obsahujícím tento typ výpočtů neuvádí řešený příklad. Ostatní učebnice obsahují 1–2 příklady na procvičení, výjimkou je učebnice CH4G, která obsahuje až 10 řešených úloh.

Alternativní postupy se pak vyskytují v učebnicích: Ch4G, ChGI, ChSŠ a PSCh:

- odvození pH podle hodnoty exponentu v zápisu koncentrace oxoniových kationtů (Ch4G a UG),
- stupnice pH s vazbou na hodnotu exponentu koncentrace oxoniových kationtů (ChGI, OACH a PSCh),
- stupnice pH s vazbou na koncentraci oxoniových kationtů a koncentraci hydroxidových aniontů (OACH a PSCh),
- stupnice pH bez vazby na koncentraci oxoniových kationtů (schéma stupnice s informací kyselá, neutrální, zásaditá – ChSŠ, PSCh).

## Srovnání jednotlivých učebnic

Učebnice Ch4G a OACH, poprvé vydané před implementací současných Rámcových vzdělávacích programů (RVP) 2009–2012, pojímají téma chemických výpočtů nejkomplexněji ze všech analyzovaných učebnic. Nabízí rozsáhlou škálu úloh k procvičování i ukázek alternativních řešení. Z tohoto hlediska poskytují učitelům komplexní podporu, eliminující potřebu vyhledávat další materiály. PSCh, což je překvapivé vzhledem k jeho charakteru jako přehledové publikace, se vyznačuje vysokým počtem modelových příkladů. Slouží jako efektivní nástroj pro vysvětlení postupů řešení chemických výpočtů. Avšak pro upevnění získaných dovedností je nutné, aby učitelé tuto publikaci kombinovali s jinými materiály, které obsahují další úlohy k procvičení. S ohledem na cílovou skupinu, pro kterou jsou určeny učebnice ChSOŠ, ChSŠ a ChSOŠNech, není překvapující, že v ní je téma výpočtů výrazně omezeno. Nejenže se věnují nejmenšímu rozsahu typů výpočtů, ale také poskytují omezený počet úloh k procvičení nebo je úplně vynechávají. Podobný trend byl zjištěn i u jiných učebnic pro střední odborné školy.

Ve výsledcích analýzy se projevuje rok vydání převážné většiny učebnic. Autoři je zpracovávali v době, kdy dříve platné kurikulum udávalo samotný rozsah i typy výpočtů. Mezi učebnicemi jsou ovšem rozdíly i v povaze role učebnice. V případě některých nabízí samotná učebnice umožňující díky počtu řešených úloh i úloh

k procvičení dostatečnou oporu. V jiném případě – pokud učitel nepřevzme pojetí učebnice jako dané, a po jedné vyřešené úloze téma neopustí – je nucen kombinovat více učebnic (viz cit.<sup>5</sup>) nebo hledat další zdroje. Přestože se v poslední době objevuje množství alternativních materiálů, je to pro učitele jednak časovou zátěží, jednak se musí potýkat s jejich kritickým posouzením, jelikož ne vždy jde o prověřené, kvalitní materiály. Ve většině analyzovaných učebnic jsou úlohy zadané stručným textem. Učebnice UG a ChSOŠNech zahrnují spolu s úlohami i kontext – delší textová zadání či praktické ukázky zaměřené na aplikace s přesahem do běžného života (srov. cit.<sup>9</sup>).

## Implikace pro praxi

Z provedené analýzy vyplývá několik implikací pro praxi i další výzkum:

**(1) Revize a aktualizace Rámcových vzdělávacích programů:** V návaznosti na zjištěnou schopnost studentů po absolvování střední školy provádět základní chemické výpočty, a především podle rozdílů v připravenosti studentů, by bylo vhodné více specifikovat stávající učivo a tuto disciplínu konkretizovat do podoby očekávaného výstupu.

**(2) Zvýšení důrazu na praktické aplikace a kontextové učení ve výuce chemie:** Výzkumy<sup>2,3</sup> poukazují na nedostatečnou schopnost studentů aplikovat chemické výpočty na úlohy ukotvené v reálných situacích (slovní úlohy). I v případě chemických výpočtů je tedy vhodné zvýšit důraz na kontextové učení, schopnost práce s textem a praktické aplikace v učebních osnovách. To je žádoucí propast jak v nových učebnicích, tak v dalších materiálech k podpoře výuky tohoto tématu.

**(3) Vývoj a integrace nových pedagogických přístupů a materiálů:** Z analýzy učebnic vyplývá potřeba vytvořit a začlenit nové, inovativní výukové materiály s využitím moderních pedagogických strategií, které cílí na posílení matematických dovedností a konceptuálního porozumění chemickým výpočtům (viz např.<sup>28</sup>).

**(4) Další výzkum v oblasti didaktiky chemie:** Je třeba provést další výzkumy zaměřené na pochopení, jakým způsobem středoškolští učitelé chemie pojmají základní témata učiva chemie a jak se jejich přístup k pojetí výuky projevuje v dosahování výsledků učení jejich žáky.

## Závěr

Tento článek poskytuje komplexní analýzu pokrytí a zpracování chemických výpočtů v různých učebnicích chemie pro střední školy. Zjištění ukazují, že gymnaziální učebnice obvykle pokrývají široký rozsah témat a typů výpočtů, zatímco učebnice pro jiné typy středních škol se v tomto ohledu liší. Přestože mezi učebnicemi existuje shoda ohledně základních chemických výpočtů (hmotnostní zlomek a látková koncentrace), významné rozdíly se objevují v rozsahu a hloubce pokrytí dalších

témat, jako jsou výpočty z chemických rovnic a pH. Učebnice se různí nejen v počtu a typu modelových a cvičných úloh, ale také v přístupu k výkladu a prezentaci alternativních postupů řešení. Některá témata, která bývají pro studenty obtížnější, nejsou v učebnicích dostatečně zastoupena. Tento fakt může mít vliv na úspěšnost studentů při řešení chemických výpočtů v těchto oblastech.

Na výsledky je zapotřebí nahlížet s vědomím limitů studie. Prvním z nich je výběr materiálů. Autoři si jsou vědomi existence dalších publikací (echembook.eu, Chemie pro spolužáky, Odmaturuj z chemie, Chemie v kostce aj.), tyto výstupy však nesplňují požadavek všeobecně rozšířeného média a/nebo pojetí učebnice. Limitujícím může být také pohled pouze na učebnice. S ohledem na ne vždy podrobné ŠVP i popsany rozpor mezi ŠVP a realizovaným kurikulem se tak analýza učebnic spolu s úspěšností studentů v chemických výpočtech a postojem učitelů k výpočtům jeví jako dostatečně relevantní.

Tento článek přináší poznatky o způsobu, jakým různé učebnice přistupují k prezentaci chemických výpočtů, a poukazuje na potřebu dalšího výzkumu v této oblasti za účelem zlepšení výuky a porozumění chemie žáky a následně i studenty.

## LITERATURA

1. Rychtera J. a 10 spoluautorů: *Kritická místa kurikula chemie na 2. stupni základní školy I*. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2019.
2. Rusek M., Vojtíš K., Bártová I., Klečková M., Sirotek V., Štrofová J.: *Acta Chim. Slov.* 69, 371 (2022).
3. Rusek M., Vojtíš K., Chroustová K., v knize: *Scientific Thinking in Chemical Education* (Nodzynska M., ed.), str. 67. Pedagogical University of Kraków, Kraków 2021.
4. Medek P.: *Analýza školních vzdělávacích programů na pražských základních školách se zaměřením na vzdělávací obor chemie. Bakalářská práce*. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Praha 2021.
5. Vojtíš K., Rusek M.: *J. Balt. Sci. Educ.* 20, 316 (2021).
6. Vojtíš K., Rusek M.: *Chem. Educ. Res. Pract.* 23, 786 (2022).
7. Chiappetta E. L., Fillman D. A.: *Int. J. Sci. Educ.* 29, 1847 (2007).
8. Törnroos J.: *Stud. Educ. Eval.* 31, 315 (2005).
9. Obruča A.: *Motivační výpočtové úlohy pro výuku chemie na SŠ. Diplomová práce*. Palackého univerzita, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2022.
10. Horáková A.: *Efektivita uplatnění principu převrácené třídy v kurzu Chemické výpočty. Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Praha 2021.
11. Frolíková M.: *Schopnost nastupujících studentů učitelství provádět chemické výpočty. Master thesis*. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Praha 2022.
12. Maciejowska I.: *Gamtamokslinis Ugdymas 2009*, 38 (2009).

13. Scott F. J.: Chem. Educ. Res. Pract. 15, 568 (2014).
14. Fach M., de Boer T., Parchmann I.: Chem. Educ. Res. Pract. 8, 13 (2007).
15. Shadreck M., Enunuwe O. C.: Afr. J. Educ. Stud. Math. Sci. 14, 25 (2018).
16. Novosák J., Novosáková J., Suchomel P., Zatloukal T., Kovář K.: *Výsledky vzdělávání žáků 9. ročníku základních škol ve vybraných předmětech ve školním roce 2022/2023*. Česká školní inspekce, Praha 2023.
17. Tóthová M., Rusek M.: Front. Educ. 7, 1051098 (2022).
18. Williamson P. K.: Think. Skills Creativity 6, 31 (2011).
19. Remillard J. T.: Rev. Educ. Res. 75, 211 (2005).
20. Mullis I. V., Martin M. O., Foy P., Arora A.: *TIMSS 2011 international results in mathematics*. TIMSS & PIRLS International Study Center, Chestnut Hill, MA 2012.
21. Lepik M., Grevholm B., Viholainen A.: Nord. Stud. Math. Educ. 20, 129 (2015).
22. Průcha J.: *Učebnice: Teorie a analýzy edukačního média*. Paido, Brno 1998.
23. Prášilová J., Klečková M., Kameníček J.: Chem. Listy 109, 726 (2015).
24. Huvarová M.: *Nejpoužívanější středoškolské učebnice chemie na gymnáziích. Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010.
25. Vojtř K., Rusek M.: Chem. Listy 114, 366 (2020).
26. Havlíčková R.: Scientia in educatione 11, 2 (2020).
27. Leopold D. G., Edgar B.: J. Chem. Educ. 85, 724 (2008).
28. Rusek M., Tóthová M., Vojtř K., Chroustová K.: *Adaptivní e-book pro podporu výuky chemických výpočtů principem převrácené třídy*. UK PedF, Praha 2021.
29. Banýr J., Beneš P., Hally J., Holada K., Novotný P., Pospíšil J.: *Chemie pro střední školy*. SPN – pedagogické nakladatelství, Praha 1995.
30. Blažek J., Fabini J.: *Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření*. SPN – pedagogické nakladatelství, Praha 2005.
31. Flemr V., Dušek B.: *Chemie I pro gymnázia*. SPN – pedagogické nakladatelství, Praha 2001.
32. Mareček A., Honza J.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia – 1. díl*, 1. vyd. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 1998.
33. Mareček A., Honza J.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia 3. díl*. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2005.
34. Šrámek V.: *Obecná a anorganická chemie*, 2. vyd. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2005.
35. Švandová V., Šáfrová A., Žabová I., Kostura B.: *Učebnice pro gymnázia*. Taktik, Praha 2023.
36. Vacík J.: *Přehled středoškolské chemie*, 4. vyd. SPN, Praha 1999.

**M. Rusek<sup>a</sup>, V. Machková<sup>b</sup>, D. Koperová<sup>a</sup>, I. Bártová<sup>c</sup>, V. Sirotek<sup>d</sup>, and J. Štrofová<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> Faculty of Education, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>b</sup> Faculty of Science, University of Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic, <sup>c</sup> Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic, <sup>d</sup> Faculty of Education, University of West Bohemia, Pilsen, Czech Republic): **Extent and Processing of Chemical Calculations in the Chemistry Textbooks for High Schools**

The presented study is focused on the analysis of the scope and conception of teaching the chemical calculations in high school textbooks. The performed detailed analysis of selected textbooks was focused on: types of calculations, the conception of their explanations, the form of example assignments, methods of solution, and opportunities for practice. The results showed considerable differences between individual textbooks in the scope of topics included and in the approach to the explanation of the given material. The findings suggest that current high school education, in terms of its impact on students' abilities to solve chemical calculations, is not fully adapted to the requirements of university studies. This may be reflected in the insufficient preparedness of students not only in the field of chemical calculations but also, for example, in the introductory laboratory courses. This work provides teachers who prefer textbooks for teaching preparation a comprehensive overview for an informed selection from available textbooks. For researchers in the field of the chemistry didactics and creators of educational policy, it offers recommendations for improving teaching strategies and supports a deeper understanding of the significance and implementation of chemical competencies and mathematical skills in education.

Keywords: chemical calculations, textbook analysis, chemistry education



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.

**PŘIPOJ SE K NĀM  
A OBJEV SVĚT  
CHEMIE!**

**ASOCIACE MLADÝCH  
CHEMIKŮ**

**CO NABÍZÍME?**

VZDĚLÁVÁNÍ: WORKSHOPY, SEMINÁŘE

NETWORKING: BUDUJ SÍŤ SPOJENÍ  
MEZI MLADÝMI CHEMIKY

SPOLEČENSKÉ UDÁLOŠTI:  
KONFERENCE, SOUTĚŽE

**STAŇ SE  
ČLEMEM AMCH**



**Δ M C H**  
GROW TOGETHER



**SLEDUJ NĀS  
ONLINE**



**ZAPOJ SE DO ORGANIZACE AKCÍ  
ASOCIACEMCSCH@GMAIL.COM**



---

**OBSAH**

<b>ÚVODNÍK</b>	
<b>Devět Skal po třidvacáté</b>	301
E. Benešová	
<b>REFERÁTY</b>	
<b>Perfluoralkylové látky – přehled jejich výskytu, dopadů na zdraví a metod detekce</b>	302
K. Kukrálová, E. Miliutina, O. Lyutakov a V. Švorčík	
<b>Nukleosidová chemie v ÚOCHB – ohlédnutí do historie</b>	311
M. Krečmerová	
<b>IGF2: Opomíjený hormon z rodiny inzulinu s významným terapeutickým potenciálem</b>	321
T. Turnovská, J. Jiráček a L. Žáková	
<b>Kdo byl Thomas Midgley, Jr.</b>	331
P. Holý	
<b>PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE</b>	
<b>Rychlejší vývoj krystalizačního procesu díky procesním analytickým technologiím</b>	342
A. Benýšek Bártová a R. Gabriel	
<b>VÝUKA CHEMIE</b>	
<b>Rozsah a zpracování tématu chemických výpočtů v učebnicích chemie pro střední školy</b>	348
M. Rusek, V. Machková, D. Koperová, I. Bártová, V. Sirotek a J. Štrofová	

---

**CONTENTS**

<b>EDITORIAL</b>	
<b>Devět Skal for the Twenty Third Time</b>	301
E. Benešová	
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Perfluoroalkyl Substances – an Overview of Their Occurrence, Health Effects and Detection Methods</b>	302
K. Kukrálová, E. Miliutina, O. Lyutakov, and V. Švorčík	
<b>Nucleoside Chemistry at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry – Looking Back on History</b>	311
M. Krečmerová	
<b>IGF2: Overlooked Peptide from Insulin-Like Family of Hormones with Great Therapeutical Potential</b>	321
T. Turnovská, J. Jiráček, and L. Žáková	
<b>Who Was Thomas Midgley, Jr.</b>	331
P. Holý	
<b>ORIGINAL AND METHODOICAL PAPERS</b>	
<b>Faster Development of the Crystallization Process Thanks to Process Analytical Technologies</b>	342
A. Benýšek Bártová and R. Gabriel	
<b>EDUCATION IN CHEMISTRY</b>	
<b>Extent and Processing of Chemical Calculations in the Chemistry Textbooks for High Schools</b>	348
M. Rusek, V. Machková, D. Koperová, I. Bártová, V. Sirotek, and J. Štrofová	



# 76. Sjezd chemiků

26. - 29. 8. 2024, Ostrava



[www.76sjezdchemiku.cz](http://www.76sjezdchemiku.cz)

## Odborné sekce

- Analytická chemie, chemie životního prostředí a příbuzné obory
- Organická, bioorganická a farmaceutická chemie
- Anorganická a bioanorganická chemie
- Materiálová chemie
- Chemické vzdělávání a historie chemie
- Průmyslová chemie

## Plenární přednášky



Panorama umělé inteligence  
**MUDr. František Koukolík DrSc., FCMA**  
*Oddělení patologie a molekulární medicíny Thomayerovy nemocnice v Praze Krč*



Využití chemických metod při vizualizaci latentních daktyloskopických stop  
**prof. PhDr. Jiří Straus, DrSc.**  
*Katedra kriminalistiky a forenzních disciplín, Vysoká škola finanční a správní, a.s.; Fakulta chemického inženýrství, VŠCHT Praha*



Jademé technologie v našich službách  
**Ing. Dana Drábová, Ph.D., Dr. h. c. mult.**  
*Státní úřad pro jadernou bezpečnost*



Chemická a priestorová charakterizácia pomocou hmotnostnej spektrometrie sekundárných iónov: od anorganických materiálov k biologickým vzorkám  
**doc. RNDr. Monika Jerigová, Ph.D.**  
*Prirodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave*



Od šípového jedu k Novičoku  
**mjr. Ing. Bc. Dušan Treflík, Ph.D.**  
*Ústav ochrany proti zbráním hromadného ničení, Univerzita obrany Brno*



Přírodní psychedelické látky v léčbě duševních chorob  
**doc. Ing. Martin Kuchař, Ph.D.**  
*Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha*

## Místo konání



Kampus VŠB-TUO  
17. listopadu  
Ostrava-Poruba

## Organizátoři



VŠB TECHNICKÁ  
UNIVERZITA  
OSTRAVA



**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 118 (2024), čís./no. 6 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 148, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 134 • 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. Juráček, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2024 (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://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány 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 (Světlem aktivovaný komplex ruthenia vázaný na DNA kvadruplex, McQuaid K. T. a spol.; <https://www.rcsb.org/structure/5l8s>): M. Štětina • Dáno do tisku 28.5.2024.**



# 9th Meeting on **CHEMISTRY & LIFE** for Sustainable Future

The 9th annual Chemistry & Life conference, this year with the motto **"for a sustainable future"**, will take place at the **Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, on 12–13 September 2024**. This year's conference focuses on modern trends in sustainable chemistry, chemical and materials technology and biotechnology.

As the motto of the conference suggests, the intention of this year's conference is to reflect on the main aspects of chemistry and related sciences in the context of the current challenges facing not only the chemical industry but also modern human society as a whole.

An equally important ambition of the conference is also to provide a space for a close contact between academia and industrial partners in the form of a moderated discussion at the Industry Forum, which forms a separate part of the conference programme.

## Two sessions, main topics:

### Waste Valorisation for a Sustainable Future: Chemistry, Biotechnology and Materials

- Chemistry and technology for sustainable materials – production, processing and use
- Chemistry and environmental sustainability
- Biochemical and biophysical technologies

### Current Progress in Electron Technologies for a Sustainable Future

- Materials design and synthesis
- Organic, bio and photoelectronics and other electron technologies
- Applied photochemistry

#### Conference fees:

Regular participant **200 EUR**  
Student/PhD student **150 EUR**

#### Deadlines:

1 April 2024 Registration open  
15 June 2024 Abstract submission  
31 July 2024 Conference fee payment

#### Contact:

conference@fch.vut.cz

**12–13**  
September  
**2024**

When

Where

**Faculty of Chemistry  
Brno University  
of Technology**

Purkyňova 118, 612 00 Brno,  
Czech Republic

<https://www.fch.vut.cz/en/chl/conference>



**T** **BRNO FACULTY  
UNIVERSITY OF CHEMISTRY  
OF TECHNOLOGY**

## Plenary speakers:



**prof. Chien-Hsiang Chang**

Department of Chemical Engineering, National Cheng Kung University, Tainan, T'chaj-wan  
Cationic systems for a sustainable future:  
applications as drug carriers



**univ. prof. Niyazi Serdar Sariciftci**

Institute of Physical Chemistry,  
Johannes Kepler University, Linz, Austria  
Towards sustainable fuels created  
by CO<sub>2</sub> recycling



**prof. Izabela Radecka**

Faculty of Science and Engineering, University of  
Wolverhampton, Wolverhampton, United Kingdom  
From trash to treasure – importance  
of microbes in circular economy



**Jan Skoček, Ph.D.**

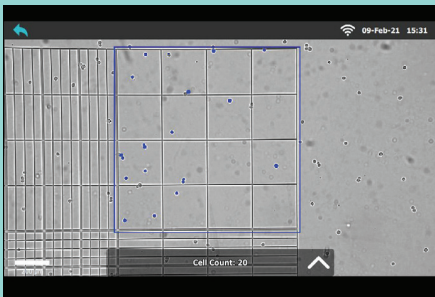
Heidelberg Materials, Leimen, Germany  
Via CO<sub>2</sub> mineralization towards  
circular concrete and cement



# cell monitoring REDEFINED

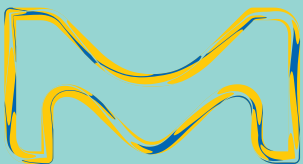
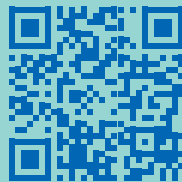
## The Millicell® DCI Digital Cell Imager

- Quickly and objectively measure common cell culture parameters including confluency, cell count, and morphology.
- Monitor an extensive range of adherent cell cultures including 3D cultures like spheroids and organoids and tricky or hard-to-grow cells.
- Hemocytometer or in-vessel measurement.
- Convenient, off-device web-based cloud service for data storage and retrieval of archival data and images and trend monitoring.



**Your small, intelligent digital brightfield microscope with new smart functions!**

To learn more, visit [MillicellDCI.com](http://MillicellDCI.com)



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

**Millipore®**

Preparation, Separation, Filtration & Monitoring Products