

Vážení čtenáři,

před čtyřmi lety byl můj úvodník v lednovém čísle Chemických listů představením cílů, které jsem chtěla se svými spolupracovníky splnit ve funkčním období 2005 až 2009. V říjnu loňského roku jsem byla zvolena do funkce předsedkyně na další volební období, a proto bych ráda bilancovala činnost České chemické společnosti za poslední čtyři roky.

V ČSCH se nesnížil počet členů, regionálních poboček i odborných skupin a je jednou z největších odborných společností v rámci Českého svazu vědeckotechnických společností. Časopis Chemické listy zvyšoval svou odbornou úroveň (vyjádřenou impaktovým faktorem) a do okruhu jeho čtenářů patří vedle chemiků zejména studenti středních a vysokých škol přírodovědného zaměření. Číslo návštěv jeho internetových stránek to potvrzuje. Vzrostl počet kolektivních členů a zájem obchodních a výrobních subjektů se účastnit odborných akcí organizovaných Společností. Asociace českých chemických společností, jejímž zakládajícím členem je ČSCH, plnila svou integrující funkci a vystupovala jako reprezentant českých chemiků vůči státním institucím. ČSCH si zachovala své dobré postavení v rámci Evropské unie. Jsme zastoupeni v řídicím komitétu EuCheMS, máme své zástupce v jednotlivých pracovních skupinách. V Olomouci proběhlo 2. setkání prezidentů národních chemických společností sousedních zemí. Daří se udržet zájem českých a slovenských chemiků o účast na národních sjezdech, které proběhly v Ústí nad Labem (2006), Tatrianských Matliaroch (2007 a 2009) a Olomouci (2008). Společnost byla pověřena vedením agentury komise European Chemistry Registration Board, byla úspěšným řešitelem projektů financovaných MŠMT a EU. Vedle již tradičně probíhajících soutěží o Ceny Alfreda Badera v organické, bioorganické a bioanorganické chemii se staly standardní součástí života Společnosti soutěže mladých chemiků organizované společně s kolektivními členy – Cena Merck, Cena Shimadzu a Cena Sigma-Aldrich. Profesionální úroveň má práce sekretariátu Společnosti a redakčního kruhu Chemických listů.

Co však ukázaly loňské volby do Hlavního výboru ČSCH? I přesto, že byly vedeny korespondenční a elektronickou formou, byl malý zájem o tuto nesporně významnou událost pro život Společnosti. V blízké době bude Společnost stát před generačním problémem, daří se mladé členy získávat, ale zájem o práci ve strukturách Společnosti příliš neprojevují. V příštím volebním období by mělo dojít k výrazné změně, pokud chceme nadále být dynamickým a nestagnujícím sdružením.

V nadcházejícím období budou významné především dvě události. 62. sjezd Asociace českých a slovenských chemických společností v Pardubicích, konaný na rozdíl od předcházejících sjezdů již v červnu tohoto roku (28. – 30. 6.) a časově na něj navazující 3. sjezd Evropských chemických společností 29. 8. – 2. 9. 2010 v Norimberku. Jsem přesvědčena, že účast na červnovém setkání

v Pardubicích bude jak ze strany českých, tak slovenských chemiků hojná a přihlášené příspěvky, které budou publikovány v červnovém čísle Chemických listů, budou reprezentovat vysokou odbornou úroveň naší chemie. Norimberské setkání evropských chemiků by mělo být inspirací pro naši Společnost, která byla pověřena organizací 4. evropského sjezdu EuCheMS v Praze v roce 2012. V této souvislosti je nutno se zamyslet nad tím, jak organizovat 64. sjezd Asociací tak, aby byl součástí (satelitem) této, pro české chemiky prestižní, konference.

Letošní rok by měl být také přípravou na rok 2011, který vyhlásilo UNESCO Mezinárodním rokem chemie – IYC2011. Jeho hlavním mottem je „**Chemistry – our life, our future**“ (blíže viz <http://www.chemistry2011.org>). Měla by to být příležitost pro všechny členy Společnosti, jak více přiblížit a popularizovat chemii široké veřejnosti. Již nyní jsou připravovány akce zaměřené např. na školní mládež nejen na národní úrovni, ale také ve spolupráci se sousedními národními chemickými společnostmi (např. „Jarmark“, „Chemie na Slezskoostravském hradě“, „Malovaná chemie“).

Pro nové volební období bude důležité ekonomicky zajistit vlastní chod Společnosti, jí poskytované služby členům – organizátorům akcí, vydávání Chemických listů a podporu účasti mladých chemiků na odborných akcích. Vedle členských příspěvků by mělo být jedním z nejvýznamnějších zdrojů financování Společnosti organizování odborných setkání či konferencí s domácí, resp. mezinárodní účastí. Oceňuji, že odborné skupiny a pobočky přijaly nová pravidla a některé z nich výrazně přispěly k pořádání akcí na činnost Společnosti. Jmenovitě uvádím sjezdy v Ústí nad Labem a Olomouci, ostravskou pobočku, odborné skupiny organické, analytické, potravinářské chemie, termodynamiky a sacharidů. Dalšími významnými zdroji jsou příspěvky kolektivních členů, podíl ze zisku vydávání evropských chemických časopisů v rámci konsorcia ChemPubSoc Europe a grantové prostředky. Redakce Chemických listů bude snižovat náklady na tisk nabídkou zaslání pouze elektronické formy čtyř čísel spojených s Bulletinem. Rovněž webové stránky Společnosti zvýší svou informační aktuálnost tak, aby se staly poutavější pro čtenáře a zajímavé pro inzerci aktivit kolektivních členů. Každý z uvedených zdrojů má svůj potenciál ztratit a zisků a záleží na přístupu každého z nás, na jakou stranu vah se mísky vychýlí. Členství ve Společnosti musí být pro jednotlivce a kolektivní členy oboustranně prospěšné. Věřím, že se budeme společně setkávat na řadě odborných akcí a budeme mít možnost diskutovat úspěchy, ale i problémy, které nám příští léta přinesou.

Dovolte mi závěrem popřát nám všem nejen do roku 2010, ale i let následujících, ať se nám daří pracovně i lidsky a ať si v dnešní uspěchané době najdeme vždy dostatek času i pro sebe a své blízké.

Jitka Ulrichová

Redakce časopisu

Chemické listy

uděluje

**CENU
Karla PREISE
za rok 2009**



Lence Beranové, Janě Humpolíčkové a Martinu Hofovi

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Praha

za práci

Fluorescenční korelační spektroskopie

Chem. Listy 103, 125 (2009)

SRDEČNĚ BLAHOPŘEJEME

PROTILÁTKY PROTI SPERMIÍM

TEREZIE SEDLÁČKOVÁ^a, JARMILA ZÍDKOVÁ^a, ANDREA BRÁZDOVÁ^a, MAGDALENA MELČOVÁ^a, VOJTĚCH ŠKOP^a, JAN CIBULKA^b a ZDENA ULČOVÁ-GALLOVÁ^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, Praha 6, ^b Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN Plzeň, 326 00 Lochotín jarmila.zidkova@vscht.cz

Došlo 4.12.08, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: neplodnost, protilátky proti spermiím, autoantigen, semenná plazma

Obsah

1. Úvod
2. Vznik a působení protilátek proti spermiím
 - 2.1. Původ protilátek proti spermiím u mužů
 - 2.2. Původ protilátek proti spermiím u žen
 - 2.3. Tekutiny obsahující protilátky proti spermiím
 - 2.4. Povaha protilátek proti spermiím
 - 2.5. Potenciální mechanismy působení protilátek proti spermiím
3. Závěr

1. Úvod

V současné době se asi jedna pětina párů ve vyspělých zemích včetně České republiky potýká s neplodností. Neplodnost je podle Světové zdravotnické organizace definována jako neschopnost páru počít dítě během jednoho roku nechráněného pohlavního styku.

Příčiny neplodnosti jsou nejrůznějšího charakteru. Snížená plodnost může být způsobena např. nesprávným životním stylem, konzumací návykových a omamných látek, hormonálními poruchami, genetickými odchylkami a souvisí též s psychickým stavem. Také nesprávná funkce imunitního systému může vést ke snížení plodnosti. Mezi nejrozšířenější poruchu imunitního systému patří tvorba protilátek proti lidským pohlavním buňkám, zejména pak proti spermiím. Jde o tzv. protilátky proti spermiím (antisperm antibodies – ASA)^{1,2}.

Již na počátku 20. století bylo zjištěno, že zvířecí spermie mohou být imunogenní. Experimentální zvířata skutečně po imunizaci spermiemi produkovala protilátky. Mnohé studie se poté zaměřily na určení orgánové a druhotné specifity antigenů na spermiích¹. Byla také popsána

přítomnost protilátek, které aglutinovaly a imobilizovaly spermie v krevních sérech žen, které nemohly z nevysvětlitelných důvodů otěhotnět. Rovněž bylo zjištěno, že v krevních sérech některých neplodných mužů se vyskytovaly protilátky proti spermiím a jejich neplodnost korelovala s hladinou těchto protilátek³.

ASA lze nalézt jak u mužů, tak u žen. Jejich výskyt byl zaznamenán u 9–36 % neplodných párů^{4–7}, přičemž u neplodných mužů se vyskytují asi v 8–21 % a u neplodných žen asi v 6–23 % celkové populace^{4,6–8}. Zároveň se však vyskytují asi u 12,5 % plodných mužů a u 1,4 % plodných žen^{5,7}. Nelze tedy říci, že všechny ASA, které se vyskytují, způsobují neplodnost^{5–7,9}. Jsou známy jak monoklonální, tak polyklonální protilátky, které se vážou na spermie, ale neinhibují proces fertilizace ani *in vitro*, ani *in vivo*⁵.

V současné době lze pomoci neplodným párům s takovou poruchou metodou intracytoplasmatické injekce (ICSI – intracytoplasmatic sperm injection), kdy je jediná spermie zavedena mikroinjekcí do cytoplasmy oocyty. Z tohoto důvodu se poněkud vytratil zájem o další výzkum ASA. Přesto však zůstává několik důvodů, proč ASA dále studovat. Existuje totiž široká škála mechanismů, kterými ASA působí. Porozumění těmto mechanismům spolu s moderní diagnostikou by mohlo umožnit lepší vytipování pacientů, u kterých ASA skutečně způsobují neplodnost, od pacientů, u kterých je sice výskyt ASA potvrzen, ale není pro jejich neplodnost významný. Navíc se již od 30. let 20. století systematicky testují kontracepční vakcíny pro ženy. Prohloubení našich znalostí o ASA by mohlo přispět k nalezení takového antigenu, s jehož pomocí by mohla být vyvinuta taková vakcína, která by byla bezpečná a navodila by reverzibilní, ale spolehlivou neplodnost¹⁰.

2. Vznik a působení protilátek proti spermiím

2.1. Původ protilátek proti spermiím u mužů

Protože tolerance k autoantigenům vzniká časně a spermie je buňka, která se do puberty nevyvíjí, nerozpozná dospělý imunitní systém sobě vlastní antigeny, které jsou na spermii, a vyvolá proti spermiím imunitní odpověď. Proto musí anatomické a fyziologické mechanismy spermie před vlastní imunitní odpovědí aktivně chránit⁶.

Takovou ochranou je pro spermie hematotestikulární bariéra. Ta je složena z kontinuální vrstvy Sertoliho buněk uvnitř semenotvorných kanálků. Sertoliho buňky jsou velmi těsně propojeny a vytváří tak prostředí v centrální části semenotvorných kanálků, kam se nedostanou velké proteiny a buňky imunitního systému. Tato těsná spojení se u savců do puberty netvoří. Touto vrstvou se oddělí spermie a jejich prekurzory od imunitního systému. Není to

však jediný mechanismus ochrany spermií. U muže je mnohem větší množství spermií uloženo v nadvarletí a chámovodu než v semenotvorných kanálcích. Tyto části mužského reprodukčního traktu ale nemají kompletní anatomickou bariéru, a proto nemohou zabránit případnému vstupu buněk imunitního systému či úniku specifických antigenů spermií do mikrocirkulace, což může navodit imunitní odpověď. Proto existují imunosupresivní faktory, které brání rozvoji imunitní reakce proti antigenům spermií. Přesné mechanismy imunosuprese však ještě nebyly zjištěny^{7,10}. Předpokládá se však, že výskyt určité subpopulace CD8 lymfocytů (supresorové buňky) a CD8 aktivátorů ve spermatu brání destrukci spermií imunitním systémem¹¹. Uvažuje se např. i to, že malý únik specifických spermio- vých antigenů může navodit pozdní autotoleranci¹².

K poškození hematotestikulární bariéry může dojít při testikulárním traumatu, kongenitální absenci chámovodu^{8,10} nebo při jejím porušení při vasektomii^{3,4,8,10,13}, dále při varikokéle (rozšíření žilní pleteně v oblasti varlat), příušnicích, které jsou komplikované zánětem varlete^{5,8} a při úrazu páteře⁸. ASA byly detegovány také u pacientů s cystickou fibrózou⁷. V některých případech však může dojít k tvorbě ASA z nezjištěných příčin.

2.2. Původ protilátek proti spermiím u žen

Už v průběhu 20. a 30. let minulého století bylo zjištěno, že po intramuskulární imunizaci spermiemi u žen, které byly v minulosti plodné, u nich došlo k produkci potenciálně spermatoxického faktoru, který je chránil před těhotenstvím a byl měřitelný v séru. Proto lze spermii považovat za buňku, která může být pro ženu potenciálně imunogenní¹⁰.

Vagina a děložní hrdlo jsou vybaveny velmi aktivním slizničním imunitním systémem¹⁰. Je také dobře známo, že pohlavní styk stimuluje velký příliv leukocytů, neutrofilů a makrofágů do oblasti cervixu a dělohy. Tato zánětlivá imunitní odpověď pomáhá eliminovat abnormální spermie nebo spermie, které neoplovnily, zdá se však také, že tato imunitní odpověď je důležitá v přípravě ženského reprodukčního traktu na implantaci embrya, čímž zlepšuje plodnost¹⁴. Faktory obsažené v semenné plasmě spermatu, zvláště transformující růstový faktor β (transforming growth factor- β , TGF- β) a prostaglandiny, brání ve vývoji paternálně specifické imunitní odpovědi. TGF- β inhibuje proliferaci B-buněk, ale zároveň indukuje jejich přechod k produkci IgA. Tento efekt tedy může podporovat tvorbu ASA v ženském systému. To, jak se TGF- β projeví, závisí na jeho množství a také na koncentraci ostatních cytokinů a signálních molekul v lokálním prostředí. Množství aktivního a celkového TGF- β je různé v různých ejakulátech. Proto jeho množství a přítomnost ostatních cytokinů nebo imunoregulačních molekul v ejakulátu může hrát roli v tom, zda žena začne produkovat ASA či nikoliv. Zatím ale nebylo ověřeno, zda produkce ASA u žen koreluje s množstvím TGF- β , prostaglandinů a ostatních imunoregulačních buněk v partnerově ejakulátu¹⁰.

2.3. Tekutiny obsahující protilátky proti spermiím

ASA lze u mužů detegovat v krevním séru^{1–3}, semené plasmě^{3,10} a také na povrchu spermie^{5,15}. U mužů, kteří ASA tvoří z nezjistitelných příčin, tj. neutrpěli trauma varlat, atd., není jejich původ zcela jasný, ale předpokládá se, že jsou produkovány lokálně a nejde tedy o krevní transudát¹⁰.

U žen je produkce ASA lokálního charakteru. Zpočátku je lze nalézt v hlenu děložního hrdla. Jestliže je žena dlouhodobě a opakovaně imunizována stykem s antigeny spermií, začnou se pak ASA tvořit i v dalších částech reprodukčního traktu. Lze je pak najít v děložní dutině, vejcovodech, břišní dutině folikulární tekutině a krevním séru¹⁰.

2.4. Povaha protilátek proti spermiím

ASA obsažené v tekutinách neplodných jedinců jsou často ze třídy IgG, dále se vyskytují i IgA a IgM. U IgA se předpokládá, že by mohlo jít o lokálně produkovanou protilátku¹⁶, protože je součástí slizniční imunity. IgA koluje také v krvi a jeho poměr k IgG (nejčastější typ protilátek) 1:5 je zachován jak v séru, tak v ostatních tekutinách, např. cervikálním hlenu¹⁷.

2.5. Potenciální mechanismy působení protilátek proti spermiím

Bylo zjištěno několik možných mechanismů, kterými mohou ASA působit na spermie – mohou spermii imobilizovat a znemožnit tak její transport, mohou ovlivnit kapacitaci a akrosomovou reakci, a tím i průnik spermie do vajíčka. ASA mohou také aktivovat komplement a působit proti embryu.

Spermie musí po ejakulaci překonat překážku v podobě cervikálního hlenu. Ten je v době ovulace hojný a řídký, proto je v této době průnik spermie nejjednodušší. Cervikální hlen zároveň působí jako filtr, který nepustí do vyšších pasáží ženského reprodukčního traktu abnormální spermie a oddělí je tak od zdravých nepoškozených spermií, které mohou dále postupovat. ASA mohou poškodit běžnou interakci spermie s cervikálním hlenem^{18–20} tím, že inhibují průnik spermií cervikálním hlenem, i když jsou spermie zcela nepoškozené²¹, a to především lokálně produkované ASA typu IgA^{22,23}. Pravděpodobně sekretorní komponenta IgA vázaného k povrchu spermie se váže také ke glykoproteinům cervikálního hlenu a způsobuje tak kývavý pohyb spermie v hlenu²⁴, rovněž Fc-oblasti IgA spermie mohou způsobit tento jev²⁵. ASA mohou zpomalit nebo inhibovat pohyb spermií v děložní dutině a vejcovodech²⁶.

Aby mohla spermie oplodnit vajíčko, musí po ejakulaci projít mnoha změnami, které se souhrnně nazývají kapacitace. Tento proces ještě není plně objasněn, sestává ale z fosforylace proteinů a redistribuce lipidů a vyústí v destabilizaci membrány^{27,28} a je důležitý pro usnadnění akrosomální reakce, která pak vede ke splynutí spermie

a oocyty. ASA mohou svou vazbou bránit ve změně fluidity membrány a tím znemožnit proces kapacitace²⁹. Názory na ovlivnění akrosomové reakce prostřednictvím ASA se však různí: např. procento spermií, u kterých proběhla akrosomová reakce je vyšší u těch, na které byly navázány ASA³⁰, naopak ASA nemají žádný efekt na akrosomovou reakci³¹. Tyto příklady ukazují, že ASA mají na kapacitaci a akrosomovou reakci různý vliv; některé mohou tyto děje nepříznivě pozměnit, jiné ne.

Jako komplement se označuje soustava zhruba 30 sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou, tak s dalšími imunitními mechanismy. Základními složkami komplementu jsou sérové proteiny označované C1–C9. Po různých podnětech dochází ke kaskádovitě aktivaci jednotlivých složek. Meziprodukty této kaskádovité reakce mají výrazné biologické funkce (opsonizace, chemotaxe). Terminální produkt komplementové kaskády perforuje membrány cizorodých mikroorganismů nebo buněk, působí jejich lysi, a tím je zabíjí³². Interakce komplement-aktivujících ASA s normálními spermii vede k významnému snížení pohyblivosti spermií a také k morfologickým změnám na spermii a následně lysi *in vitro*³³. Bylo dokázáno, že ASA vázající se na spermie získané z ejakulátů mužů s ASA jsou schopné aktivovat komplement³⁴.

Studie na různých zvířecích modelech ukázaly asociaci mezi ASA a post-implantační degenerací embrya³⁵, v jedné studii u králíka byla nalezena křížová reakce tekutin obsahujících ASA s králíčí morulou a blastocystou, která měla embryotoxický efekt *in vitro* kultuře³⁶. Existují však i některé důkazy, které spojují imunitu proti spermii s postfertilizačními účinky u lidí, např. se spontánními potraty v prvním trimestru u žen s ASA¹⁰. Důvodů, proč by ASA měly reagovat s embryem, je několik. Za prvé je membrána spermie integrována jako mozaika do membrány zygoty při oplodnění, a tak jsou antigeny spermií obsaženy ve vyvíjejícím se embryu, i když pouze v jen velmi nízké hustotě³⁷. Expresí genů v embryu může vést k syntéze antigenů, se kterými mohou ASA křížově interagovat. Tudiž při vývoji embrya, zejména pak při rýhování blastocysty, mají ASA příležitost k vazbě na křížově reagující antigen a potenciálně tak mohou způsobit degeneraci embrya nebo případně znemožnit jeho implantaci³⁸.

3. Závěr

Problém neplodnosti se v posledních letech stává stále více aktuálním tématem. Žijeme v moderní rychlé době s velkým množstvím stresových situací, vzhledem k současnému životnímu stylu neustále přibývá neplodných párů. Snahou a cílem současného vědeckého úsilí je pokud možno co nejméně invazivním způsobem těmto lidem pomoci a zároveň popsat faktory, které neplodnost způsobují a mechanismus, jakým k tomu dochází. Těchto faktorů je celá řada, od nejruznějších chorob a genetických vlivů až po životní prostředí, psychický stav a antikoncepci. Mnohé z faktorů spolu souvisí, jejich negativní účinek

se ovlivňuje a může vyústit právě v neschopnost početí.

Vznik protilátek proti spermii (ASA) jak u mužů, tak u žen může souviset s řadou vnějších i vnitřních faktorů a stává se proto častou příčinou neplodnosti. Existuje velmi mnoho mechanismů, jakými mohou ASA negativně působit. Důkladný popis a pochopení těchto mechanismů, které je předmětem vědeckého bádání, by v budoucnu mohlo vést ke spolehlivému sledování poruch a později k navržení účinné terapie neplodnosti.

Tato práce byla podpořena granty: výzkumný záměr MŠMT 0021620812 a výzkumný záměr MŠMT 60446137305.

LITERATURA

1. Bronson R. A.: *J. Reprod. Immunol.* 45, 159 (1999).
2. Mazumdar S., Levine A. S.: *Fertil. Steril.* 70, 799 (1998).
3. Bohring C., Klepper L., Krause W.: *Andrologia* 36, 286 (2004).
4. Rümke P. H., Hellinga G.: *Am. J. Clin. Pathol.* 32, 357 (1959).
5. Bohring C., Krause W.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 50, 411 (2003).
6. Naz R. K.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 51, 390 (2004).
7. Ohl D. A., Naz R. K.: *Urology* 46, 591 (1995).
8. Shibahara H., Tsunoda T., Taneichi A., Hirano Y., Ohno A., Takamizawa S., Yamaguchi C., Tsunoda H., Sato I.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 47, 146 (2002).
9. Kamieniczna M., Domagała A., Kurpisz M.: *Med. Sci. Monit.* 9, 142 (2003).
10. Chamley L. W., Clarke G. N.: *Semin. Immunopathol.* 29, 169 (2007).
11. Witkin S. S.: *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 17, 61 (1988).
12. Tung K. S. K., Unanue E. R., Dixon F. J.: *J. Immunol.* 106, 1463 (1971).
13. Hellema H. W. J., Rümke P.: *Clin. Exp. Immunol.* 31, 18 (1978).
14. Robertson S. A.: *Cell Tissue Res.* 322, 43 (2005).
15. McLachlan R. I.: *J. Reprod. Immunol.* 57, 35 (2002).
16. Kutteh W. H., Kilian M., Ermel L. D., Byrd E. W., Mestecky J.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 31, 77 (1994).
17. Davajan V., Nakamura R. M., Saga M.: *Biol. Reprod.* 6, 443 (1972).
18. Bronson R. A., Cooper G. W., Rosenfeld D. L.: *Fertil. Steril.* 41, 609 (1984).
19. Check J. H., Bollendorf A., Katsoff D., Kozak J.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 32, 38 (1994).
20. Clarke G. N.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 6, 195 (1984).
21. Morgan H., Stedronska J., Hendry W. F., Chamberlein G. F., Dewhurst C. J.: *Lancet* 1, 1228 (1977).
22. Menge A. C., Medley N. E., Mangione C. M., Dietrich J. W.: *Fertil. Steril.* 38, 439 (1982).
23. Menge A. C., Beitner O.: *Fertil. Steril.* 51, 486 (1989).
24. Kremer J., Jager S.: *Int. J. Androl.* 3, 143 (1980).

25. Bronson R. A., Cooper G. W., Rosenfeld D. L., Gilbert J. V., Plaut A. G.: *Fertil. Steril.* 47, 985 (1987).
26. Shibahara H., Shigeta M., Toji H., Koyama K.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 34, 120 (1995).
27. Flesch F. M., Gadella B. M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1469, 197 (2000).
28. de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C.: *Mol. Hum. Reprod.* 3, 175 (1997).
29. Benoff S., Cooper G. W., Hurley I., Mandel F. S., Rosenfeld D. L.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 30, 113 (1993).
30. Romano R., Santucci R., Marrone V., Francavilla F.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 29, 56 (1993).
31. Francavilla F., Romano R., Santucci R.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 25, 77 (1991).
32. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha 2005.
33. D'Cruz O. J., Haas G. G., Wang B. L., DeBault L. E.: *J. Immunol.* 146, 611 (1991).
34. D'Cruz O. J., Wang B. L., Haas G. G.: *Biol. Reprod.* 46, 721 (1992).
35. Menge A. C.: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 10, 171 (1970).
36. Menge A. C., Rosenberg A., Burkons D. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145, 371 (1974).
37. O'Rand M. G.: *J. Exp. Zool.* 202, 267 (1977).
38. Menge A. C., Naz R. K.: *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18, 17 (1988).

T. Sedláčková^a, J. Zídková^a, A. Brázdová^a, M. Melčová^a, V. Škop^a, J. Cibulka^b, and Z. Ulčová-Gallová^b (^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University and Faculty Hospital, Pilsen*): **Antisperm Antibodies**

Infertility affects about 20 % of the population in advanced countries including the Czech Republic. The reasons are hormonal, genetic, mental or immunological abnormalities. The most common immunological disorder is the production of antibodies against oocytes and sperm cells. The sperm cell has a potentially immunogenic structure for both women and men. Anti-sperm antibodies can be used for monitoring infertility. Several antigens on sperm cells have been characterized.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
upozorňuje na přijímací řízení v**

**bakalářských oborech studijního programu
Chemie, Biochemie, Klinická a toxikologická analýza
ve školním roce 2010/2011.**

Ke studiu budou přijati uchazeči s ukončeným úplným středním nebo úplným středním odborným vzděláním, kteří splní požadavky testu všeobecných studijních předpokladů. Přihlášky a podrobné informace lze získat na adrese: PřF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel: 221 951 155, 221 951 156. Přihlášky ke studiu se přijímají do 28. února 2010.

**Další informace naleznete na webových stránkách PřF UK
www.natur.cuni.cz.**

PROTEÍNY CYTOPLAZMATICKEJ MEMBRÁNY ZAHRNUTÉ V REZISTENCII BUNIEK KVASINIEK VOČI CHEMOTERAPEUTIKÁM

KATARÍNA BALKOVÁ a YVETTA GBELSKÁ

Katedra mikrobiológie a virológie, člen Výskumno-vzdelávacieho centra excelentnosti APVV „Biomembrány 2008“, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

balkovak@fns.uniba.sk, gbelska@fns.uniba.sk

Došlo 22.12.08, prepracované 26.3.09, prijaté 2.4.09.

Kľúčové slová: mnohonásobná rezistencia, kvasinky, transportné proteíny,

Obsah

1. Úvod
2. Štruktúra biologickej membrány vo vzťahu k jej funkcii
3. Chemické zloženie membrán ovplyvňuje citlivosť buniek voči chemoterapeutikám
 - 3.1. Vylučovacie pumpy typu ABC
 - 3.2. Porovnávací analýza génov špecifikujúcich ABC transportéry kvasiniek
 - 3.3. Vylučovacie pumpy typu MFS
4. Interakcia substrátu s transportným proteínom
5. Homeostáza sfingolipidov je koregulovaná génami MDR
6. Záver

1. Úvod

Neustále sa zvyšujúci počet patogénnych mikroorganizmov, ktoré sú rezistentné voči mnohým antibiotikám, je hlavným problémom pri liečbe pacientov s nemocničnými alebo získanými infekciami spôsobenými baktériami, kvasinkami, hubami a parazitickými mikroorganizmami. Terapiu mnohých patologických stavov (vrátane rakoviny a fungálnych infekcií) komplikuje rozvoj tzv. mnohonásobnej rezistencie (multidrug resistance – MDR) v cieľových bunkách, ktorá sa prejavuje ich odolnosťou voči rôznym, štruktúrne odlišným chemoterapeutikám¹. MDR je najčastejšie dôsledkom vylučovania cytotoxických zlúčenín z buniek, ktoré zabezpečujú efluxné pumpy asociované s plazmatickou membránou. Biologické membrány sa skladajú z lipidov, proteínov a sacharidov. Lipidovú časť tvoria fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Väčšina integrálnych proteínov membrán obsahuje jednu alebo viac transmembránových domén, ktoré sú schopné interak-

cie s príslušnými lipidmi a proteínmi. Permeabilita membrán je determinovaná zložením prítomných lipidov ako aj proteínov. Vo všeobecnosti, lipidovou dvojvrstvou prestupujú nepolárne zlúčeniny difúziou, zatiaľ čo proteíny tvoria v membránach kanály resp. transportéry pre ióny a hydrofilné substancie.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú vhodným biologickým modelom pre štúdium štruktúry a funkcie biologických membrán, vzhľadom na skutočnosť, že mnohé komponenty membrán sú evolučne konzervované. S ohľadom na konzervovanosť a dostupnosť sofistikovaných genetických, cytologických a biochemických prístupov sa stali fakultatívne anaeróbne kvasinky *S. cerevisiae* základným modelovým organizmom pre štúdium kľúčových procesov biológie eukaryotickej bunky. Popri *S. cerevisiae* sa venuje čoraz väčšia pozornosť aj iným druhom kvasiniek, ktoré sú významnými humánnymi patogénmi, prípadne druhmi využívanými v potravinárskych technológiách.

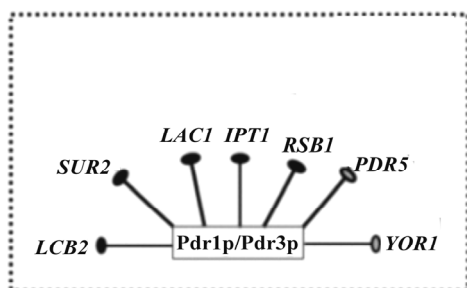
2. Štruktúra biologickej membrány vo vzťahu k jej funkcii

Biologické membrány, esenciálne pre existenciu živého systému, vznikli v evolúcii veľmi skoro, za účelom zabezpečiť oddelenie živého systému od okolitého prostredia. Základnými štruktúrnymi komponentami biologických membrán sú bielkoviny a lipidy. Lipidy determinujú fyzikálne vlastnosti membrán a bielkoviny sú primárne zodpovedné za funkčné vlastnosti biologických membrán. Rozloženie lipidov vo vnútornej a vonkajšej vrstve membrány je asymetrické. Biologické membrány predstavujú selektívnu bariéru pre hydrofilné molekuly, ktoré pre vstup do cytoplazmy vyžadujú špeciálne transportné systémy. Hydrofóbne a amfifilné molekuly môžu ľahko prestupovať fosfolipidovou dvojvrstvou membrány a mnohé z nich sú škodlivé pre metabolické procesy bunky. Všetky bunky sú vybavené špecializovanými systémami, ktoré sú schopné detegovať, koncentrovať a exportovať cytotoxické zlúčeniny, ktoré sa difúziou dostali do vnútra buniek^{2,3}. Laterálna heterogenita lipidického zloženia membrány, jej hydrofobicita a hrúbka môže ovplyvňovať aktivitu, orientáciu, stabilitu a agregáciu membránových proteínov. Aktivity membránových proteínov je do značnej miery závislá na lipidickom zložení membrány.

Dôležitými štruktúrnymi zložkami eukaryotických membrán sú sfingolipidy, ktoré zabezpečujú a udržiavajú rigiditu membrány. Popri svojej štruktúrnej úlohe sa sfingolipidy, spolu so svojimi prekurzormi, zúčastňujú regulácie niektorých metabolických aktivít eukaryotickej bunky. Za tzv. bioaktívne lipidy, ktoré sa tvoria počas biosyntézy sfingolipidov, sa považujú dihydrosfingozín a sfingozín (fytosfingozín u kvasinky *S. cerevisiae*), označované ako

LCB_s (long chain bases). LCB_s sú substrátmi pre enzým ceramid syntázu, ktorá zabezpečuje biosyntézu ceramidov. V eukaryotických bunkách existujú LCB_s vo fosforylovanej a nefosforylovanej forme, ktoré sú vo vzájomnej rovnováhe. Lipidom plazmatickej membrány sa popri štruktúrnej funkcii pripisuje tiež úloha v prenose signálov z vonkajšieho prostredia do vnútra bunky. Ukazuje sa, že mnohé funkcie bunkových membrán sú úzko spojené s rôznymi špecializovanými doménami, ktoré sú bohaté na steroly a sfingolipidy. Oblasti membrány rezistentné voči detergentom s vyšším podielom ergosterolu, sfingolipidov a špecifických membránových proteínov sa nazývajú rafty. Viaceré experimentálne štúdie naznačujú, že fluktuácie v zložení membránových lipidov majú vplyv na lokalizáciu a správnu funkciu efluxných púmp zahrnutých vo fenoméne MDR. Ukázalo sa, že efluxné pumpy z ABC rodiny (ATP binding cassette) sú obzvlášť citlivé na narušenie rovnováhy komponent lipidových raftov membrány². Predpokladá sa, že lipidové rafty prispievajú napr. k morfogénze hýf a pravdepodobne aj k virulencii patogénnej kvasinky *Candida albicans*². Pokles množstva ergosterolu a sfingolipidov v plazmatickej membráne kvasinky *C. albicans* vedie k oslabeniu funkcie vylučovacej pumpy Cdr1p z ABC rodiny kódovanej génom *CDR1*^{2,4}. Uvedené fakty naznačujú, že hlavný ABC transportný proteín kvasinky *C. albicans* Cdr1p sa pravdepodobne nachádza v špecifických mikrodoménach membrány – raftoch a akékoľvek porušenie tejto štruktúry ovplyvňuje lokalizáciu a funkčný stav transportného proteínu².

V kvasinkách *S. cerevisiae* sú efluxné pumpy ABC rodiny súčasťou regulačnej siete tzv. MDR, v ktorej sa ako hlavné regulátory expresie špecifických transportných proteínov uplatňujú proteíny so štruktúrnym motívom zinkového prstu Pdr1p/Pdr3p. Oba transkripčné faktory sa viažu ku konsenzus sekvenciám v promótoroch regulovaných génov tzv. PDRE (pleiotropic drug resistance element)⁵. Na druhej strane, prítomnosť PDRE elementov, v promótoroch viacerých génov zúčastňujúcich sa biosyn-



Obr. 1. Gény biosyntetickej dráhy sfingolipidov a MDR kontrolované Pdr1p/Pdr3p v *S. cerevisiae*. LCB2 – serín palmitoyltransferáza; SUR2 – sfingamín C4-hydroxyláza; LAC1 ceramid syntáza; IPT1 – inozitol fosfotransferáza; PDR5, YOR1, RSB1 – ABC transportné proteíny. Upravené podľa Panwar a spol., 2008, cit.⁴

tézy sfingolipidov, naznačuje úzke prepojenie medzi MDR sieťou a biosyntézou sfingolipidov v bunkách *S. cerevisiae*⁵ (obr. 1). Pod kontrolou regulačnej siete MDR, v kvasinkách *S. cerevisiae* je produkt génu *IPT1* (kóduje inozitol-fosfotransferázu), ktorý je zahrnutý v konečnom kroku biosyntézy sfingolipidov. Strata génu *IPT1* vedie k zmene citlivosti *ipt1Δ* mutantov voči liečivám, čo naznačuje, že normálny obsah lipidov v membráne je potrebný pre zachovanie tolerance buniek kvasiniek voči cytotoxickým zlúčeninám⁵.

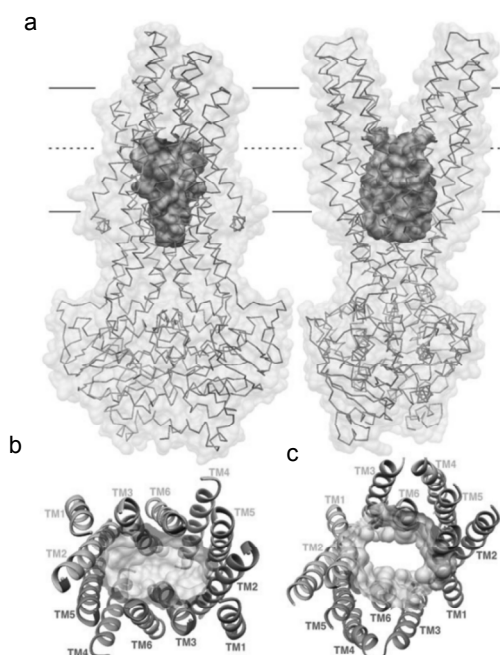
Genetickú interakciu medzi sieťou MDR a dráhou biosyntézy sfingolipidov v kvasinkách *S. cerevisiae* dokumentuje tiež fakt, že gén *RSB1*, kódujúci membránový transportný proteín, podlieha regulácii prostredníctvom proteínu Pdr1p. Produkt génu *RSB1* – Rsb1p vylučuje prekursor ceramidov označované ako LCB, ktorých akumulácia môže byť pre bunku toxická⁶. Prepojenie medzi fenoménom MDR a homeostázou membránových lipidov naznačuje, že dosiaľ nevyjasnená fyziologická úloha MDR siete by mohla spočívať v zabezpečovaní/regulácii štruktúry a funkcie plazmatickej membrány na úrovni zloženia lipidov a membránových transportných proteínov.

3. Transportné proteíny membrány zahrnuté v mnohonásobnej rezistencii

3.1. Vylučovacie pumpy typu ABC

Evolučne konzervované transportné proteíny z rodiny ABC zabezpečujú transport rôznych substrátov cez biologickú membránu. Zohrávajú esenciálnu úlohu v ochrane buniek pred toxickými zlúčeninami/metabolitmi^{3,7} (obr. 2). ABC transportné proteíny kvasiniek *S. cerevisiae* sú zahrnuté v rôznych funkciách: v maturácii cytosolických Fe/S proteínov, v transporte feromónov, v biogenéze peroxizómov, v odpovedi buniek na stres, v homeostáze lipidickej dvojvrstvy plazmatickej membrány. Proteíny typu ABC uskutočňujú prostredníctvom hydrolýzy ATP transport veľkého množstva štruktúrne a funkčne nepríbuzných látok vrátane liečiv, z buniek. Rodiny génov zahrnuté v kontrole MDR *S. cerevisiae* sa našli u všetkých dosiaľ študovaných druhov hemiascomycét, čo dokumentuje význam ich evolučnú konzervovanosť, ale aj fyziologický význam.

ABC proteíny sa skladajú z jednej alebo dvoch domén viažúcich nukleotid (NBD nucleotide binding domain), jednej alebo dvoch transmembránových domén (TMD transmembrane domain) (obr. 3a). Obsahujú približne 200 konzervovaných aminokyselinových zvyškov nachádzajúcich sa v motívoch označovaných Walker A, Walker B a tzv. ABC signatúru s motívom SGG (Q). Transportné proteíny ABC rodiny sú energizované hydrolýzou ATP, molekulárny mechanizmus transportu však nie je zatiaľ objasnený.



Obr. 2. Štruktúra bakteriálneho ABC transportného proteínu *Staphylococcus aureus*; topológia proteínu v membráne (a), rozloženie TMD vo vnútornej (b) a vonkajšej (c) vrstve membrány. Prezaté z Dawson and Locher, 2006, cit.²²

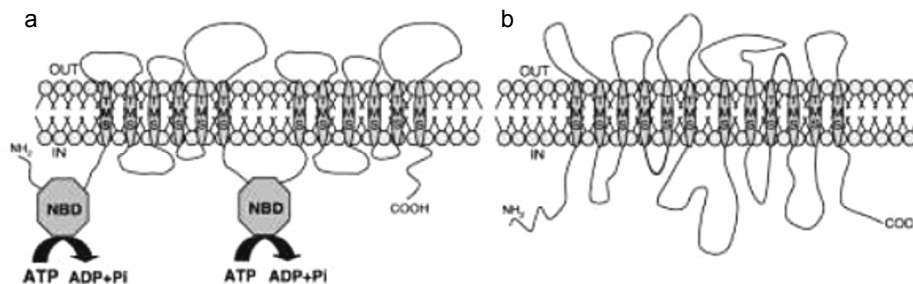
3.2. Porovnávací analýza génov špecifikujúcich ABC transportéry kvasiniek

Na základe sekvenčnej podobnosti boli gény špecifikujúce ABC transportné proteíny kvasiniek *S. cerevisiae* rozdelené do šiestich rodín⁸. Z hľadiska štruktúry, funkcie a fylogenie bola intenzívne študovaná hlavná vylučovacia pumpa – Pdr5p *S. cerevisiae*, predovšetkým pre podobnosť s P-glykoproteínom cicavčích buniek. P-glykoproteín je asociovaný s rezistenciou rakovinových buniek voči antionkogénnym chemoterapeutikám. Jeho funkcia, po-

dobne ako funkcia proteínu Pdr5p kvasiniek *S. cerevisiae*, sa študovala cieľnou mutagenézou za účelom identifikovať zvyšky aminokyselín nevyhnutné pre transportnú aktivitu proteínu⁹. S cieľom determinovať oblasť proteínu významnú pre detekciu substrátu sa sledovala priama interakcia proteínu s rôznymi substrátmi, naviazanie substrátu na transportný proteín a jeho export z bunky. Z hľadiska substrátu sa sledoval vplyv dĺžky uhlíkového reťazca, iónového zloženia, hydrofobicity a veľkosti molekuly substrátu na transportnú aktivitu proteínu³.

Podarilo sa identifikovať niekoľko zvyškov aminokyselín, ktorých zámena vedie k zmene substrátvej špecificity proteínu Pdr5p, zmene citlivosti proteínu Pdr5p voči inhibítorom, prípadne k zmene lokalizácie proteínu¹⁰. Ukázalo sa, že selekcia substrátu je determinovaná nielen štruktúrou a aminokyselinovým zložením TMD, ale aj asymetrickými NBD, t.j. miestami, kam sa viaže ATP. Pre správnu funkciu transportného proteínu je rozhodujúca špecifická interakcia medzi NBD a TMD⁹.

Gén *KIPDR5*, špecifikujúci Pdr5p biotechnologicky významnej kvasinky *Kluyveromyces lactis* zdieľa 72% identitu s génom kódujúcim Pdr5p kvasinky *S. cerevisiae* a 53,5% identitu s génom kódujúcim CgCdr1p patogénnej kvasinky *C. glabrata*. Všetky tri homologické ABC transportné proteíny sa vyznačujú rovnakou topologickou organizáciou domén (NBD-TM)₂ (obr. 3a). Proteín *KIPdr5p* má 1525 aminokyselín, je o 49 aminokyselín dlhší ako homologický proteín *ScPdr5p* a o 61 aminokyselín dlhší ako proteín *CgCdr1p*. Všetky proteíny sú lokalizované v plazmatickej membráne a majú 12 (*KIPdr5p*, *CgCdr1p*) resp. 14 (*ScPdr5p*) transmembránových domén. Všetky hydrofóbne TMD sú spojené krátkou hydrofilnou oblasťou⁹. *N*-terminálny koniec všetkých troch ABC proteínov (*KIPdr5p*, *ScPdr5p*, *CgCdr1p*) obsahuje ATP-viažuce motívy Walker A, Walker B a ABC signatúru. *C*-terminálny koniec proteínov obsahuje konzervovanú ABC signatúru a motív Walker A, avšak motív Walker B je degenerovaný (obr. 4). V aminokyselinovej sekvencii *KIPdr5p* sa nachádzajú viaceré *N*-glykozylačné a fosforylačné miesta pre postranlačné modifikácie proteínu. Funkčná podobnosť medzi ABC transportérmi kvasiniek a ľudí je dokumentovaná mnohými experimentálnymi



Obr. 3. Topológia ABC transportného proteínu (a) a MFS transportného proteínu typu (b). Prezaté z Prasad a Kapoor, 2005, cit.²³

Pdr5p	1030	L	L	V	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1044
Pdr15p	1084	L	L	V	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1098
Pdr10p	1045	L	L	V	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1059
Sng2p	1013	L	L	L	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1027
Pdr12p	1003	L	L	L	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1017
Pdr11p	897	L	L	L	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	A	E	911
Ca Cdr1p	1055	L	L	L	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1069
Kl Pdr5p	1021	L	L	L	F	L	D	E	P	T	S	G	L	D	S	Q	1035
Os Pdr5p	1025	I	-	I	F	M	D	E	P	T	S	G	L	D	A	R	1038
Ycf1p	1430	I	L	V	-	L	D	E	A	T	A	A	V	D	V	E	1443
Yor1p	1387	I	L	I	-	L	D	E	A	T	S	S	V	D	Y	E	1400
Ste1p	1210	I	L	I	-	L	D	E	C	T	S	A	L	D	S	V	1223
Ta Mdr1p	1180	I	L	L	-	L	D	E	A	T	S	A	L	D	A	E	1193
Cae1 Mdr1p	1238	I	L	L	-	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	1251
Mm Mdr1p	1194	I	L	L	-	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	1207
Hs Mdr1p	1391	I	L	V	-	L	D	E	A	T	A	A	V	D	L	E	1404

□ Motív WalkerB □ Substitúcia zvyškov aminokyslín

Obr. 4. Porovnávací analýza nukleotid viažúcej domény ABC transportných proteínov. Orámovaná časť predstavuje evolučne konzervovaný WalkerB motív. Hrubo zvýraznené aminokyseliny reprezentujú povolené substitúcie v nukleotid viažúcej oblasti proteínu. Prevzaté z Tutulan-Cunita a spol., 2005, cit.³

mi štúdiami dokazujúcimi, napr. že P-glykoproteín je schopný exprie aj v heterologickom systéme *S. cerevisiae* a udeľuje bunkám kvasiniek rezistenciu voči chemoterapeutikám¹¹.

3.3. Vylučovacie pumpy typu MFS

MFS (major facilitator superfamily) transportné proteíny boli pôvodne definované ako superrodina permeáz, skladajúcich sa z 2 štruktúrnych jednotiek – šiestich transmembránových α -helikálnych segmentov spojených cytoplazmatickou slučkou¹². Aj niektoré MFS transportné proteíny mikroorganizmov (MFS-MDR) slúžia ako efluxné pumpy vylučujúce toxické zlúčeniny von z buniek. Zdrojom energie pre vylučovanie substrátov je v prípade MFS-MDR proteínov elektrochemický gradient protónov na membráne. MFS proteíny obsahujú cca 500–600 aminokyselín, nachádzajú sa v prokaryotických aj v eukaryotických bunkách. Spravidla zabezpečujú uniport, symport alebo antiport rôznych zlúčenín medzi bunkou a jej okolím¹³. Jednoduchý MFS-MDR proteín kvasiniek pozostáva z 10 až 14 transmembránových domén. V genóme kvasinky *S. cerevisiae* sa identifikovalo 28 MFS-MDR transportných proteínov, ktoré boli na základe predpokladanej štruktúry rozdelené do troch odlišných skupín: skupina I obsahuje transportéry s 12 transmembránovými doménami (obr. 3b), zatiaľ čo skupina II a III zahŕňa transportéry obsahujúce 14 transmembránových domén¹⁴.

4. Interakcia substrátu s transportným proteínom

Kľúčovou vlastnosťou transportérov zahrnutých vo fenoméne mnohonásobnej rezistencie je ich schopnosť rozpoznávať veľké množstvo štruktúrne odlišných chemických zlúčenín. Predpokladá sa, že efluxná pumpa, proteín Pdr5p kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje prinajmenšom 3 rôzne väzobné miesta pre substrát, rozpoznávajúce jeho odlišné chemické determinanty⁷. Naviac, všetky hydrofóbne substráty transportného proteínu Pdr5p musia mať požadovanú veľkosť⁷. Zdá sa, že veľkosť molekuly a/alebo vzdialenosť medzi funkčnými skupinami substrátu sú rozhodujúce pre to, aby príslušná zlúčenina mohla byť substrátom Pdr5p.

Niekoľko hypotéz a modelov, ktoré vysvetľujú spôsob väzby substrátov a spôsob ich vylučovania ABC transportnými proteínmi, pochádza zo štúdií bakteriálnych modelových systémov^{15–18}. Polyšpecifitu, najtypickejšiu vlastnosť efluxnej pumpy, v súčasnosti najlepšie vysvetľuje model, podľa ktorého TMD transportéra vytvoria vnútri membrány kanál, ktorým substrát vystupuje z bunky. Vnútri kanálu sa uplatňujú van der Waalsove alebo elektrostatické interakcie medzi translokovaným substrátom a aminokyselinovými zvyškami transportného proteínu. Väzba ATP vyvolá konformačnú zmenu transportného proteínu, čím sa zabezpečí translokácia substrátu. Hydrolyzou ATP sa vracia konformácia proteínu do pôvodného stavu. Amfifilita a hydrofóbnosť transportovanej molekuly nie sú podľa uvedeného modelu pre jej transport rozhodujúce³. Otázkou ostáva, čo spôsobuje tak širokú substrátovú špecifitu transportéra. Štúdie využívajúce fotoafinitné značenie spolu s genetickými analýzami u cicavcov ukázali, že v rozpoznávaní substrátov sa uplatňujú tak NBD, ako aj TMD proteínu. Identifikovalo sa niekoľko kritických aminokyselinových zvyškov v transportnom proteíne, ktoré sú rozhodujúce pre rozpoznanie substrátu¹⁹.

5. Homeostáza sfingolipidov je koregovaná génami MDR

Predpokladá sa, že niektoré ABC transportné proteíny zabezpečujú homeostázu membránových lipidov a zároveň reguláciu permeability membrány svojou účasťou na distribúcii fosfolipidov v membráne²⁰. Efluxné pumpy sa môžu tiež podieľať na odstraňovaní poškodených oxidovaných foriem lipidov z membrány. Sledovaním akumulácie fluorescentne značeného fosfatidyletanolamínu (PE) *in vivo* sa zistilo, že bunky kvasiniek bez Pdr5p mali zvýšené hladiny PE na vonkajšej strane plazmatickej membrány²¹.

6. Záver

Fenómén MDR je najpodrobnejšie preštudovaný u fakultatívne anaeróbných kvasiniek *S. cerevisiae*. U kvasiniek vzniká MDR najčastejšie ako dôsledok mutácií v génoch kódujúcich transkripčné regulátory, ktoré vedú k zvýšenej expresii transportných proteínov typu ABC (ATP binding cassette) alebo MFS (major facilitator superfamily) asociovaných s mnohonásobnou rezistenciou. Proteín Pdr5p je typickým príkladom ABC transportného proteínu schopného viazať a vylučovať veľké množstvo rozličných substrátov. Polyšpecifita transportného proteínu Pdr5p môže byť dôsledkom evolučného vývoja, počas ktorého sa počet zlúčenín, ktoré je schopný transportovať, postupne zvyšoval. Neopatrné modifikácie v štruktúre Pdr5p následkom mutácií viedli k získaniu schopnosti viazať a transportovať ďalšie substráty. Presný molekulárny mechanizmus rozpoznávania tak veľkého súboru substrátov zostáva zatiaľ neobjasnený a je predmetom intenzívneho experimentálneho štúdia.

Práca bola vypracovaná s podporou grantov VEGA 1/0078/08 a VVCE-0064-07.

Použité skratky

ABC	ATP binding cassette – kazeta viažúca ATP
LCB	long chain bases – bázy s dlhým uhlíkovým reťazcom (prekurzory biosyntézy sfingolipidov)
MFS	major facilitator superfamily – superrodina membránových transportných proteínov energizovaných elektrochemickým gradientom protónov na membráne
MDR	multidrug resistance – mnohonásobná rezistencia
NBD	nucleotide binding domain – nukleotid viažúca doména
PDRE	pleiotropic drug resistance element – element promotóra špecifickej sekvencie, ku ktorému sa viažu transkripčné faktory Pdr1p/Pdr3p
TMD	transmembrane domain – transmembránová doména

LITERATÚRA

1. Moye-Rowley W. S.: Prog. Nucleic Acid Res. 73, 251 (2003).
2. Mukhopadhyay K., Prasad T., Saini P., Pucadyil T. J., Chattopadhyay A., Prasad R.: Antimicrob. Agents, Chemother. 48, 1778 (2004).
3. Tutulan-Cunita A. C., Mikoshi M., Mizunuma M., Hirata D., Miyakawa T.: Genes to Cells 10, 409 (2005).
4. Pasrija R., Prasad T., Prasad R.: Biochem. Soc. Trans. 33, 1219 (2005).
5. Hallstrom T. C., Lambert L., Schorling S., Balzi E., Goffeau A., Moye-Rowley W. S.: J. Biol. Chem. 276, 23674 (2001).

6. Kihara A., Igarashi Y.: J. Biol. Chem. 277, 30048 (2002).
7. Golin J., Ambudkar S. V., May L.: Biochim. Biophys. Res. Commun. 356, 1 (2007).
8. Decottignies A., Goffeau A.: Nat. Genet. 15, 137 (1997).
9. Sauna Z. E., Bohn S. S., Rutledge R., Dougherty M. P., Cronin S., May L., Xia D., Ambudkar S. V., Golin J.: J. Biol. Chem. 283, 35010 (2008).
10. Egner R., Rosenthal F. E., Kralli A., Sanglard D., Kuchler K.: Mol. Biol. Cell 9, 523 (1998).
11. Chen X. J., Bauer B. E., Kuchler K., Clark-Walker G. E.: J. Biol. Chem. 275, 14865 (2000).
12. Marger D. M., Saier M. H. Jr.: TIBS 18, 13 (1993).
13. Nellisen B., Wachter R. D., Goffeau A.: FEMS Microbiol. Rev. 21, 113 (1997).
14. Sa-Correia I. S., Tenreiro S.: J. Microbiol. 98, 215 (2002).
15. Borges-Wamsley M. I., Wamsley A. R.: Trends Microbiol. 9, 71 (2001).
16. Higgins C. F., Linton K. J.: Science 293, 1782 (2001).
17. van Veen H. W., Higgins C. F., Koning W. N.: Res. Microbiol. 152, 365 (2001).
18. Davidson A. L.: Science 296, 1038 (2002).
19. Kolaczowski M., van der Rest M., Cybularz-Kolaczowska A., Soumillon J. P., Konings W. N., Goffeau A.: J. Biol. Chem. 271, 31543 (1996).
20. Decottignies A., Grant A. M., Nichols J. W., de Wet H., McIntosh D. B., Goffeau A.: J. Biol. Chem. 273, 12612 (1998).
21. Kean L. S., Grant A. M., Angeletti C., Mahé Y., Kuchler K., Fuller R. S., Nichols J. W.: J. Cell Biol. 138, 255 (1997).
22. Dawson R. J., Locher K. P.: Nature 443, 180 (2006).
23. Prasad R., Kapoor K., v: *Int. Rev. Cytol.* (Kwang W. Jeon, ed.), 242, str. 215. Elsevier, Amsterdam 2005.
24. Panwar S. L., Pasrija R., Prasad R.: Biosci. Rep. 28, 217 (2008).

K. Balková and Y. Gbelská (Department of Microbiology and Virology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic): **Plasma Membrane Proteins Involved in Cell Resistance to Chemotherapeutics**

The expression of drug efflux pumps located in cell membranes, especially in the plasma membrane, is induced by various hydrophobic compounds with overlapping specificity, leading to multidrug resistance (MDR) in the target cell. This fact is a serious obstacle in the treatment of various infections and cancer. MDR is the result of transcriptional upregulation of genes encoding proteins mediating the efflux of cytotoxic compounds from cells. Novel experimental data show that the physiological role of the MDR network is probably coordination of the synthesis of membrane proteins with the production of lipid components of membranes.

PRÍRODNÉ LÁTKY RASTLINNÉHO PÔVODU A ICH VYUŽITIE V TERAPII ONKOLOGICKÝCH OCHORENÍ

PETRA CIBÍKOVÁ, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ
a MICHAL MARUNA

Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
petracibik@yahoo.com

Došlo 27.3.08, prepracované 5.11.08, prijaté 9.11.08.

Kľúčové slová: rastlinné protirakovinové látky, inhibítory tubulínu, topoizomerázy

Obsah

1. Úvod
2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín
 - 2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov
 - 2.1.1. Vinca alkaloidy
 - 2.1.2. Epipodofylotoxíny
 - 2.1.3. Combretastatíny a kolchicín
 - 2.1.4. Kamptotecíny
 - 2.1.5. Taxány
 - 2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách
 - 2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I
 - 2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu
 - 2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulínové inhibítory
 - 2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku
3. Záver

1. Úvod

Malígne nádory predstavujú druhú najčastejšiu príčinu smrti, hneď za srdcovo-cievnyimi ochoreniami. Hlavnou prekážkou v boji proti rakovine je nešpecifický účinok používaných chemoterapeutík. V minulosti bránilo možnosti cielene útočiť voči rakovinovým bunkám neúplné poznanie rozdielov medzi nimi a normálnymi bunkami, keďže sú v mnohých ohľadoch veľmi podobné. Koncom 80. rokov výskum v oblasti molekulovej biológie a genetiky odhalil rozdiely v signálnych dráhach regulujúcich bunkovú proliferáciu a odštartoval systémovú evolúciu boja proti rakovine. V 90. rokoch sa výrazne transformoval prístup k vyvíjaniu protirakovinových liečiv, začala

sa „era cielej terapie“, a hľadania liečiv selektívne účinných na kľúčové proteíny¹. Príroda je atraktívnym zdrojom terapeutických zlúčenín, ktoré sú vhodné pre dnešný molekulovo orientovaný prístup k vývoju liečiv ako aj ich vzájomnému kombinovaniu, nakoľko vyvolávajú menej nepriaznivých vedľajších účinkov a pôsobia ako tonikum. Dnes je viac ako 50 % využívaných liečiv prírodného pôvodu a takmer polovica z 25 svetovo najpredávanejších farmaceutických produktov je odvodená z prírodných látok².

2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín

Rastliny používané pre etnofarmakologické účely sa stali primárnymi zdrojmi pre vyhľadávanie prírodných liečiv v medicíne. Výskum liečiv z rastlín je dnes založený hlavne na izolácii a štúdiu bioaktivity na základe ich pôsobenia. Ďalším krokom je charakterizácia spojená s modifikáciami, úpravami liečiva s cieľom zvýšiť jeho aktivitu a potlačiť toxické vplyvy, zlepšenie farmakologického profilu ako aj syntéza analógov. Modifikácia štruktúry prebieha za pomoci štyroch typov štúdií³:

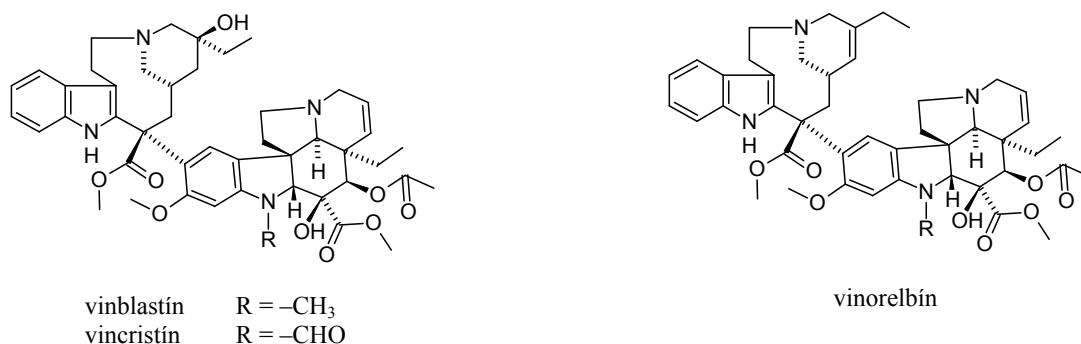
- vzťah štruktúra – aktivita (SAR), zahŕňa kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu,
- mechanizmus účinku, vzťah liek – receptor a špecifické enzýmové inhibície,
- štúdie metabolizmu liečiv vrátane identifikácie bioaktívnych metabolitov a blokovanie metabolickej inaktívácie,
- modelové molekulové štúdie a stanovenie trojrozmerných farmakofórov.

2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov

Pri liečbe rakoviny je v súčasnosti úspešne používaných viacero zlúčenín získaných z rastlín.

2.1.1. Vinca alkaloidy

K jedným z najvýznamnejších protirakovinových liečiv v klinickej praxi patrí skupina vinca alkaloidov, izolovaných z rastlín zimozelene (*Catharanthus roseus*), ktoré rastú v pralesoch Madagaskaru, a *Vinca sp.* vyskytujúcej sa v Európe. Vincristín, jeho chemické analógy vinblastín a vinorelbín patria k mitotickým inhibítorm (obr. 1). Sú schopné naviazať sa na tubulínové diméry, vytvoriť stočené špirálovité agregáty a zabrániť formovaniu mikrotubulínovej štruktúry. To vedie k zastaveniu mitózy v metafáze, čo má vplyv najmä na rapídne sa deliace rakovinové bunky, avšak aj intestinálny epitel a kostnú dreň. Rozsah špiralizujúceho potenciálu u jednotlivých



Obr. 1. Štruktúra najznámejších vinca alkaloidov

derivátov je: vincristín > vinblastín > vinorelbín > vinflunín, čo zodpovedá klinickým dávkam, kde platí vincristín < vinblastín < vinorelbín⁴. Používajú sa hlavne v kombinácii s ostatnými chemoterapeutikami na liečbu leukémie, lymfómov, Kaposiho sarkómu, nemalobunkového karcinómu pľúc a rakoviny prsníka. Zavedenie vinca alkaloidov vincristínu a vinblastínu do klinickej praxe zvýšilo počet vyliečených pacientov Hodgkinsovej choroby a používajú sa aj pri niektorých formách leukémie⁵.

2.1.2. Epipodofylotoxíny

Biologicky aktívna zložka podofylotoxín a jeho známe lignany sa prejavujú veľkou gastrointestinálnou toxicitou a preto iba glykozidy⁶ etoposid a tienofenový analóg tienoposid, ktoré majú zníženú toxicitu, sa klinicky využívajú na liečbu lymfómov, rakoviny dýchacích ciest, testi-

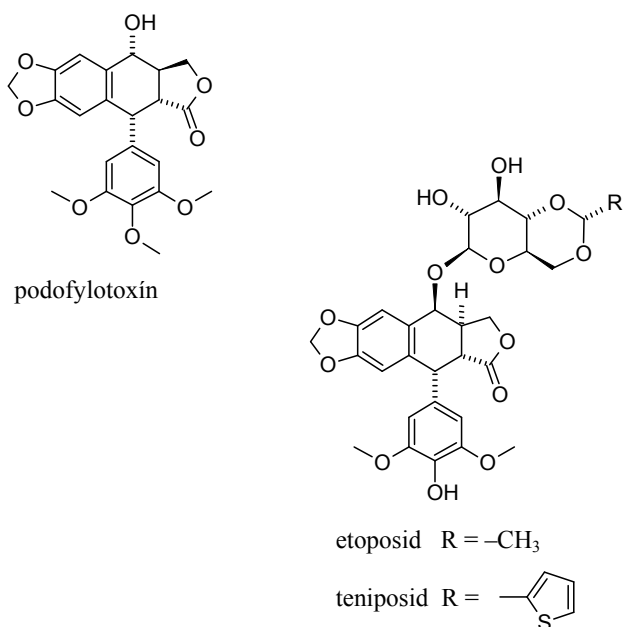
kulárnej rakoviny (obr. 2). Prírodný podofylotoxín je používaný ako prekursor pre chemickú syntézu protirakovinových biologicky aktívnych látok etoposidu a tienoposidu. Etoposid významne zvýšil úspešnosť liečenia testikulárnej rakoviny pri použití s bleomycínom (taktiež odvodený z prírodného produktu) a cisplatinou. Etoposid a prírodný produkt podofylotoxín (PPT), bioaktívny komponent *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodi* a *Podophyllum pleianthum*, sú štruktúrne veľmi podobné s tromi významnými rozdielmi:

- opačná stereochemia na C-4 (β v etoposide a α v PPT),
- rozdielny substituent na C-4 (glykozyľ na etoposide, OH na PPT),
- na C-4' má etoposid OH, na rozdiel od PPT, ktorý má naviazaný OCH₃.

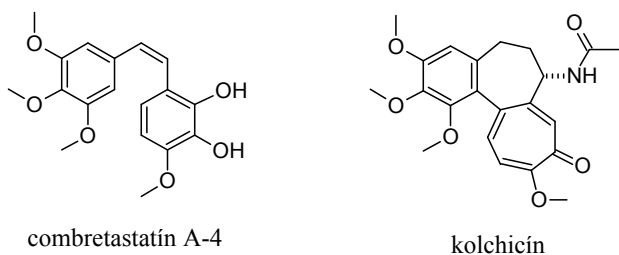
Tieto dve zlúčeniny majú tiež rozdielny mechanizmus účinku. Podofylotoxín sa reverzibilne viaže na tubulín a inhibuje tvorbu mitotického vretienka. Etoposid inhibuje DNA topoizomerázu II a následne stimuluje DNA štiepenie. Biooxidácia etoposidu na *E*-kruhu orto-chinónu spôsobuje kovalentné viazanie na proteíny a hydroxylované radikály tvorené metal-etoposidovými komplexami s následným metal- a fotoindukovaným štiepením DNA³.

2.1.3. Combretastatíny a kolhicín

Combretastatín A-4 (obr. 3) bol prvýkrát izolovaný z juhoafrickej vŕby *Combretum caffrum*⁷. Combretastatíny, deriváty stilbenu s esenciálnym trimetoxymylovaným postranným reťazcom, predstavujú novú skupinu terapeutických vaskulárne cielených zlúčenín. Tieto látky sa využívajú pri ochoreniach a patologických rakovinových stavoch, kde abnormálny rast krvných ciev je nevyhnutný pre progresiu choroby. Účinne pôsobia na mikrotubuly, ktoré formujú cytoskelet endotelových buniek tak, aby sa podporilo prekrvenie nádora. Keď sa tubulínová štruktúra naruší, zmenia svoj tvar z plochého na okrúhle, čím dochádza k zastaveniu prítoku krvi cez kapiláry s následným vyhľadovaním nádora a zničením. Combretastatín A-4 pôsobí primárne na nádory, pretože tam sa formujú nové cievy. Aktín, proteín, ktorý chráni tubulín, je prítomný iba v dospelých bunkách, nie však v nových. Napriek svojmu



Obr. 2. Štruktúra hlavných zástupcov skupiny epipodofylotoxínov



Obr. 3. Predstaviteľ nových vaskulárne cieleňých zlúčenín a kolchicín

protirakovinovému potenciálu má combretastatín postranné účinky v normálnych tkanivách. Tento problém môže byť čiastočne eliminovaný namierením liečiva špecificky na nádorové bunky. Určité adhezívne molekuly bunky ako $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory sú nadmerne exprimované na aktívnom proliferujúcom endotele nádora. Tieto povrchové markery rozlišujú nádorové endotelové bunky od normálnych, a preto sa môžu používať ako cieľ pre protivaskulárne liečivo. Peptidy s aminosekvenciou Arg-Gly-Asp (RGD) viazanou na cyklickom skelete sa viažu na $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory, čo sa využilo pre vytvorenie lipozómu s cyklickými RGD peptidmi ako ligandu pre prenos combretastatínu A-4. Tento nosič zvýšil protinádorovú aktivitu liečiva a potenciálne zlepšil terapeutický benefit v porovnaní s dávkovaním v roztoku alebo bez lipozómu⁷.

Vo vode rozpustný alkaloid kolchicín (obr. 3) bol pôvodne izolovaný z *Colchicum autumnale* (jesenný krokus) a je jedným z najdlhšie používaných liečiv (dnes lieči dnu a mediteránsku horúčku). Jeho potenciálna protirakovinová aktivita voči P388 a L1210 leukémii myši je pripísaná jeho silnému antimitotickému efektu. Kolchicín naviazaním inhibuje polymerizáciu tubulínu a proces mitózy, ktorý je nevyhnutný pre delenie bunky. Avšak nízke hodnoty terapeutického indexu limitujú jeho využitie ako protirakovinového liečiva⁸.

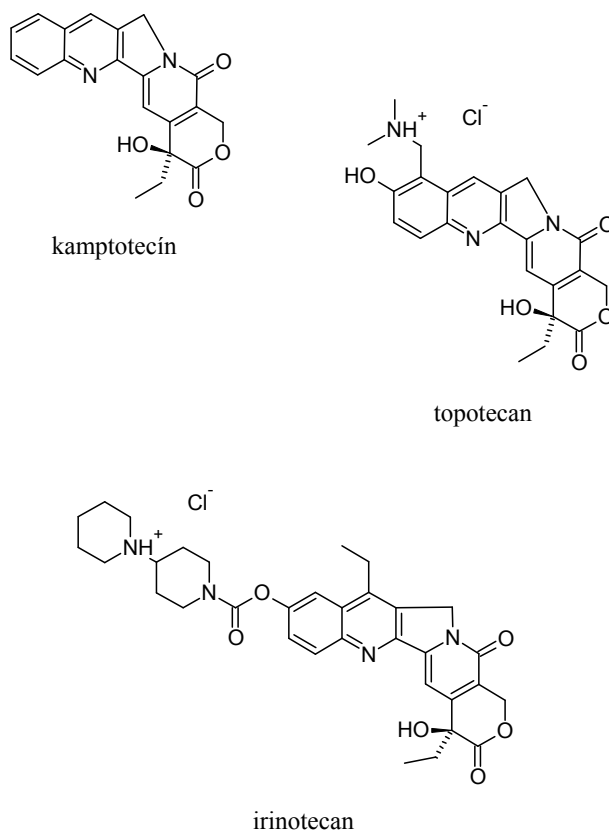
2.1.4. Kamptotecíny

Medzi dôležité protirakovinové lieky patrí skupina klinicky používaných aktívnych zlúčenín odvodených od kamptotecínu, ktorý bol izolovaný na juhu Číny z okrasného stromu *Kamptotheca acuminata* (Decne) (obr. 4). Ako bohatý zdroj tejto zlúčeniny bol objavený aj indický vždyzelený strom *Nothapodytes foetida* (Wight) (predtým *Mappia foetida*)⁹. Kamptotecín patrí do skupiny chinolínových alkaloidov, pozostáva z pentacyclickej štruktúry, ktorá zahŕňa pyrolovú skupinu a jedno asymetrické centrum s α -hydroxy laktónovým kruhom. Je to sekundárny rastlinný metabolit používaný ako protirakovinové liečivo. Ovplyvňuje aktivitu topoizomérázy I, ktorá štiepi, odtáča a znova liguje DNA¹⁰. Po naviazaní kamptotecínu na topoizomérázu I dôjde k štiepeniu, avšak nie ligácii DNA, čo spôsobí jednoduché zlomy DNA vlákna. Kamptotecín bol uvedený do skúšobných klinických testov NCI (National Cancer

Institute, USA) v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia ako inhibítor DNA topoizomérázy I, ale bol stiahnutý pre vysokú toxicitu. Intenzívnym výskumom sa došlo k objaveniu efektívnejších vo vode rozpustných, menej toxických derivátov topotecanu a irinotecanu (obr. 4).

Topotecan sa používa na liečbu rakoviny pľúc ak zlyhá chemoterapia prvej línie a liečbu rakoviny vaječníkov po zlyhaní prvotnej cisplatinovo-taxánovej chemoterapie u ľudí senzitivných a rezistentných na cisplatinu¹¹, alebo následnej chemoterapii, ďalej pri ne-Hodgkinovom lymfóme, myelodysplastickom syndróme, leukémii a vybraných pediatrických typoch rakoviny. Topotecan prechádza bariéry medzi krvným riečišťom a mozgom¹², vykazuje dobré výsledky ako monoterapeutikum u pacientov s metastázami mozgu a je schopný zvyšovať účinok ožarovania.

Irinotecan spolu s inými liekmi v chemoterapii lieči rakovinu kolorekta, kde je považovaný za jedno z najdôležitejších liečiv. Na základe výsledkov fázy III experimentov sa napriek stále vysokej mortalite a toxicite predpokladá významná úloha irinotecanu pri liečbe pacientov s rakovinou gastrointestinálneho traktu¹³.



Obr. 4. Kamptotecíny – liečivá s protirakovinovým účinkom

2.1.5. Taxány

Taxány sú diterpenoidy izolované z rastlinného materiálu, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sa považujú za účinné protinádorové a antileukemické látky. Dnes sa už aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú taxol alebo docetaxel (taxotere) na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov¹⁴. Výskumy naznačujú, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla¹⁵ (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože. Okrem známej chemoterapeutickej aktivity taxánov sú známe aj antiproliferačné, antiangiogénne a protizápalové vlastnosti¹⁶. Taxol sa skúma ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex a reumatoidnej artritíde. Hlavný zástupca tejto skupiny látok taxol (paclitaxel) bol pôvodne izolovaný z kôry pacifického tisu *Taxus brevifolia*, ako súčasť náhodnej zbierky programu pre NCI. Zlá rozpustnosť ($0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$) vyžaduje koinjektáž v nosiči zloženom z Cremophoru EL[®], ktorý spôsobuje hypersenzitívne reakcie a pacienti liečení týmto prípravkom vyžadujú premedikáciu. Na vyriešenie tohto problému sa vytvorili nové systémy nosičov ako emulzie, lipozómy, polymérne mikro/nanočastice (vodorozpustné prodrugs), ktoré však bývajú často fagocytované alebo vylúčené z bunky membránovými transportérmi a tiež nízko toxické polymérne micely s hydrofóbnymi liečivami uzavretými v jadre. Polymérne micely obsahujúce paclitaxel sa hromadia v nádore s vyššou permeabilitou a postupne ho uvoľňujú v závislosti od pH bez straty aktivity¹⁷. Taxol sa používa na liečbu Kaposiho sarkómu, rakoviny prsníkov, pľúc, vaječníkov, kde indukuje apoptózu rakovinových buniek. Skúmaním rakovinových buniek vaječníkov SKOV3 sa zistilo, že účinok taxolu spočíva vo fosforylácii Bcl-2 (B-cell lymfóm-2) a v mitochondriálnej depolymerizácii¹⁸. Taxol stabilizuje mikrotubuly a inhibuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteinové štruktúry, ktoré zastavia bunkový

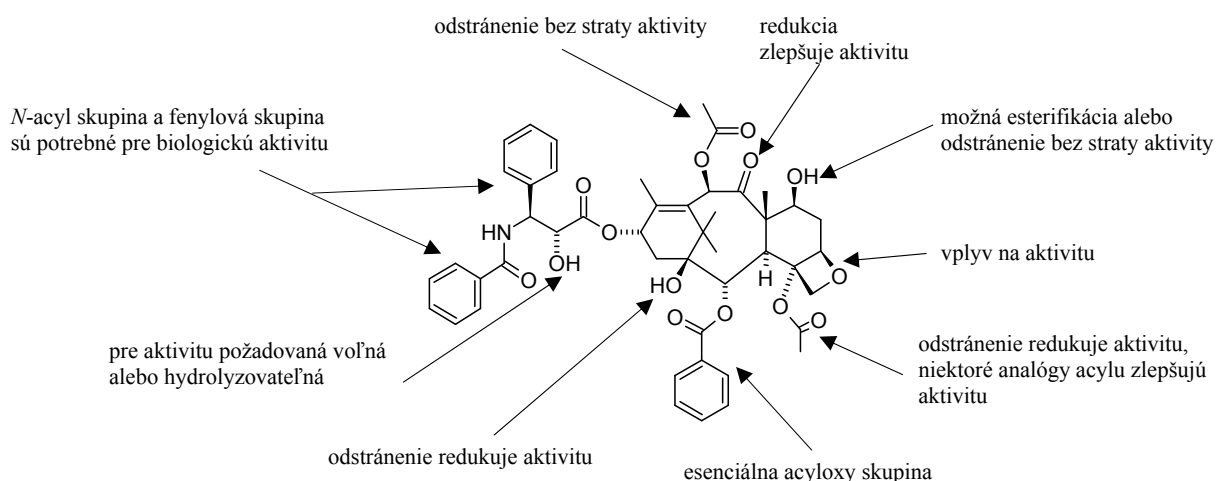
cyklus v G₂/M fáze, a tým i rast nádorových buniek¹⁹. Taxány sú jednými z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom. Paclitaxel má na bunky protimigrujúcu aktivitu. Môže selektívne inhibovať pohybovú aktivitu rakovinových buniek hrubého čreva a tiež buniek rakoviny vaječníkov²⁰.

Keďže paclitaxel zohráva významnú úlohu v boji proti rakovine, intenzívne štúdium vzťahu štruktúra – aktivita (SAR) viedlo k niektorým zovšeobecneniam (obr. 5). Jedno z najdôležitejších poukazuje na tri kľúčové postranné reťazce v južnej hemisfére molekuly: C-13 *N*-benzoyl fenylyzoserín, C-2 benzoát a C-4 acetát. Všetky sú po stránke konštitúcie atómov a molekulovej konformácie kritické pre naviazanie taxánu na tubulín a ich cytotoxicitu. SAR štúdie C-2 pozície poukázali, že stereochemia 2-benzoyl-skupiny v taxole zásadne determinuje jeho aktivitu. Na druhej strane, veľa taxolových analógov s aroylo-alebo alkylovou esterovou skupinou na C-2 pozícii sa vyznačuje ešte vyššou cytotoxicitou²¹. Oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 sú tiež nevyhnutné pre zabezpečenie cytotoxicity.

Docetaxel je semisyntetický člen taxánových zlúčenín, efektívne pôsobí pri liečbe pacientov s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie a v dávkach 100 mg m^{-2} povrchu tela²². Pozitívne sa prejavilo jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, rakoviny hrubého čreva (HCT 116) alebo rakoviny močových ciest²³.

2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách

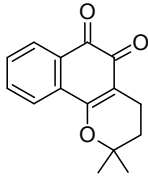
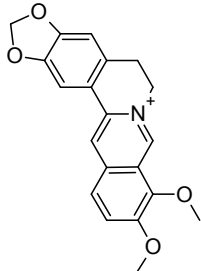
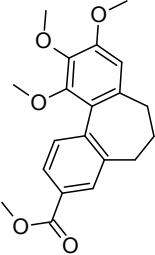
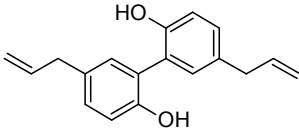
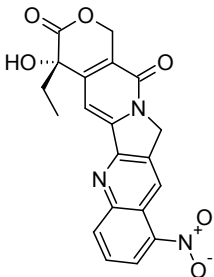
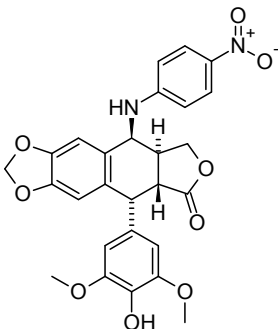
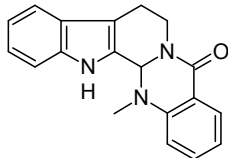
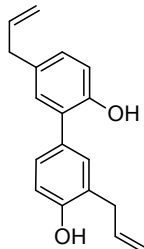
Objavujú sa nové technológie, pomocou ktorých sa zlúčeniny vylúčené z klinických štúdií pre vysokú toxicitu v predchádzajúcich obdobiach dostávajú opäť do záujmu



Obr. 5. Taxol a jeho vzťah medzi štruktúrou a biologickou aktivitou²¹

Tabuľka I

Štruktúry rastlinných protirakovinových derivátov aktuálne v klinických štúdiách

Zlúčeniny izolované z rastlín s inhibičným účinkom na:			
topoizomerázu I	topoizomerázu II	tubulín	iný mechanizmus
			
β -lapachon	berberín	allokolchicin	magnolol
			
rubitecan	GL331	evodiamín	honokiol

vedcov (tab. I). Možnosť technologicky pripojiť rôzne molekuly k vhodným „nosičom“ ich umožňuje priviesť špecificky priamo k nádorom. Takéto efektívne značenie vysoko cytotoxických prírodných látok je výhodné hlavne z hľadiska neškodnosti pre zdravé bunky organizmu, čím sa rieši problém toxicity a problém nízkej rozpustnosti vo vodných roztokoch⁶.

2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I

Základná látka kamptotecín má limitujúcu dostupnosť z prírody a je zle rozpustná vo vode, preto štruktúrne modifikácie smerujú na vytvorenie užitočnejších chemoterapeutík. Prírodné a syntetické deriváty kamptotecínu ako 9-amino- a 10-hydroxykamptotecín patria k potenciálnym protirakovinovým agensom inhibujúcim DNA topoizomerázu I (Topo I). Rubitecan, orálne podávaný kamptotecínový analóg a výrazný inhibítor Topo I, preukázal klinickú aktivitu v gemcitabin-senzitívnych nádoroch, ako sú nádory pankreasu, prsníkov, vaječníkov a gemcitabin-rezistentných druhoch rakoviny. Synergický účinok medzi inhibítormi topoizomerázy I a gemcitabínom (nukleozidový analóg) zistený v preklinickom výskume, ako aj žiad-

ne pokrývajúce sa toxicity, umožnili zavedenie do klinických štúdií pre rakovinu pankreasu a žľezníka, kde bola predbežne pozorovaná výrazná aktivita²⁴. CT-2106 je nový kamptotecínový (CPT) konjugát, inhibítor topoizomerázy I novej generácie, vytvorený na dodanie vyšších, efektívnejších dávok chemoterapeutika do nádorového tkaniva s nižšou toxicitou k normálnym bunkám. Zložený je z kamptotecínu kovalentne naviazaného cez hydroxylovú skupinu k biodegradovateľnému vodorozpustnému poly-L-glutamátglycinovému polyméru, ktorý zabraňuje otvoreniu laktónového kruhu a následnému naviazaniu CPT na albumín. CPT-polymérové spojenie zabezpečuje väčšiu stabilitu CPT v cirkulácii, zvýšenú permeabilitu a zadržanie v nádorových bunkách. CT-2106 demonštroval signifikantnú protinádorovú aktivitu vo viacerých ľudských nádorových líniách a bol počas klinickej štúdie dobre tolerovaný s miernymi vedľajšími účinkami. Bol vo fáze I/II ako samostatné liečivo a plánovali sa kombináčn experimenty²⁵. Ďalším klinicky študovaným rastlinným derivátom s inhibičným účinkom na DNA topoizomerázu I je β -lapachon, 1,2-naftochinón izolovaný z kôry stromu *Tabebuia avellanedae*. Cytotoxický účinok β -

lapachonu súvisí s NAD(P)H-chinón-oxidoreduktázou 1 (NQO1), flavoproteínom nadmerne exprimovaným (až 20×) v bunkách rakoviny vaječníkov, hrubého čreva, pľúc, rakoviny prostaty a prsníkov²⁶. NQO1 indukuje nepatrné zmeny v štruktúre β -lapachonu, zlúčenina cyklizuje medzi jej hydrochinónom, semichinónom a chinónovou formou, uvoľňuje pritom NAD(P)H a vedie k vzniku hydroxylových radikálov poškodzujúcich DNA. Liečba β -lapachonom vedie k NQO1-dependentnému zvýšeniu cytosolového Ca^{2+} , čo má za následok stratu mitochondriálneho membránového potenciálu, vyčerpanie ATP, proteolýzu substrátu, DNA fragmentáciu a apoptózu bunky²⁷. NQO1 je vďaka hlavnej úlohe v β -lapachonom sprostredkovej smrti využitelný cieľ pre liečbu rakovinových buniek, ktoré nadmerne exprimujú tento enzým. Nešpecifická distribúcia a polycyklický charakter, zodpovedný za vysokú hydrofobicitu, prekážajú konvenčnému intravenóznemu použitiu na preklinické a klinické využitie. Možnosť, ako zlepšiť vodorozpustnosť β -lapachonu, je cez jeho naviazanie s hydroxypropyl- β -cyklodextrínom. Rýchla disociácia β -lapachonu a cyklodextrínu robí liečivo prístupné agregácii a rapídne spotrebovaniu. Využitie nanoterapeutického nosiča zaručuje efektívne rozpustenie liečiva a jeho dopravenie do pevného nádora²⁷. Indenoizochinolíny sú novou triedou nekamptotecínových inhibítorov topoizomerázy I, ktorých mechanizmus účinku zahŕňa uväznenie kovalentného komplexu utvoreného medzi DNA a Topo I počas bunkových procesov. Nie všetky deriváty indenoizochinolínu majú rovnaký spôsob účinku ako protirakovinové agens. Napríklad, dihydro-zlúčeniny sú všeobecne slabšími inhibítormi Topo I, avšak majú výraznú cytotoxickú aktivitu na viaceré bunkové línie. Ich kryštálová štruktúra v komplexe s DNA a Topo I indikuje stérické zábrany interkalácie neplanárných dihydroindenoizochinolínov s DNA na zlomovej strane. Je potrebné najskôr metabolizovať dihydro-deriváty *in vivo* pomocou dvojelektrónovej oxidácie, čím sa získajú planárne indenoizochinolíny, ktoré môžu stéricky interkalovať medzi párami DNA báz²⁸. Pred niekoľkými rokmi bola NSC 314622 (1) zlúčenina implikovaná ako inhibítor Topo I a jej cytotoxický profil bol obdobný ako u známych inhibítorov Topo I, kamptotecínu, irinotecanu a topotecanu. Použitie NSC 314622 (1) ako protirakovinového liečiva je limitované jeho miernym cytotoxickým účinkom a inhibičným účinkom voči Topo I, syntetizujú sa ďalšie indenoizochinolíny s vyššou cytotoxicitou voči rakovinovým bunkám a inhibíciou Topo I.

2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu

Berberín, prírodný izochinolínový alkaloid izolovaný z koreňov a kôry medicínsky dôležitých rastlín ako sú *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, a *Tinospora cordifolia*, bol od nepamäti používaný ako potenciálne liečivo v indiánskej a čínskej medicíne. Berberín sa vyznačuje protizápalovou aktivitou a má protinádorový účinok *in vitro*. Inhibuje aktivačný proteín 1, kľúčový transkripčný faktor zápalov a karcinogenézy v ľudských

nádorových bunkách a účinne inhibuje transkripčnú aktivitu cyklooxygenázy-2 v bunkách rakoviny hrubého čreva u ľudí. Berberín inhibuje DNA topoizomerázu II (Topo II) a proliferáciu buniek rakoviny prostaty v závislosti od koncentrácie ($10\text{--}100\ \mu\text{mol l}^{-1}$) a času podávania (24 až 72 h). Inhibícia proliferácie súvisí s blokovaním G1-fázy bunkového cyklu, čo je spôsobené inhibíciou exprese cyklínov D1, D2, E a cyklín-dependentných kináz. Berberín výrazne zvyšuje apoptózu rakovinových buniek prostaty (DU145 a LNCaP) narušením membránového potenciálu mitochondrií a aktiváciou kaspázy-9, kaspázy-3 a poly(ADP-riboza) polymerázy²⁹. Derivát GL331 s *p*-nitroanilínovou skupinou na 4 β -pozícii etoposidu sa javí byť výborným kandidátom na liečenie rakoviny. Inhibítor Topo II GL331 spôsobuje štiepenie dvojvláknovej DNA a zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze. Indukuje apoptózu bunky inhibíciou proteín-tyrozinázovej aktivity, stimuláciou proteín-tyrozinofosfatázovej aktivity a formovaním apoptickej DNA. GL331-indukované DNA zlomy nadmerne spúšťajú poly(ADP-riboza) polymerázu (PARP) a spôsobujú rozsiahlu poly(ADP-ribozyl)áciu nukleových proteínov. GL331, napriek podobnej štruktúre a biochemickým vlastnostiam ako etoposid, je účinný na rakovinové bunky rezistentné na liečbu etoposidom³⁰. Zjavná je účinnosť voči štyrom typom nádorov, nemalobunkovému a malobunkovému pľúcnemu karcinómu, nádoru hlavy a krku, aj karcinómu hrubého čreva s minimálnymi vedľajšími účinkami. Izosteviol (kyselina *ent*-16-ketobeyeran-19-ová) je produkt hydrolýzy steviosidu, prírodného sladidla produkovaného v listoch *Stevia rebaudiana* (Bertoni), pripravený mikrobiálnymi transformáciami a chemickou konverziou. Je potenciálnym inhibítorom polymeráz cicavcov a ľudskej DNA topoizomerázy II. Izosteviol inhibíciou buniek MOLT-4 (ľudská akútna lymfocytová leukémia) *in vitro* potláča rast BALL-1 ľudských buniek akútnej lymfoblastickej leukémie, línie žľúdočných nádorových buniek a TPA (12-tetradekanoylforbol-13-acetátom)-indukovaných zápalov. Inhibícia rastu buniek je závislá od inhibície enzýmov, najmä replikačnej polymerázy α . Keďže izosteviol blokuje taktiež bunky v S fáze, predpokladá sa, že sa distribuuje do jadra³¹. Ellipticin, karbazolový alkaloid, bol identifikovaný v roku 1959 ako obsahová látka listov austrálskeho stromu *Ochrosia elliptica* (Labil) a môžeme ho získať aj z *Bleekeria vitensis*. Vyznačuje sa protinádorovou a antineoplastickou aktivitou, ktoré môžu súvisieť s vyvolaním stresu v endoplazmatickom retikule³². Za jeho hlavný mechanizmus účinku je považovaná DNA interkalácia a inhibičné pôsobenie na topoizomerázu II (cit.³³). Najnovšie štúdie poukazujú na schopnosť ellipticinu tvoriť DNA adukty sprostredkované cytochrómom P450 (cit.³⁴). Cytotoxická aktivita ellipticinu tiež súvisí s nádorovým supresorom p35. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin selektívne inhibujú fosforyláciu proteínu p35 pomocou inhibície kináz u rakoviny pľúc a ľudskej bunkovej línie SW480 rakoviny hrubého čreva. Navyše, akumulácia defosforylovaného mutantného inhibítora kaspáz p35 môže indukovať apoptózu. Ellipticin a jeho deriváty sú schopné zastaviť mitochon-

driálnu oxidatívnu fosforyláciu a narušiť energetickú rovnováhu buniek³². Avšak, slabá rozpustnosť vo vode ako aj jeho systémová toxicita bránia zavedeniu elliptínu medzi terapeutické liečivá. Jeho semisyntetický derivát elliptínium sa v súčasnosti v Európe používa na liečenie pokročilého štádia rakoviny prsníkov.

2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulinové inhibitory

Allokolchicín je prírodný štruktúrny izomér kolchicínu nachádzajúci sa v *Colchicum cornigerum* a *Colchicum autumnale*. Najaktívnejšie allokolchicinoidy (allo-ke-ton a 7S allo-alkohol) boli hodnotené ako cytotoxické látky voči ľudským rakovinovým bunkám. Oboje zlúčeniny boli 2,5 až 4× účinnejšie ako kolchicín voči viacerým líniam nádorových buniek³. Evodiamín je hlavná bioaktívna látka izolovaná a purifikovaná z tradičnej čínskej rastliny *Evodiae fructus*. Vyznačuje sa protizápalovými, antiobezitnými, antinociceptívnymi vlastnosťami ako aj inhibičným účinkom na proliferáciu nádorových buniek a bunkovú migráciu spojenú s inváziou a metastázovaním pľúc. Silnejšie inhibuje migráciu nádorových buniek než ich proliferáciu, pri 10 µg ml⁻¹ spôsobuje 70% supresiu migrácie a iba 30% inhibíciu proliferácie³⁴. Efekt inhibície migrácie spočíva pravdepodobne v potlačení aktivity Ca²⁺ kanálov, ktorých funkcia je nevyhnutná pre bunkovú migráciu. Evodiamín má inhibičnú aktivitu voči ľudským multiradik-rezistentným NCI/ADR-RES bunkám nádorov prsníkov. Pomocou imunocytochemických a *in vivo* tubulin-polymerizačných analýz sa zistilo, že evodiamín zvyšuje polymerizáciu mikrotubúl a formáciu mikrotubulového vretienka v NCI/ADR-RES bunkách³⁵. Táto zlúčenina spôsobuje značnú apoptózu pri množstve 1 mM a po 12 h pôsobenia vyvoláva zastavenie v G2/M fáze bunkového cyklu. Evodiamín reprezentuje sľubné liečivo na liečbu ľudských multiradik rezistentých rakovinových buniek.

2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku

Protirakovinový účinok neolignánov magnololu a honokiolu, izolovaných z rastlín čelade *Magnoliaceae* bol testovaný na rôznych rakovinových bunkových líniah, napr. proti A bunkám 459 (ľudská rakovina pľúc), SK-MEL-2 (ľudský melanóm), SK-OV-3 (rakovina vaječníkov), XF-498 (CNS bunky), HCT-15 (rakovina hrubého čreva) a Hep-G2 bunkám (rakovina pečene), lymfoidnej leukémii, rakovine kože, pľúc, hrubého čreva³⁶. Honokiol indukuje apoptózu inhibíciou Akt a MAPK fosforylácie (proteín kináza B, mitogén aktivovaná proteín kináza). Pri použití magnololu sa v priebehu apoptózy zvýšila intracelulárna koncentrácia vápnika, prebehla translokácia cytochrómu c z mitochondrií do cytozolu, aktivácia kaspázy 3, kaspázy 8 a kaspázy 9 a znížila sa regulácia bcl-2 proteínu³⁷. Rovnaký mechanizmus priebehu apoptózy bol pozorovaný aj v bunkovej línii chronickej lymfocytovej leukémie v prítomnosti honokiolu. Z tohto poznatku vyplýva možnosť odskúšania klinickej aplikácie honokiolu samostatne alebo v kombinácii s inými terapeutikami,

pretože bunková chronická lymfocytová leukémia je jedným z neliečiteľných rakovinových ochorení. Honokiol v závislosti od času a koncentrácie indukuje apoptózu buniek RKO kolorektálneho nádora. U pokusných myší s inkubovaným nádorom, honokiol potlačal rast nádora a predlžoval životnosť myší. Podávanie honokiolu indukovalo apoptózu cez aktiváciu kaspázovej kaskády p53 independentným mechanizmom. Honokiol vykazuje nízku toxicitu voči zdravým bunkám a vysokú protirakovinovú aktivitu *in vitro* a *in vivo*, preto je potenciálnym chemoterapeutickým liečivom aj pri liečbe rakoviny ľudského konečníka³⁸. Magnolol a honokiol sa preukázali aj ako potenciálne vhodné terapeutiká pri akútnej myeloidnej leukémii. V tomto prípade je do mechanizmu účinku neolignánov zapojená MEK/Map kinázová (mitogén aktivovaná kináza, mitogén aktivovaný proteín) signálna dráha. Magnolol navyše inhibuje nádor nekrotizujúci faktor α indukovaný aktiváciou NF- κ B v ľudských endotelových bunkách. Ishitsuka a spol.³⁹ dokázali, že v bunkovej línii izolovanej z ľudského myelómu honokiol aktivuje apoptózu prostredníctvom kaspáz, no zároveň aj mechanizmom nezávislým na kaspázach. Okrem toho honokiol inhibuje novotvorbu ciev v mikroprostredí kostnej drene. Do regulácie angiogenézy, metastázovania a celkového prežívania bunky je zapojený aj jadrový faktor NF- κ B. Honokiol je schopný potláčať aktiváciu NF- κ B a expresiu génov regulovaných NF- κ B inhibíciou I κ B-kinázy. V nádorových tkanivách sa výrazne zvyšuje enzýmová aktivita matrixovej metaloproteinázy-9 (MMP-9). Magnolol a honokiol sú inhibítormi MMP-9, ktorá sčasti zodpovedá za invazívny charakter rakovinového ochorenia. MMP-9 degraduje kolagén typu IV, dôležitý komponent základnej štruktúry bunkovej membrány. Seo a spol.⁴⁰ pozorovali vysokú (90%) inhibičnú aktivitu voči MMP-9 v butanolových frakciách *Magnolia obovata* a *Magnolia officinalis* var. *biloba* pri koncentrácii 100 µg ml⁻¹. Xu a spol.⁴¹ dokázali, že honokiol znižuje expresiu P-glykoproteínu v bunkových líniah MCF-7/ADR rezistentných na adriamycín ľudskej rakoviny prsníka. Aplikáciou honokiolu sa obnovuje akumulácia podávaného chemoterapeutika ako aj senzitivita na adriamycín.

Konjugáciou dvoch protinádorových liečiv s rôznym mechanizmom účinku môžeme dosiahnuť zlepšenie potenciálu oboch zlúčenín. Boli opísané unikátne protinádorové aktivity konjugátov taxol (TXL)-kamptotecín (CPT), TXL-epipodofylotoxín (EP), CPT-EP, TXL-kolchicín (COL). Potvrdila sa cytotoxická aktivita voči replikácii viacerých línii ľudských nádorových buniek, ľudskému karcinómu vaječníkov, pľúc, rakovine prsníkov, ľudskému karcinómu prostaty a iným. Hoci viaceré konjugáty nevýkázali vyššiu aktivitu ako taxol samotný, TXL-CPT konjugát sa vyznačoval jedinečným mechanizmom pôsobenia na línii nádorových buniek prostaty a menším účinkom na normálne bunky, než TXL samotný¹⁴. Ingenol-3-*O*-angelat (PEP005), analóg polyhydroxyditerpenoidu ingenolu z *Euphorbia peplus* je potenciálne chemoterapeutické liečivo rakoviny kože. Aktiváciou viacerých proteín-kinázových C izoforiem signálnych enzýmov sa indukuje

apoptóza niektorých rakovinových buniek vrátane myeloidnej leukémie, melanómu a bazálneho bunkového karcinómu⁴². Protopanaxadiol je derivát triterpénového aglykónu viacerých saponínov z *Panax ginseng* a vyznačuje sa apoptickým účinkom na nádorové bunky pôsobením na ich signálne dráhy. Je opísaný cytotoxický účinok protopanaxadiolu voči nádorom vykazujúcim mnohopočetnú liekovú rezistenciu⁴². Hlavný diterpenoid izolovaný z *Andrographis paniculata*, andrographolid, má cytotoxickú aktivitu voči ľudskému karcinómu epidermu a bunkám lymfocytovej leukémie, inhibuje proliferáciu rakovinových buniek. Môže slúžiť ako východisková štruktúra na syntézu nových, netoxických protirakovinových alebo imunomodulačných molekúl⁴³. Phenoxodiol je syntetický analóg známeho izoflavónu sóje (*Glycin max*) genisteinu (4',7-dihydroxyizoflavón), ktorý bol využitý na terapiu rakoviny krčka maternice, vaječníkov, prostaty, vaginálnej rakoviny. Indukuje apoptózu cez inhibíciu anti-apoptických proteínov. Bunky rakoviny vaječníkov, rezistentné voči konvenčnej chemoterapii, po použití phenoxodiolu podstúpia apoptózu. Tento efekt je dependentný na aktivácii systému kaspáz, na inhibičnom účinku XIAP, inhibítora apoptózy, narušení FLICE expresie inhibičného proteínu (FLIP) cez Akt signálnu transdukčnú dráhu, čo sú kľúčové faktory regulácie prežitia rakovinej bunky⁴⁴. Homoharringtonin, cefalotaxusový alkaloid z rastliny *Cephalotaxus harringtonia* rastúcej v Číne je inhibítor syntézy proteínov a bunkového cyklu. Je aktívny voči hematologickým zhubným nádorom⁴². Flavopiridol reprezentuje prvý inhibítor cyklín-dependentnej kinázy (CDK), ktorý je v poslednom štádiu klinických skúšok. Je to semisyntetický flavón derivovaný z rastlinného alkaloidu rohitukínu izolovaného z listov *Amoora rohituka* a z *Dysoxylum binectariferum* (Maliaceae). Bol identifikovaný ako potenciálne protirakovinové liečivo, keďže priamo inhibuje CDK 1, 2 a 4 ako kompetitívny ATP antagonist. Rápidne indukuje programovanú smrť buniek a inhibuje angiogénu. Mechanizmus účinku flavopiridolu zahŕňa interferenciu s fosforyláciou CDK, bránenie ich aktivácii a blokovanie bunkového cyklu v G1 alebo G2 fáze. Klinické testovanie preukázalo, že sa môže bezpečne použiť u ľudí pri liečbe ne-Hodgkinovho lymfómu, karcinómu prostaty, hrubého čreva a žalúdka, nemalobunkovej rakoviny pľúc a chronickej leukocytovej leukémii. Nakoľko sa *in vitro* prejavil synergický účinok s niektorými konvenčnými cytotoxickými liečivami, kombinácie s paclitaxelom a cisplatinou boli v roku 2000 v prvej fáze klinických pokusov⁴⁵.

3. Záver

Prirodzeným dôsledkom narastajúceho výskytu nádorových, srdcovo-cievnych ochorení, ale aj počtu multi-rezistentných mikroorganizmov je nevyhnutnou potrebou ľudskej medicíny disponovať novými a účinnejšími terapeutikami. Prehľad popisuje mnoho dôležitých biologicky aktívnych liečiv pochádzajúcich z rastlinných zdro-

jov, nakoľko skúsenosti s používaním rastlín ako terapeutických nástrojov z histórie pomohli zaviesť jednoduché chemické entity aj do modernej medicíny.

Táto práca je podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR na základe zmluvy č. APVV-20-014105.

LITERATÚRA

- Chabner B. A., Roberts T. G.: Nat. Rev. Cancer 5, 65 (2005).
- Srivastava V., Negi A. S., Kumar J. K., Gupta M. M., Khanuja S. P. S.: Bioorg. Med. Chem. 13, 5892 (2005).
- Lee K. H.: J. Biomed. Sci. 6, 236 (1999).
- Lobert S., Ingram J. W., Correia J. J.: Biophys. Chem. 126, 50 (2007).
- Brody J., Advani S.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 58, 257 (2006).
- Cragg G. M., Newman D. J.: J. Ethnopharmacol. 100, 72 (2005).
- Nallamothu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A.: AAPS Pharm. Sci. Tech. 7, E1 (2006).
- Muzaffar A., Brossi A., Lin C. M., Hamel E.: J. Med. Chem. 33, 567 (1990).
- Ravishankar R. V.: Plant 38, 347 (2002).
- Capranico G., Ferri F., Fogli M. V., Russo A., Lotito L., Baranello L.: Biochimie 89, 482 (2007).
- Colombo N., Gore M.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 64, 129 (2007).
- Zamboni W. C., Luftner D. I., Egorin M. J.: Ann. Oncol. 12, 119 (2001).
- Rivera F., Vega-Villegas M. E., López-Brea M. F.: Cancer Treatment Rev. 33, 315 (2007).
- Nakagawa-Goto K., Nakamura S., Bastow K. F., Nyarko A., Peng C. Y., Lee F. Y., Leec F. C., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 2894 (2007).
- Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
- Ehrlich A., Booher S., Becerra Y., Borris D. L., Figg W. D., Turner M. L., Blauvelt A.: J. Am. Acad. Dermatol. 50, 533 (2004).
- Xie Z., Guan H., Chen H., Lu C., Chen L., Hu X., Shi Q., Jing X.: J. Controlled Release 117, 210 (2007).
- Ahn H. J., Kim Y. S., Kim J. U., Han S. M., Shin J. W., Yang H. O.: J. Cell Biochem. 91, 1043 (2004).
- Bhat N., Perera P. Y., Carboni J. M., Blanco J., Gollenblock D. T., Mayadas T. N., Vogel S. N.: J. Immunol. 162, 7335 (1999).
- Broker L. E., Huisman C., Span S. W., Rodriguez J. A., Krutz F. A., Giaccone G.: Cancer Res. 64, 27 (2004).
- Wang L., Alcaraz A. A., Matesanz R., Yang C. G., Barasoain I., Díaz J. F., Li Y. Z., Snyder J. P., Fanga W. S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 3191 (2007).

22. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: *Drugs* 59, 621 (2000).
23. Bajorin D. F.: *Oncology* 14, 43 (2000).
24. Calvo E., Rowinsky E. K., Tolcher A. W., Chu Q. S., Beeram M., Forero L., Mettinger K. L., Eastham E., Goetz A. D., Patnaik A.: *J. Clin. Oncol.* 22, 2099 (2004).
25. Springett G. M., Takimoto C., McNamara M., Doroshow J. H., Syed S., Eastham E., Spriggs D., Pezzulli S., Michelson G., Dupont J.: *J. Clin. Oncol.* 22, 3127 (2004).
26. Planchon S. M., Pink J. J., Tagliarino C., Bornmann W. G., Varnes M. E., Boothman D. A.: *Exp. Cell Res.* 267, 95 (2001).
27. Blanco E., Bey E. A., Dong Y., Weinberg B. D., Sutton D. M., Boothman D. A., Gao J.: *J. Controlled Release* 122, 365 (2007).
28. Morrell A., Jayaraman M., Nagarajan M., Fox B. M., Meckley M. R., Ioanoviciu A., Pommier Y., Antony S., Hollingshead M., Cushman M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4395 (2006).
29. Mantena S. K., Sharma S. D., Katiyar S. K.: *Mol. Cancer Ther.* 5, 296 (2006).
30. Chang H., Shyu K. G., Lee C. C., Tsai S. C., Wang B. W., Lee Y. H., Lin S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 95 (2003).
31. Mizushima Y., Akihisac T. T., Ukiyac M., Hamasakic Y., Murakami-Nakaia C., Kuriyama I., Takeuchi T., Sugawarad F., Yoshidaa H.: *Life Sci.* 77, 2127 (2005).
32. Stiborova M., Rupertova M., Schmeiser H., Frei E.: *Biomed. Pap.* 150, 13 (2006).
33. Moody D. L., Dyba M., Kosakowska-Cholody T., Tarasova N. I., Michejda C. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2380 (2007).
34. Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004).
35. Ogasawara M., Matsubara T., Suzuki H.: *Biol. Pharm. Bull.* 24, 720 (2001).
36. Liao C. H., Pan S. L., Guh J. H., Chang Y. L., Pai H. C., Lin C. H., Teng C. M.: *Carcinogenesis* 26, 968 (2005).
37. Lin S. Y., Liu J. D., Chang H. C., Yeh S. D., Lin C. H., Lee W. S.: *J. Cell Biochem.* 84, 532 (2002).
38. Kong Z. L., Tzeng S. C., Liu Y. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 63 (2005).
39. Wang T., Chen F., Chen Z., Wu Y. F., Xu X. L., Zheng S., Hu X.: *World J. Gastroenterol.* 10, 2205 (2004).
40. Ishitsuka K., Hideshima T., Hamasaki M., Raje N., Kumar S., Hideshima H., Shiraishi N., Yasui H., Roccaro A. M., Richardson P., Podar K., Le Gouill S., Chauhan D., Tamura K., Arbisser J., Anderson K. C.: *Blood* 106, 1794 (2005).
41. Seo U. K., Lee Y. J., Kim J. K., Cha B. Y., Kim D. W., Nam K. S., Kim C. H.: *J. Ethnopharmacol.* 97, 101 (2005).
42. Xu D., Lu Q., Hu X.: *Cancer Lett.* 243, 274 (2006).
43. Chin Y. W., Balunas M. J., Chai H. B., Kinghorn A. D.: *AAPS J.* 8, 239 (2006).
44. Kumar R. G., Sridevi K., Kumar V., Nanduri S., Rajagopal S.: *J. Ethnopharmacol.* 92, 291 (2004).
45. Kamsteeg M., Rutherford T., Sapi E., Hanczaruk B., Shahabi S., Flick M., Brown D., Mor G.: *Oncogene* 22, 2611 (2003).
46. Mans D. R. A., Da Rocha A. B., Schwartzmann G.: *Oncologist* 5, 185 (2000).

P. Cibíková, M. Šturdíková, and M. Maruna
(Department of Biochemical Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic): **Natural Compounds of Plant Origin and Their Application in Therapy of Oncological Diseases**

As a consequence of increasing occurrence of malign and cardiovascular diseases, but also of multiresistant microorganisms, it is necessary to dispose of new and more effective therapeutics, which are easier to biosynthesize, isolate and modify. At present natural compounds attract increasing attention fuelled by the well-documented limits and adverse effects of current chemical drugs as well as by the ongoing search for better methods of fighting the diseases. The review summarizes the important bioactive plant compounds currently used as anticancer agents and their mode of action. The cytotoxic plant drugs can be categorized into five main classes: vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, combretastatins, camptothecins and diterpenoid taxanes. Some new secondary metabolites isolated from plants and derivatives of the known antitumour drugs currently undergo clinical tests.

ZVÝŠENÍ BIODOSTUPNOSTI TĚŽCE ROZPUSTNÝCH LÉČIVÝCH LÁTEK JEJICH MODIFIKACÍ

LADISLAVA OKÁČOVÁ^a, DAVID VETCHÝ^a,
ALEŠ FRANC^a, MILOSLAVA RABIŠKOVÁ^a
a BOHUMIL KRATOCHVÍL^b

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1 – 3, 612 42 Brno, ^b Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
okacoval@vfu.cz, vetchy@email.cz

Došlo 4.8.09, přijato 16.11.09.

Klíčová slova: těžce rozpustná léčiva, zvýšení rozpustnosti léčiva, zvýšení biodostupnosti, rozpustné deriváty, směsné krystaly, proléčiva, polymorfismus, řízená krystalizace, lyofilizace, sprejové sušení, mikronizace

Obsah

1. Úvod
2. Metody úpravy léčivé látky
 - 2.1. Chemické úpravy
 - 2.1.1. Soli
 - 2.1.2. Hydráty
 - 2.1.3. Glykosylované deriváty
 - 2.1.4. Kokrystaly
 - 2.1.5. Proléčiva
 - 2.2. Fyzikální úpravy
 - 2.2.1. Krystalický polymorf nebo amorf
 - 2.2.2. Řízená krystalizace
 - 2.2.2.1. Sonokrystalizace
 - 2.2.2.2. Krystalizace ze superkritických médií
 - 2.2.3. Lyofilizace
 - 2.2.4. Sprejové sušení
 - 2.2.5. Mikronizace léčivé látky
 - 2.2.5.1. Mikronizace v suchém stavu
 - 2.2.5.2. Kryogenní mletí (kryomletí)
 - 2.2.5.3. Mikronizace v mokřém stavu
3. Závěr

1. Úvod

V současné době se stále častěji vyvíjejí léčivé látky (léčiva), které jsou ve vodném prostředí prakticky nerozpustné. To představuje problém při formulaci lékové formy, která musí zaručit jejich přijatelnou biologickou do-

Tabulka I
Klasifikace rozpustnosti léčiv

Klasifikace	Objem rozpouštědla v ml na rozpuštění 1 g látky
Velmi snadno rozpustné	< 1
Snadno rozpustné	1–10
Dobře rozpustné	10–30
Mírně rozpustné	30–100
Těžce rozpustné	100–1000
Velmi těžce rozpustné	1000–10000
Prakticky nerozpustné	> 10000

stupnost. Uvedená problematika se stává často ještě závažnější v souvislosti se zvýšenou spotřebou léků v terapii civilizačních onemocnění, při nichž se rovněž často uplatňují těžce rozpustné léčivé látky. Jde zejména o cytostatika, antibiotika a imunosupresiva, antidiabetika, některá venofarmaka a antidepresiva vyšších generací. Existuje statistika, podle níž je nejméně 40 % současných léčiv tvořeno těžce rozpustnými substancemi¹.

Z hlediska fyzikálně-chemického lze léčivé látky, na základě jejich rozpustnosti, rozdělit dle lékopisu² (tab. I). Z farmakologického hlediska je však toto členění použitelné jen omezeně, neboť nezohledňuje terapeutickou dávku. Některé látky lze k vyvolání terapeutického efektu podat jen v nízkém množství (některé hormony), zatímco u jiných je větší dávka nezbytná (některá antibiotika). Pak se může stát, že malé množství těžce rozpustné látky se v trávicím traktu (GIT) zcela rozpustí a vyvolá potřebnou odezvu, zatímco vyšší množství, i když relativně rozpustnější látky, již nikoliv. Proto rozpustnost samotná ještě není dostatečným měřítkem klasifikace biodostupnosti léčiv. V polovině devadesátých let proto Amidon³ navrhl biofarmaceutický klasifikační systém (BCS), který rozděluje léčiva podle jejich rozpustnosti a střevní propustnosti (permeability) do čtyř tříd (tab. II).

Léčivo je považováno za vysoce rozpustné, pokud se jeho nejvyšší léčebná dávka rozpustí ve 250 ml vodného

Tabulka II
Bioklasifikační systém léčiv

Třída	Rozpustnost	Permeabilita
1	vysoká	vysoká
2	vysoká	nízká
3	nízká	vysoká
4	nízká	nízká

pufru (pH 1–7,5) a vysoce vstřebatelné je tehdy, pokud se vstřebá nejméně z 90 % (cit.⁴). Uvedená kritéria prošla následně ještě řadou úprav regulačními institucemi⁵. Pro empirické posouzení vstřebatelnosti léčivé látky navrhl Lipinsky „pravidlo tří pětěk“. Léčivá látka, jejíž molekulová hmotnost je větší než 500, dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu v systému oktan-1-ol/voda je větší než 5 a molekula má 5 a více vodíkových donorů, bývá zpravidla těžce vstřebatelná⁶. Zejména u léčiv skupiny 4 je pak pro dosažení vhodné biologické dostupnosti potřebné jejich rozpustnost zvýšit.

To se ovšem netýká jen nových léčiv. Ovlivnění biodostupnosti již dříve používaných léčivých látek může vést k prohloubení, či dokonce změně farmakodynamických vlastností. Za posledních deset let jsou publikovány výzkumy lékových forem se zvýšenou biodostupností u betamethasonu⁷, griseofulvinu, megestrolu acetátu⁸, karbamazepinu⁹ a mnoha dalších.

U těžce rozpustných léčiv se v současné době nevyužívá jen metod solubilizace. Podrobnějším zkoumáním transportních mechanismů v tenkém střevě bylo zjištěno, že je možné využít transportu léčiv v pevné fázi, např. přes lymfatickou tkáň buněk střevní sliznice. Látky zde podléhají fagocytóze, filtraci a difuzi v závislosti na distribuci velikosti jejich částic. Uvedený mechanismus není ovšem univerzální a neuplatňuje se u všech léčiv. Tabulka III uvádí vztah mezi velikostí částic vstřebávaného léčiva a mechanismem jeho transportu¹⁰.

Rovněž při vývoji generik je často nutné zvýšit dostupnost léčivé látky tak, aby byla srovnatelná s originálním přípravkem. Jelikož postupy přípravy originálního přípravku bývají patentově chráněny, musí firma při vývoji generika nalézt alternativní postup, který je nezávadnější. U generika je třeba dosáhnout podobné koncentrace v krvi ve stejném čase, jako má přípravek originální¹¹.

Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustné léčivé látky, při zachování její biologicky aktivní struktury, lze docílit mnoha způsoby, ať už chemicky, fyzikálně nebo biologicky. Z hlediska přehlednější orientace se mohou tyto procesy rozdělit na úpravu léčivé látky nebo na úpravu lékové formy speciálními technologickými procesy. I když v praxi dochází k jejich kombinacím, tento článek je, z důvodů přiměřeného rozsahu, věnován pouze léčivým látkám.

Tabulka III
Transportní mechanismy léčivé látky buňkami tenkého střeva

Mechanismus	Velikost částic
Persorpce	5–150 μm
Fagocytosa střevními makrofágy	1 mm
Transcelulární transport Peyerovými plaky	do 10 μm
Endocytosa střevními buňkami (endocyty)	do 0,2 μm

Plánovaný následující článek bude zaměřen na léčivé přípravky. Níže uvedený výčet není zdaleka vyčerpávající. Snažili jsme se zdokumentovat jen podstatné metody, které se v současnosti uplatňují ve farmaceutických technologiích.

2. Metody úpravy léčivé látky

2.1. Chemické úpravy

Mezi chemické úpravy léčivé látky patří příprava její soli, hydrátu (výjimečně ethanol solvátu), glykosylovaného derivátu, kokryystalu nebo proléčiva.

2.1.1. Soli

Asi polovina současného sortimentu léčivých přípravků na trhu je formulována ze solí. Soli jsou iontové sloučeniny, proto se lépe rozpouštějí v polárních rozpouštědlech (především ve vodě) než neiontové látky. Základním předpokladem tvorby soli je ovšem přítomnost ionizovatelných skupin v molekule. Asi 75 % používaných solí obsahuje léčivou látku ve formě kationtu – protonované báze, např. antiulcerózum ranitidin hydrochlorid (Zantac[®]), a asi 25 % ve formě aniontu – deprotonované kyseliny, např. hypolipidemikum – trihydrát vápenaté soli atorvastatinu (Sortis[®])¹². Kromě převedení těžce rozpustného léčiva na rozpustnější sůl se s výhodou využívá převedení na jiné rozpustnější deriváty, jako jsou například fosfáty. Příkladem je převedení antivirotika acykloviru do formy jeho monofosforečnanového esteru¹³.

2.1.2. Hydráty

Volba hydrátu, jako léčivé látky, je limitována možností jeho dehydratace. Nicméně v některých případech převažuje větší rozpustnost stechiometrického hydrátu nad bezvodou solí, a když látka běžně krystaluje jako hydrát, zvolí se pro formulaci léčivého přípravku. Příkladem může být antibiotikum azithromycin dihydrát (Zithromax[®]).

2.1.3. Glykosylované deriváty

Navázáním biologicky odštěpitelné cukerné složky na molekulu obtížně rozpustné léčivé látky se získá oproti původní látce rozpustnější sloučenina, která rovněž lépe prochází membránou tenkého střeva. Příkladem využití jsou glykosylované deriváty silymarinu – flavolignanů izolovaných ze semen ostropestřce mariánského. Silymarin (směs silybinu, silydioninu a silykristinu) působí jako zhášec volných radikálů a antioxidant v membránových lipidech. Jeho nevýhodou je malá rozpustnost ve vodě a následná nízká biodostupnost. Glykosylované deriváty silybinu mají i vyšší afinitu k cílové tkáni – hepatocytům¹⁴.

2.1.4. Kokrystaly

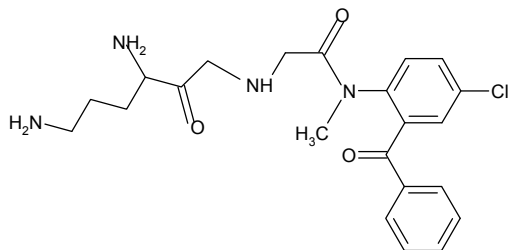
Výrazné rozšíření portfolia pevných forem určité látky představují její kokrystaly (molekulární komplexy). V kokryystalu si léčivá látka zachovává svoji chemickou

identitu, ale změni svoje vlastnosti v pevné fázi (rozpustnost, rychlost rozpouštění). I když jsou kokrystaly zatím předmětem výzkumu především akademických pracovišť, předpokládá se jejich širší aplikace ve farmaceutickém průmyslu. Nadějným příkladem je kokrystal antiepileptika karbamazepinu se sacharinem v poměru 1:1 (cit.¹⁵). Ve srovnání s krystalickou bezvodou formou karbamazepinu (např. v přípravku Tegretol[®]) jsou jeho kokrystaly se sacharinem chemicky stabilnější, neprojevují polymorfii a nemají sklon tvořit hydráty a solváty. Výzkumy perorální biodostupnosti na psech ukázaly, že formulace kokrystalů může být praktickou alternativou k Tegretolu[®]. Stejně jako kokrystaly, tak i hydráty a soli mohou být polymorfni, což dále zvyšuje také variabilitu jejich rozpouštěcích profilů.

2.1.5. Proléčiva

Proléčiva jsou látky, které jsou bez předchozí biotransformace v organismu na terapeuticky aktivní metabolity neúčinné nebo jen málo účinné. Navázáním těžce rozpustné léčivé látky na jinou vhodnou látku nebo polymer lze docílit její vyšší rozpustnosti a lepší biodostupnosti.

Příkladem je antidotum organofosfátů avizafon (obr. 1). Jde o ve vodě rozpustné proléčivo diazepamu ve formě jeho [(methylkarbamoyl)methyl]hexanamidu. Z této vazby je diazepam enzymaticky uvolněn až v krevním řečišti a dosahuje tak vyšších hladin v plasmě ve srovnání s volným diazepamem¹⁶.



Obr. 1. Proléčivo diazepam avizafon

Mezi vhodné polymery pro vazbu s léčivými látkami, vedoucí k jejich zvýšené rozpustnosti, patří hydrofilní biodegradabilní polymery, nejčastěji poly(ethylenglykol), poly(vinylpyrrolidon), poly(vinylacetát), (2-hydroxypropyl)methylcelulosa apod. Uvedené polymery se snadno v organismu metabolizují a nemají vlastní farmakologický efekt. Mohou navíc chemicky stabilizovat léčivou látku. Příkladem je prakticky nerozpustné cytostatikum taxol ve formě konjugátu s kyselinou poly(L-mléčnou)¹⁷.

2.2. Fyzikální úpravy

2.2.1. Krystalický polymorf nebo amorf

Rozpustnost, resp. rychlost rozpouštění léčivé látky lze modifikovat i volbou její fyzikální formy. Pokud léčivá látka vykazuje polymorfii¹⁸ (schopnost látky krystalovat ve více krystalových strukturách), potom se její polymorfy budou lišit svými vlastnostmi a tím i rozpouštěcím profi-

Tabulka IV

Přehled nejčastějších krystalizačních rozpouštědel

Rozpouštědlo	
<i>N,N</i> -dimethylformamid (DMF)	dichlormethan (DCM)
dimethylsulfoxid (DMSO)	chloroform
dioxan	methanol
<i>p</i> -xylen	aceton
benzen	isopropanol
tetrahydrofuran (THF)	cyklohexan
acetonitril	ethylacetát
kyselina octová	ethanol
tetrachlormethan (TCM)	diethyleter
toluen	hexan

lem. Poměr rozpustností polymorfů se běžně pohybuje kolem 2, výjimkou je např. chemoterapeutikum premafloxacin, kde poměr rozpustností polymorfů I a III činí 23,1 (cit.¹⁹).

Rozpustnost je dále ovlivněna krystalickým nebo amorfním stavem léčivé látky. Obecně platí, že amorfny jsou lépe rozpustné než krystalické formy. Např. amorfni novobiocin je asi desetkrát rozpustnější než jeho krystalická forma. Amorfy jsou však nestabilní, proto musí být v léčivém přípravku stabilizovány. Příkladem je želatinou stabilizovaný amorfni antiastmatikum pranlukast, který vykazuje lepší biologickou dostupnost na laboratorních zvířatech²⁰. K získání žádaného polymorfu zpravidla slouží vhodné rozpouštědlo při finální krystalizaci léčivé látky²¹. Je však třeba počítat s tím, že použitá rozpouštědla většinou tvoří v substancích rezidua, proto existuje mezinárodní směrnice, která stanovuje jejich přípustnost a koncentraci²². Přehled dvaceti neběžnějších rozpouštědel uvádí tab. IV (cit.²³).

2.2.2. Řízená krystalizace

Volbou krystalizační metody a jejich podmínek lze ovlivnit parametry výsledného produktu, což souvisí s jeho rozpustností. Řízenou krystalizací se optimalizuje tvar krystalů (design), velikost a distribuce krystalů. Ke krystalizaci se používají různá rozpouštědla a jejich směsi²⁴. Rozpouštědla se volí podle polarit, dipólového momentu, viskozity, povrchového napětí, bodu varu, hustoty aj. Důležitými parametry krystalizace jsou teplota, tlak, rozpouštědlo (ale i obsah vody ve zvoleném rozpouštědle), přesycení roztoku, tvar krystalizátoru, aj. Tvar krystalů lze ovlivnit i vhodnými přísadami (aditivy), které se přednostně adsorbují na některé krystalové plochy a tím zpomalují jejich nárůst. Plocha krystalu je totiž tvořena rozdílně orientovanými molekulami a přísada se specificky váže na plochy podle této orientace. Mezi aditiva patří ionty, organické kyseliny, polymery nebo proteiny. Samostatnou zmínku si zaslouží zejména sonokrystalizace, superkritická extrakce a sprejové sušení.

2.2.2.1. Sonokrystalizace

Ultrazvuk se již delší čas využívá k ovlivnění vlastností a tvaru vznikajících krystalů u řady léčiv²⁵. Vedle výše zmíněných fyzikálně-chemických faktorů se při sonokrystalizaci využívá ultrazvuku o frekvenci 20–100 kHz (cit.²⁶) a některé práce popisují frekvence až 5 MHz (cit.²⁷). Produktem sonokrystalizace je např. antiastmatikum salbutamol sulfát, který se používá ve formě aerodisperze k inhalační aplikaci. Vyšší frekvence ultrazvuku a nižší teplota krystalizace vedla ke vzniku pravidelnějšího tvaru vzniklých mikrokystalů, které se vedle amorfů jeví jako stabilnější a vhodné k inhalačnímu podání²⁸.

2.2.2.2. Krystalizace ze superkritických médií

Techniky řízené krystalizace využívají i možnosti krystalizace léčivých látek z některých médií za superkritických podmínek (oxid uhličitý, příp. dusík). Například antipyretikum paracetamol je ve své mikrokystalické formě možné získat tím, že se jeho roztok v acetonu, dimethylformamidu nebo methanolu nastříkuje do superkritického oxidu uhličitého. V závislosti na podmínkách se tak získají jehlicovité až sférické krystaly, jejichž průměr dosahuje velikosti pod 1 μm (cit.²⁹). Jindy se používá kombinace s dalšími pomocnými látkami. Například mikrokristaly lokálního antibiotika griseofulvinu se získaly „superkritickou krystalizací“ ze směsi s polyanhydridem kyseliny dekandiové. Adsorbované částice polyanhydridu pak zabránily dalšímu růstu krystalů³⁰.

2.2.3. Lyofilizace

Proces mrazové sublimace (lyofilizace) spočívá v tom, že zmrazený roztok (obvykle vodný), případně suspenze, uvolňuje za sníženého tlaku rozpouštědlo z pevného skupenství do skupenství plynného. Léčivá látka přitom zůstává v pevném skupenství a je takto mrazově vysušena (produktem může být krystalická nebo amorfni fáze). V praxi to zjednodušeně znamená, že rozpouštědlo nebo jiné disperzní medium se odpařuje ze zmrazeného vzorku ve vakuu a namrazuje se na kondenzační spirálu. Zbylá pevná část si zachovává speciální pórovitou strukturu, která je tvořena kanálky vzniklými po odpařeném rozpouštědle. Tato struktura po styku s vodou umožňuje rychlý průnik do struktury lyofilizátu, jeho energeticky málo náročné rozrušení a následné rozpouštění, či alespoň zrychlené rozpouštění.

Tato technologie je ale velmi zdlouhavá, energeticky náročná a využívá se proto zejména k výrobě suchých injekcí. Nicméně existují i příklady, kdy se lyofilizace použila k řízené krystalizaci, případně k tvorbě amorfů u těžce rozpustných léčiv, které byly dále zpracovány do pevné lékové formy. Výhodou je, že lze takto zpracovat málo stabilní léčiva, aniž se vlivem mechanického namáhání, či chemických inkompatibilit rozkládají.

Antioxidant a stabilizátor biologických membrán, flavonoid rutin patří mezi těžce rozpustné léčivé látky. Jeho rozpouštění a tím i biodostupnost byla zvýšena přípravou jeho nanosuspenze, která se podrobila lyofilizaci. Suspenze, kde obsah rutinu tvořil 10 %, byla připravena

vysokotlakou homogenizací. Distribuce částic činila 99 % do 2,3 μm a po procesu lyofilizace zůstala prakticky nezměněna. Lyofilizované nanokrystaly byly velmi snadno redispergovatelné vodou. V porovnání s rutinem, který neprošel touto úpravou, se rychlost rozpouštění lyofilizovaných nanokrystalů v umělé žaludeční a umělé střevní šťávě během prvních 15 min zvýšila o 30 % (cit.³¹).

2.2.4. Sprejové sušení

Sprejové sušení je metodou, která ovlivňuje více fyzikálních parametrů. Dá se použít k získání specifického polymorfu nebo amorfů a zároveň lze docílit vhodné velikosti a tvaru krystalů, resp. formujících se částic. Léčivá látka se rozpustí, či suspenduje ve vhodné kapalině nebo směsi kapalin, s možnou přísadou aditiv. Roztok nebo suspenze látky se pak obvykle za zvýšené teploty nastříkuje do expanzní nádoby a suší v proudu vzduchu nebo inertního plynu. U látek náchylných k oxidaci se nejčastěji používá plynný dusík. Po odpaření kapaliny se získá pevná krystalická nebo amorfni látka. Celý proces probíhá v tzv. sprejových sušárnách. Parametry procesu jsou koncentrace rozpouštědla, či suspendované látky, průměr otvoru trysky, rychlost nástřiku, teplota sušení apod., a jejich modifikací je možné regulovat fyzikální vlastnosti vznikajících krystalů, resp. jejich aglomerátů. Výsledné částice jsou obvykle sférické, porézní, s dobrými tokovými vlastnostmi a ve styku s kapalinou se dobře smáčí a rychle rozpouští. Procesem sprejového sušení je tak možné zvýšit jak rychlost rozpouštění, tak celkovou rozpustnost dané sloučeniny. Velikost částic lze tímto postupem redukovat do 5 μm, výjimečně i méně.

Příkladem aplikace sprejového sušení je hypolipidemikum fenofibrát, který byl ve vodné suspenzi spolu s laktosou a laurylsíranem sodným v poměru 1 : 1 : 0,1 pomlet v perlovém mlýnu. Výsledná mikrosuspenze byla sprejově usušena, přičemž krystalický fenofibrát konvertoval na amorf. Distribuce částic směsi byla z 90 % menší než 3,5 μm. Sprejově vysušená směs s obsahem nanočástic fenofibrátu měla mnohem rychlejší rozpouštění v umělé střevní a žaludeční šťávě v porovnání s komerčně dostupnými fenofibrátovými tabletami Lipanthyl[®], Secalip[®] a Lipidil[®] (cit.³²).

2.2.5. Mikronizace léčivé látky

Stejně jako řízenou krystalizaci lze i mechanickou mikronizaci ovlivnit velikost krystalů a tím i jejich rozpustnost. Jde navíc o nejdostupnější a historicky nejpoužívanější prostředek ke zvýšení biologické dostupnosti léčivé látky. U těžce rozpustných látek je cílem získat co možná nejmenší krystaly s vysokým specifickým povrchem, které umožní rychlejší rozpouštění a v biologickém systému se docílí nejen rychlejších, ale i vyšších plasmatických hladin léčiva v krvi. V současné době je u těžce rozpustných léčiv zřejmá snaha dosáhnout velikosti částic do 10 μm, u nichž se již uplatňují aktivní transportní mechanismy, případně nanometrových částic prostupujících střevními endocyty.

2.2.5.1. Mikronizace v suchém stavu

Mikronizace léčivé látky v pevném stavu je stále nejpožívanější metodou úpravy velikosti částic. Tak se dosahuje obvykle částic s rozměry v desítkách μm . Klasickou metodou mikronizace je mletí v pevném stavu. Přitom se využívají méně účinné kladivové, oscilační a kulové mlýny (částice v desítkách μm)³³ nebo účinnější mlýny tryskové (částice $10^0 - 10^{-1} \mu\text{m}$)³⁴.

Mletí v suchém stavu má jednu podstatnou nevýhodu. Během mletí získávají mikronizované částice elektrostatický náboj vedoucí k tvorbě aglomerátů, které ve styku s kapalinou zabraňují průniku rozpouštědla k jednotlivým částicím. Rychlost rozpouštění tak klesá. Sama mikronizace účinné látky bez dalšího zpracování bývá obvykle nedostatečná.

Mikronizaci v suchém stavu, případně semletím s dobře rozpustnou pomocnou látkou, lze upravit řadu těžce rozpustných substancí. Příkladem takového postupu vedoucího ke zlepšení rozpouštěcího profilu léčivé látky může být mikronizace fenofibrátu nebo jeho semletí spolu s laktosou³⁵.

2.2.5.2. Kryogenní mletí (kryomletí)

Pokud má materiál nevýhodné vlastnosti, jako nízkou teplotu tání, vysokou elasticitu nebo naopak tvrdost apod., lze jej podchladiť ve zkapalněných plynech, jako je oxid uhličitý, dusík, vodík nebo freony. Pak se hovoří o kryogenním mletí (kryomletí). Tato metoda se používá rovněž k získání jemně mletých rostlinných materiálů, živočišných tkání nebo mikrokrytalů běžných léčiv. Zmrazené látky jsou vysoce křehké a snadno se při mletí drtí na mikročástice. Existují ovšem i speciálně upravené mlýny, pracující na stejných principech přímo v těchto zkapalněných médiích.

Příkladem produktu kryogenního mletí je antiflogistikum indometacin, ze kterého se získal amorf pomletím pěti polymorfů³⁶.

2.2.5.3. Mikronizace v mokřém stavu

V některých případech, kde není možné použít suché mletí, se stále více uplatňuje mokřé mletí. Pro tuto metodu se využívají klasické kulové, koloidní nebo lépe moderní perlové mlýny. U perlových mlýnů je suspenze léčivé látky protlačena rotující kolonou kuliček o rozměrech zpravidla pod 1 mm. Tak se dá běžně získat suspenze účinné látky s distribucí částic od stovek nm do 1 μm (cit.³⁷). Jako disperzní prostředí lze použít vodu, obvykle s přísadou tenzidu nutného k převedení nesmáčivých látek do suspenze, nebo vhodného oleje. Mletá léčivá látka se buď vysuší a použije k dalšímu zpracování nebo se léková forma vytvoří z mikronizované suspenze.

Příkladem může být antiandrogenní steroidní analog finasterid používaný k léčbě alopecie a benigní hyperplazie prostaty. Prakticky nerozpustné a nesmáčivé krystalky se nejprve za pomoci tenzidu sulfosukcinátu sodného převedou do suspenze a poté melou v perlovém mlýnu. Vzniklá suspenze tvořená částicemi menšími než 17 μm se poté fluidně nanáší na hydrofilní polysacharidový nosič, který se dále zpracuje do tablet³⁸.

3. Závěr

Při formulaci lékové formy se používají organické léčivé látky, které jsou často špatně rozpustné a tudíž i obtížně vstřebatelné. Uvedený stručný přehled obsahuje hlavní způsoby úpravy těžce rozpustných léčivých látek vedoucí ke zvýšení jejich perorální biodostupnosti. Úpravy účinné látky mohou být chemické nebo fyzikální. Jestliže se jedná o látky ve formě kyselin nebo zásad, je možné z chemických úprav využít jejich převedení na rozpustnější soli. Pokud to charakter látek dovolí, lze vytvářet rozpustnější hydráty, směsné krystaly, případně proléčiva. Z fyzikálních úprav se nejčastěji používá převedení na amorf nebo rozpustnější polymorf. Tvar a velikost krystalů lze ovlivnit řízenou krystalizací, například sonokrystalizací nebo krystalizací ze superkritických médií. Mezi další metody vedoucí ke zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek patří speciální technologie: lyofilizace nebo sprejové sušení, které produkují snadněji dispergovatelné formy. V neposlední řadě se užívá i metod mikronizace, ať už v suchém stavu, ve zmrazeném stavu nebo v suspenzi (v mokřém stavu).

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR č. 6046137302.

LITERATURA

1. Lobenberg R., Amidon G. L.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 3 (2000).
2. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2005. Grada, Praha 2005.
3. Amidon G. L., Lennernäs H., Shah V. P., Crison J. R.: Pharm. Res. 12, 413 (1995).
4. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm128219.htm>, staženo 10. 9. 2009.
5. http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_DMP_RGS_98.5.pdf, staženo 10. 9. 2009.
6. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J.: Adv. Drug Delivery Rev. 23, 3 (1997).
7. Dalziel S. M., Foggín G. W., Ford W. N., Meren H. J. C. (Du Pont): US2005258288 (A61K9/14).
8. Shekunov B. Y., Chattopadhyay P., Seitzinger J., Huff R.: Pharm. Res. 23, 196 (2006).
9. Hu J., Brown J., Young T., Johnston K. P., Williams R. O.: Pharm. Res. 19, 1278 (2002).
10. O'Hagan D. T.: J. Anat. 139, 477 (1996).
11. www.tga.gov.au/DOCS/pdf/euguide/ewp/140198entga.pdf, staženo 10. 9. 2009.
12. Stahl P. H., Wermuth C. G. (ed.): Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
13. Schaeffer H. J. (Burroughs Wellcome Co): US 4287188 (C07F9/00).
14. Křen V., Kubisch J., Sedmera P., Halada P., Přikrylová V., Jedorov A., Cvak L., Gebhardt R., Ulrichová J., Šimánek V.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 17, 2467 (1997).

15. Vishweshwar P., McMahon J. A., Bis J. A., Zaworotko M. J.: *J. Pharm. Sci.* 95, 499 (2006).
16. Abbara C., Rousseau J. M., Turcant A., Lallement G., Comets E., Bardot I., Clair P., Diquet B.: *Br. J. Pharmacol.* 157, 1390 (2009).
17. Chun L., Sidney W.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 886 (2008).
18. Kratochvíl B., Hušák M., Jegorov A.: *Chem. Listy* 96, 330 (2002).
19. Pudipeddi M., Serajuddin A. T. M.: *J. Pharm. Sci.* 94, 929 (2005).
20. Chono S., Takeda E., Seki T., Morimoto K.: *Int. J. Pharm.* 347, 71 (2008).
21. Hilfiker R., De Paul S. M., Szelagiewicz M. (ed.), v knize: *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, str. 290. Wiley-VCH, Weinheim 2006.
22. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA423.pdf>, staženo 18. 8. 2009.
23. Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 101, 3 (2007).
24. Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I., Cvak L., Jegorov A., Böhm S.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 479 (2002).
25. Mason T. J.: *Crit. Rev. Appl. Chem.* 1990, 28.
26. Banga S., Chawla G., Bansal A. K.: *Businessbriefing: Pharmagenetics 2004*, 70.
27. Jan A. B., Avinash B. R. (Lipton Division of Conopco Inc): US 2002031577 (A23D7/00).
28. Dhumal R. S., Biradar S. V., Paradkarand A. R., York P.: *Int. J. Pharm.* 368, 129 (2009).
29. Kröber H., Teipel U.: *Eng. Life Sci.* 3, 137 (2003).
30. Jarmer D. J., Lengsfeld C. S., Anseth K. S., Randolph T. W.: *J. Pharm. Sci.* 94, 2688 (2005).
31. Mauludin R., Müller H. R., Keck C. M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 502 (2009).
32. Vogt M., Kunathb K., Dressmana J. B.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 283 (2008).
33. Swarbrick J., Boylan J. C. (ed.), v knize: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, str. 70. Marcel Dekker Inc., New York 1997.
34. Lieberman H. A., Lachman L., Schwartz J. B. (ed.), v knize: *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, str. 188. Marcel Dekker Inc., New York 1989.
35. Vogt M., Kunath K., Dressman J. B.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 283 (2008).
36. Crowley K. J., Zografi G.: *J. Pharm. Sci.* 91, 492 (2002).
37. <http://nsti.org/Nanotech2008/showabstract.html?absno=292>, staženo 10. 9. 2009.
38. Franc A., Zaludek B., Gonec R., Matejkova B., Petrovicova A. (Pliva Lachema a. s.): WO 2005051344 (A61K9/20).

L. Okáčová^a, D. Vetchý^a, A. Franc^a, M. Rabišková^a, and B. Kratochvíl^b (^a*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*, ^b*Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Increasing Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs by Their Modification**

About 40 % of newly developed pharmaceutical compounds are poorly soluble in water. The fact is a challenge to formulation of drug forms with acceptable bioavailability. This is also the reason why more than a half of currently authorized drugs contain salts or other water-soluble derivatives. Preparation of crystals of a drug – adjuvant complex appears to be a promising way of improving drug solubility. Lyophilization and preparation of a more soluble prodrug or a polymorph also afford an opportunity of increasing drug bioavailability. Although micronization (reducing particle size) is the most common method used in pharmaceutical industry, controlled crystallization (sonocrystallization, crystallization in supercritical media and spray drying) is a good alternative. The review presents the most important methods of modification of poorly water-soluble drugs for increasing their solubility and bioavailability, summarizes the main advantages and drawbacks of the methods and gives examples of relevant technological processes.

NÁZVOSLOVÍ LÉČIV SE ZŘETELEM NA LÉKOPISNÉ NÁZVY

JOZEF KOLÁŘ^a, TÜNDE AMBRUS^a
a VLADIMÍR ŠPRINGER^b

^a Ústav aplikované farmacie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ^b Exnárova 23, 821 03 Bratislava
kolarj@vfu.cz

Došlo 14.9.09, přijato 19.11.09.

Klíčová slova: léčivo, léčivá látka, lék, názvy léčiv, lékopis

Obsah

1. Úvod
2. Základní farmaceutické pojmy – léčivo, léčivá látka, lék
3. Názvy léčiv a léčivých přípravků
 - 3.1. Triviální názvy
 - 3.2. Kódová označení, kódové názvy
 - 3.3. Generické názvy
 - 3.4. Národní a mezinárodní nechráněné názvy (INN)
 - 3.5. Systematické názvy, chemické názvy
 - 3.6. Lékopisné názvy
 - 3.6.1. Lékopisy
 - 3.6.2. Lékopisné názvosloví
 - 3.7. Obchodní názvy, výrobní názvy
4. Závěr

1. Úvod

Názvy léčiv mají různý původ, nejednotný je názor na obsahové vymezení těchto pojmů. Ne vždy je shodný názor odborné veřejnosti také na typologii názvů léčiv. Jako příklad lze uvést nesouladnou definiční charakteristiku či výklad základních farmaceutických pojmů – léčivo, léčivá látka, léčivý přípravek, lék – v legislativě České republiky (případně Slovenské republiky).

2. Základní farmaceutické pojmy – léčivo, léčivá látka, lék

Definice těchto základních pojmů byly do vydání zákona o léčivech¹ uvedeny v druhém až čtvrtém vydání Československého lékopisu (ČSL)^{2–4}. V podmínkách České republiky definuje v současnosti platná právní norma, zákon o léčivech, pojmy léčivý přípravek a látka, paradoxně není definován pojem léčivo, obsažený v názvu právní-

ho předpisu⁵. Léčivý přípravek je látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy. Jako látka se rozumí látka bez ohledu na její původ, který může být lidský, živočišný, rostlinný nebo chemický. Za látky se zejména považují léčivé látky a pomocné látky. Léčivá látka je součástí léčivého přípravku a způsobuje jeho léčivý účinek. Tento účinek je zpravidla farmakologický, imunologický nebo spočívá v ovlivnění metabolismu.

Aktuálně platná legislativa v SR⁶ definuje pouze termíny lék a léčivo, není zde naopak zmíněn pojem léčivá látka a léčivý přípravek. Zmíněné pojmy jsou zde definovány jak v zákoně o léčích, tak na rozdíl od ČR také v lékopise. Zákon o léčích tyto pojmy vymezuje následovně. Lék je léčivo anebo směs léčiv a pomocných látek upravených technologickým procesem do lékové formy a určených k ochraně před chorobami, k diagnostice chorob, léčení chorob nebo k ovlivňování fyziologických funkcí. Léčivo je chemicky jednotná nebo nejjednotná látka syntetického nebo biologického původu, která je nositelem biologického účinku využitelného k ochraně před chorobami, k diagnostikování chorob, léčení chorob nebo k ovlivňování fyziologických funkcí. Vymezení těchto pojmů také uvádí v modifikované podobě Slovenský lékopis⁷. Léčivo je libovolná složka léku, která poskytuje farmakologický účinek nebo jiný přímý účinek při diagnóze, léčbě nebo prevenci choroby; farmakologickým působením zasahuje do struktury anebo funkce lidského a zvířecího organismu. Lék může obsahovat více než jedno léčivo. Jako ekvivalentní názvy léčiva uvádí tato definice pojmy účinná látka a léčivá látka. Lék je produkt získaný z léčiv a farmaceutických pomocných látek určitým technologickým postupem, všeobecně přizpůsobený k tomu, aby se v něm obsažené léčivo mohlo aplikovat a uplatnit tak biologický účinek, jehož je nositelem. Lék má lékovou formu.

Z uvedených definic vyplývá, že pojmy léčivo a léčivá látka, podobně pojmy léčivý přípravek a lék lze považovat za ekvivalentní. Pro potřeby této práce budeme tedy pod pojmem léčivo chápat látku, která je nositelem biologického účinku.

Slovo lék nemělo při svém vzniku dnešní význam léku, tj. léčivého přípravku, který po ordinaci (vyšetření a stanovení postupu léčení lékařem) a dispenciaci (výdeji a poskytnutí náležitých odborných informací lékárníkem) má všechny dispozice k léčení, a který po aplikaci a po interakci s organismem léčí. Pojmenování léčivo je mladší pojem, patrně poprvé se objevuje až v roce 1844. Vzniklo

z potřeby souhrnně označit farmaceutické suroviny známé pod latinským *medicamenta simplicia* (nebo jen *simplicia*)^{8,9}.

Slovní spojení „léčivé látky“ se v naší odborné terminologii poprvé objevilo v roce 1970 v ČSL 3 (cit.³) a to tak, že nahrazovalo náplň termínu léčivo uvedeného v ČSL 2 (cit.²) ve významu výchozí farmaceutické suroviny. Toto spojení není vhodné pro označování chemických léčiv¹⁰. Diskuse k těmto pojmům byla širší – viz např. práce Ruska, Chalabaly, Špringera^{11–13}.

3. Názvy léčiv a léčivých přípravků

Pokud jde o názvy léčiv, je každé léčivo na jejich základě identifikovatelné. Všechny názvy, které se vztahují k určitému léčivu, se označují jako synonyma. V typologii názvů léčiv se uvádějí kategorie názvů uvedené dále, tabulka I obsahuje pro ilustraci několik příkladů.

3.1. Triviální názvy

Triviální název je jednoduchý, všeobecně akceptovaný, specifický pro určitou chemickou sloučeninu. Obvykle se váže k objevu léčiva, jeho přípravě, původu, nebo charakteristickým vlastnostem léčiva. Názvoslovná pravidla označují tyto názvy jako triviální, které definují: Triviální název je název, v němž žádná část nemá systémový význam¹⁴. Jako příklad můžeme uvést názvy: hroznový cukr, kyselina citronová aj.

Za semitriviální názvy se považují ty, jež se skládají z části utvořené systematicky a z části, která není utvořena systematicky (triviálně)¹⁵. Jako příklady semisystematických názvů lze uvést glycerol, kalciferol, atd.

3.2. Kódová označení, kódové názvy

Jde o první pracovní označení léčiva udělené během jeho výzkumu. Používá se více způsobů:

- alfanumerická kombinace, v níž se abecední část vztahuje k firmě, laboratoři, nebo jde o vlastní kód výrobce. Číselná složka může být určena arbitrárně (není podmínkou).

- kombinace písmen, která je obvykle odvozena ze segmentu chemického názvu (není podmínkou)¹⁶.

Obvykle je praxe taková, že se kódové označení látky používá až do doby, než je jí přidělen název INN (mezinárodní nechráněný název)¹⁷. Léčiva mohou mít i dvě označení, pokud se více subjektů podílí společně na jeho výzkumu a vývoji; jako příklad uvádíme prasugrel. Kódové označení léčiva se může změnit při změně vlastníka látky, potenciálního léčiva. Například látka s kódovým označením SRT-501 byla chráněná léková formulace společnosti Sirtris, která disponuje lepší biologickou dostupností než původní látka (resveratrol)¹⁸. Po převzetí firmy Sirtris Pharmaceuticals společností GlaxoSmithKline v roce 2008, je látka označována v předklinických studiích kódem GSK-184072. V historii jsou známy případy, kdy se kódové označení stalo známějším, než jiné názvy léčiva nebo léčivého přípravku¹⁶, například označení RU-486 (látka mifepriston, přípravek Mifegyne, Mifeprex).

K identifikaci léčiva slouží i jiné druhy kódů, například chemické vzorce, registrační čísla (např. CAS). Někdy jsou kódová označení uváděna samostatně¹⁷, jindy zařazována mezi názvy generické¹⁹.

3.3. Generické názvy

Jde o název, který jako první uvede pro danou látku její objevitel nebo výrobce, to znamená o pracovní označení potenciálního léčiva. Generický název se může změnit na název INN, nebo se vytvoří jiný název INN (cit.²⁰). Pro tvorbu generických názvů léčiv nejsou určena žádná pravidla. Příklad viz tabulku I.

Část autorů ztotožňuje název generický s názvem INN. Například Melichar píše²¹: „generické názvy čili zkratkově INN ...“, Fidelino poznamenává, že každý přípravek má generický název, a že pojem „nechráněný“ může být zaměnitelně používán s pojmem „generický“²².

Na tomto místě upozorňujeme na nutnost odlišovat od sebe pojmy generický název a generikum. Generikum lze ve stručnosti definovat jako léčivý přípravek, který má shodné kvalitativní a kvantitativní složení, pokud jde o léčivé látky, a shodnou lékovou formu s referenčním léčivým přípravkem a u kterého byla prokázána bioekviva-

Tabulka I
Příklady názvů léčiv

Kódové označení	Generický název	INN název	Výrobce
VUFB 10615	dosulepin	dosulepin	Zentiva, k. s., Praha
K 1902	pentakain	trapeknain	není vyráběn
CS-747, LY640315	není znám	prasugrel	Daiichi Sankyo Co Ltd., Eli-Lilly
T-20, DP 178, ENF	pentafusid	enfuvirtid	Trimeris, Hoffmann-La Roche
SRT-501, GSK-184072	resveratrol ^a	resveratrol ^a	Sirtris Pharmaceuticals, GlaxoSmithKline

^a Přírodní název

lence s referenčním léčivým přípravkem příslušnými studiemi biologické dostupnosti⁵.

3.4. Národní a mezinárodní nechráněné názvy (INN)

K národním nechráněným názvům bychom mohli zařadit názvy léčiv uvedené například ve zdrojích: BAN, DCF, DCIt, JAN, NFN, USAN. Příkladem mezinárodních nechráněných názvů je názvosloví INN. Název INN léčiva je jednoduchý, stručný a jedinečný název, který je celosvětově uznávaný a je veřejným majetkem. Systém INN byl zaveden rezolucí Světového zdravotnického shromáždění (WHA) v roce 1950 a začal se používat v roce 1953, kdy byl publikován první seznam názvů pro, do té doby, používaná léčiva²³.

Názvy INN léčiv jsou přidělovány pouze jednotlivým přesně definovaným látkám, které lze jednoznačně charakterizovat chemickým názvem nebo vzorcem. Do programu politiky INN nepatří udělovat tyto názvy směsím, ani rostlinným látkám (rostlinným léčivům), ani léčivům, která jsou obsažena jen v homeopatických přípravcích. Dále do filozofie této politiky patří dodatečně neudělovat INN těm léčivům, která už byla dlouhou dobu před zavedením zmíněného systému používána v terapeutické praxi pod osvědčenými (názvy alkaloidů morfin, kodein) nebo triviálními chemickými názvy (kyselina octová)²³.

WHO zveřejňuje názvy INN v anglické, latinské, francouzské, ruské, španělské, arabské a čínské verzi. Názvy INN mají v sobě zabudovanou slovní částici – morfém, který je nositelem informace o začlenění léčiva do určité skupiny. Příklady prefixů, infixů a sufixů: *cefadroxil*, *hydrokortison*, *simvastatin*. Vyšší informační hodnotu poskytují názvy monoklonálních protilátek, neboť jsou složeny ze čtyř částí, které tvoří variabilní předpona – tento prefix navrhne výrobce, infix určující cílovou strukturu (tumor, tkáň, systém, ...), další infix, který identifikuje původ (typ) nebo princip získávání (výroby) protilátky. Název je ukončen sufixem *-mab*, který přiřazuje léčivo do skupiny monoklonálních protilátek. Podrobněji například Benes²⁴. Zvláštní pozornost je věnována problematice názvů INN dalších biologických a biotechnologickými postupy připravených léčiv v práci²⁵.

3.5. Systematické názvy, chemické názvy

Jejich charakteristiku vystihuje Kahovec²⁶, když píše: „Chemické názvosloví je svébytný umělý jazyk, který má vlastní morfémy (kořeny, předpony, přípony, infixy, afixy), vlastní gramatiku, vlastní syntax i interpunkci. Používá prostředků, které nemají obdoby v přirozených jazycích. Kombinuje podle přesných pravidel latinská a řecká písmena, různé druhy písma, číslice arabské i římské, a používá hierarchii závorek“. Má formu komplexního a specifického označení, které jednoznačným způsobem pojmenovává určitou chemickou sloučeninu (léčivo). Pro svou komplikovanost se však v rutinní lékařské a farmaceutické praxi používají minimálně. Názvosloví chemických sloučenin podléhá v historických souvislostech urči-

tým změnám, takže především u léčiv objevených v předcházejících desetiletích se v literatuře setkáváme s rozdílnými názvy¹⁹.

3.6. Lékopisné názvy

Lékopisné (oficinální = uvedené v lékopise, z latinského *officina* – dílna, lékárna) názvy léčiv jsou názvy, pod kterými jsou jednotlivá léčiva uvedena v lékopise. Začínají se vždy velkým písmenem. Lékopisné názvy nejsou zvláštním druhem názvu – název lékopisného článku (tzv. monografie) je aplikací chemického, triviálního, příp. názvu INN. Vývoj lékopisných názvů léčiv úzce souvisí s historickým vývojem léčiv a jejich nomenklatury.

3.6.1. Lékopisy

Lékopis je základní farmaceutické dílo normativního charakteru s celostátní závazností, který zásadně přispívá ke zvýšení jakosti, bezpečnosti a účinnosti léčiv a prostředků používaných v terapii²⁷. Označení lékopis (lat. *pharmacopoea*) se stalo všeobecně známým označením úřední sbírky farmaceutických standardů koncem 16. století. Pojem *pharmacopoea* se poprvé objevil v názvu oficiální publikace v roce 1573 (druhé vydání Augsburského lékopisu – *Pharmacopoea, seu Medicamentorum pro Republica Augustana*)²⁸. Historii lékopisů se podrobně zabývá například práce²⁹.

3.6.2. Lékopisné názvosloví

Původní názvy chemických sloučenin vycházely zpravidla z jejich vlastností (barva, konzistence, chuť, atd.), příp. nesly v sobě jméno objevitele, například *sal mirabilis Glauberi* (síran sodný; *sal* (lat.) = sůl, *mirabilis* (lat.) podivuhodný; J. R. Glauber, objevitel sloučeniny). Byly to tedy názvy triviální. Tento způsob označování nevyhovoval nic o chemické podstatě sloučenin, navíc se hromadila označení, mnohdy i několik desítek, pro jednu a tutéž látku³⁰. V označování chemických sloučenin se používaly alchymistické nebo jim podobné značky, které se v některých případech promítly i do názvů látek³¹, například *saccharum Saturni* (octan olovnatý; *saccharum* (lat.) = cukr, značka planety Saturn se v alchymii používala pro označení olova).

Chemie od 16. století přinesla do léčení nový pohled. V terapii nemocí se začaly používat chemické (převážně anorganické) sloučeniny a přípravky z nich. Tato chemická léčiva se dostala i do dobových úředních receptářů, dispenzatorií (seznamy léků, sbírky předpisů) a lékopisů pod triviálním názvem³². Některé původní triviální názvy přežily v evropských lékopisech do 19.–20. století a byly uváděny jako synonyma názvů oficinálních léčiv (např. *Flores Benzoës* – synonymum kyseliny benzoové, uvedeno v 8. vydání Rakouského lékopisu z roku 1906 (cit.³³)).

Nepřehlednost různých triviálních názvů sloučenin v 18. století podnítila vznik nového chemického názvosloví. V roce 1787 publikovala v Paříži skupina francouzských chemiků – A. L. Lavoisier, L. B. Guyton de Mor-

veau, C. L. Berthollet a A. F. Fourcroy – návrh nové chemické nomenklatury *Méthode de nomenclature chimique*, který byl vytvořen na základě binárního systému pojmenování sloučenin.

V posledním desetiletí 18. století se nová chemická nomenklatura začala používat i v lékopisech. V roce 1794 ji jako první zavedl Španělský lékopis (*Pharmacopoea Hispana*) a 5. vydání Rakouského provinciálního lékopisu (*Pharmacopoea Austriaco-provincialis*), který platil i u nás. Vzhledem k úřednímu charakteru lékopisů tím bylo nové chemické názvosloví oficiálně uznáno jako všeobecně platné. Rakouský lékopis (*Pharmacopoea Austriaca*) vydávaný od roku 1812 dal novým chemickým názvům přednost, staré triviální názvy však neodstranil³⁰.

V průběhu 19. století se vedle chemických léčiv anorganických v terapii objevují i organické sloučeniny, připravené syntézou, příp. izolací z rostlinných nebo živočišných drog (chápaných jako odborný farmaceutický pojem ve smyslu surovina). Organické sloučeniny byly pojmenovány triviálními názvy, které poukazyvaly na vlastnosti, příp. původ dané látky (např. opiový alkaloid morfin dostal název podle Morphea, syna římského boha spánku Somna; alkaloid chinin podle rostliny *Cinchona succirubra*, z níž byl izolován³⁴). Tyto triviální názvy organických léčiv figurovaly i v lékopisech.

Předpokladem pro vytvoření systematických chemických názvů organických sloučenin – léčiv bylo na jedné straně objasnění jejich struktury, na druhé straně položení základů mezinárodní chemické nomenklatury pro organické sloučeniny. Základy názvosloví organické chemie byly položeny v roce 1892 v Ženevě na mezinárodním kongresu pro úpravu chemického názvosloví (tzv. Ženevské názvosloví)³⁵. Vzhledem ke složitosti systematických názvů organických sloučenin se však v rutinní lékařské a farmaceutické praxi nerozšířily a do lékopisů byly zařazeny až v druhé polovině 20. století.

První snahy o vytvoření mezinárodní farmaceutické normy – lékopisu – a s ní jednotného lékopisného názvosloví léčiv se objevily již v 19. století. Lékopisnou problematikou a unifikací národních standardů v oblasti léčiv se odborníci zabývali na prvním Mezinárodním farmaceutickém kongresu (Brunswick, 1865). V následujících letech se diskuse zúžily na sjednocení v oblasti silně účinných léčiv včetně jejich nomenklatury (I. a II. mezinárodní dohoda o sjednocení předepisování silně účinných léčiv, Brusel, 1902 a 1925).

V dalším období vzniká potřeba vytvořit mezinárodní lékopis. V roce 1937 byla vytvořena Technická komise lékopisných expertů (*Technical Commission of Pharmacopoeial Experts*) při Zdravotnické organizaci Společnosti národů. Hlavním úkolem komise bylo připravit Mezinárodní lékopis (*Pharmacopoea Internationalis*), včetně vytvoření všeobecně platných pravidel názvosloví léčiv. Vydání Mezinárodního lékopisu zabrzdlily události druhé světové války. Po jejím skončení se v roce 1947 prozatímní komise WHO rozhodla ustavit pracovní skupinu, která by pokračovala v přípravě Mezinárodního lékopisu. První WHA v roce 1948 schválilo ustavení Odborné komise pro sjednoce-

ní lékopisů (později přejmenována na Odbornou komisi pro Mezinárodní lékopis) a usneslo se na vydání Mezinárodního lékopisu v anglickém, francouzském a španělském jazyce. Jeho první svazek byl vydán v roce 1951 (cit.²⁸).

Tvorba jednotného lékopisu si vyžádala i sjednocení nomenklatury léčiv, poněvadž v praxi se v různých státech používaly různé nechráněné názvy léčiv. V roce 1949 jednala Odborná komise pro sjednocení lékopisů o sestavení jednotných pravidel pro názvosloví léčiv. Plán komise byl schválen rezolucí WHA v roce 1950 (cit.²³). Mezinárodní lékopis používal latinské názvosloví léčiv, uznávané WHO. Toto názvosloví převzal i Evropský lékopis, jehož první vydání vyšlo v rozmezí let 1969–1977 (cit.¹⁷). Další nadnárodní lékopisné dílo, *Compendium Medicamentorum*, vydávané v rámci zemí RVHP od roku 1970 (cit.³⁶), také adaptovalo mezinárodně uznávané latinské názvosloví léčiv, doporučené WHO, v označování anorganických látek byla použita nomenklatura podle IUPAC (cit.³⁷).

U nás je tradičně používán jako hlavní lékopisný název latinský název léčiva. Do ČSL 1 bylo převzato latinské názvosloví osmého vydání Rakouského lékopisu. Šlo o názvosloví, které se v první polovině 20. století běžně používalo ve střední Evropě, již tehdy se však lišilo od latinského názvosloví léčiv, používaného v západní Evropě, příp. v USA. Tradiční stredo-evropské latinské názvosloví s menšími úpravami přecházelo i do dalších vydání našeho lékopisu¹⁷. Mezinárodně uznávané latinské lékopisné názvosloví se od našeho tradičního latinského názvosloví liší hlavně v názvech solí, esterů, oxidů a hydroxidů. Rozdíly mezi dvěma nomenklaturními systémy podrobně uvádí práce Mareše³⁸. Kromě hlavního názvu lékopisné monografie léčiva se zde obvykle uvádějí i další názvy, používané pro dané léčivo.

ČSL 1 v nadpisech jednotlivých článků uvádí názvy léčiv ve stručném latinském názvosloví. Pro některá do lékopisu zařazená léčiva, jejichž vědecká chemická označení by pro svoji složitost byla v praxi na závalu, byla tak jako v lékopisech zahraničních, zavedena umělá zkrácená pojmenování (např. Procainum pro 2-(diethylamino) ethylester kyseliny 4-aminobenzoové). Pod hlavním latinským označením léčiva je uveden nejprve jeho český název a název slovenský. Označení anorganických látek se uvádí podle českého chemického názvosloví. Za českým označením jsou umístěna někde i odchylná, ale obecně užívaná jiná latinská a česká označení. Pak následují jako synonyma odchylná hlavní latinská označení léčiv podle Rakouského lékopisu (8. vydání) a Uherského lékopisu (3. vydání)³⁹.

Názvy léčiv v nadpisech monografií ČSL 2 se uvádějí v běžném latinském názvosloví. Pro některá chemická léčiva, jejichž chemická označení by byla pro svou složitost pro praxi nevhodná, jsou zavedena umělá zkrácená pojmenování (např. Propylparabenum, dříve Propylum paraoxybenzoicum), příp. jsou ponechány vžitější starší názvy (např. Morphinum hydrochloridum). Pod hlavním latinským názvem léčiva je uvedena nejprve jeho zkratka a pod ní někde teprve správný latinský název. Nevystihují-li běžný latinský název správné složení léčiva v článku

popsaného, pak se uvádí jeho český název a název slovenský, je-li jiný než český. Anorganické látky se uvádějí v českém chemickém názvosloví. Od chemického názvu je upuštěno u sloučenin komplikovaného složení, jako jsou alkaloidy, hormony, vitaminy, atd. Za českým označením jsou uvedena někde i odchylná, ale obecně užívaná jiná latinská i česká označení².

ČSL 3 zachoval způsob psaní latinských hlavních názvů lékopisných článků léčiv jako ČSL 2. Pro léčiva, kde byla přesná chemická označení pro svou složitost pro praxi nevhodná, jsou zavedeny uměle vytvořené zkrácené názvy podle mezinárodní nomenklatury (INN). Pod hlavním latinským názvem léčiva je uvedena jeho zkratka, dále český a slovenský název (je-li jiný, než český), pak následují synonyma³.

Hlavní latinské názvy léčiv v ČSL 4 jsou v souladu s názvy schválenými nebo doporučenými WHO. Pokud tomu tak není, je mezinárodní název uváděn jako synonymum. U léčiv, která nejsou v seznamu schválených mezinárodních názvů, uvádí lékopis jako synonyma názvy vytvořené v duchu nomenklaturních zásad WHO. České a slovenské názvy léčiv jsou převzaty z ČSL 3, názvy nově zařazených léčiv byly vytvořeny podle stejných zásad a v souladu se zásadami chemického názvosloví. V textech jednotlivých lékopisných článků je uváděn chemický název podle pravidel IUPAC⁴.

V roce 1990 bylo navrženo vypracování Československého lékopisu, 5. vydání, jehož základ by tvořil Evropský lékopis a tím by Československý lékopis byl harmonizován s evropskou normou pro léčiva, jejíž význam překročil hranice členských států Evropského společenství. Po rozdělení ČSFR na dvě samostatné republiky od roku 1993 bylo rozhodnuto, že ČR i SR si budou připravovat své vlastní národní lékopisy. První samostatný Český lékopis 1997 byl harmonizován s Ph. Eur. 3.

Lékopisné články ČL 97 jsou uvedeny mezinárodními názvy schválenými nebo doporučenými WHO, pod kterými jsou názvy české. Podle potřeby jsou uvedena též synonyma (obvykle název ČSL 4 nebo Ph. Eur., pokud je rozdílný). U chemických léčiv je v záhlaví článku, v odstavci definujícím léčivo uveden český chemický název vytvořený podle zásad IUPAC a českého názvosloví anorganické a organické chemie²⁷.

Podobně tomu i v dalších vydáních ČL (2002, 2005, 2009) a jejich doplňcích je jako hlavní název lékopisného článku léčiva upřednostněn název latinský a jako vedlejší název je uveden název český^{40–42}.

Poznámka k pojmu synonymum: ve farmaceutické literatuře se často zkresleně objevuje výklad pojmu synonymum, což se nesprávně převzalo i do lékopisné praxe. Synonyma (slova/sousloví souznačná) jsou jazykové jednotky se společnou pojmenovací funkcí. V jednom a totéž jazyku různými slovy nestejného kořene vyjadřují v určitém údobí obsahový význam jednoho a téhož denotátu (označované skutečnosti). Z hlediska synonymie lze názvy ve farmaceutických oborech rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří terminologická synonyma (věcně identická), druhou pojmenování, která se nacházejí za

hranici synonymie a bývají chybně označována jako synonyma⁴³. Důslednou aplikaci těchto zásad na názvy léčiv můžeme za terminologická synonyma považovat vztah národních, triviálních, semitriviálních a systematických názvů léčiv (např. hořká sůl a síran hořečnatý, vitamin C a kyselina askorbová, atd.). Chybně bývají jako synonyma označeny např. chlorid sodný a natrii chloridum (cizojazyčně ekvivalenty) nebo natrii chloridum a natrium chloratum (hláskové varianty).

3.7. Obchodní názvy, výrobní názvy

Tyto názvy jsou již vyhrazeny pro kategorii léčivých přípravků. Jde o chráněné názvy. Do kategorie nechráněných názvů bychom tak měli z podstaty věci zařadit názvy uvedené v podkapitolách 3.1. až 3.6.

Jako synonyma přicházejí v úvahu názvy léčiv uvedené v podkapitolách 3.1. až 3.6. (cit.^{19,44}), i když například Negwer za synonyma považuje i názvy obchodní v případě, že jde o monokomponentní léčivé přípravky⁴⁵.

4. Závěr

Problematika léčiv a léčivých přípravků má v oblasti zdravotnictví nezastupitelné postavení. Jejich historie sahá do daleké minulosti, ale od 20. století do současnosti nastává v této oblasti prudký rozvoj. Tato skutečnost přináší do řad odborné veřejnosti problémy, které souvisejí s jejich označováním, tříděním a zpracováním do informačních systémů. Studovat problematiku účinků léčiv je možné pouze tehdy, když jsou známy jejich chemické struktury a konfigurace vyjádřené vzorci a jejich adekvátními názvy. Situaci komplikuje více okolností – každé léčivo má několik názvů, dále tradice v jednotlivých zemích, především rozdílný názvoslovný přístup z hlediska různých vědních oborů (botanika, biologie, chemie, biotechnologie, medicína, farmacie). Rozdílný názvoslovný přístup byl dříve uplatňován rovněž v národních lékopisech. Významný pokrok v této oblasti představuje iniciativa WHO v podobě vytvoření všeobecně akceptované, sjednocující systematiky mezinárodních nechráněných názvů léčiv, kterou respektují současné nadnárodní i národní lékopisy.

Seznam použitých zkratk

BAN	British Approved Name
CAS	Chemical Abstract Service
ČL	Český lékopis
ČSL	Československý lékopis
DCF	Dénomination Commune Française
DCI	Dénomination Commune Internationale
DCIt	Denominazione Comune Italiana
INN	International Nonproprietary Name
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JAP	Japanese Accepted Name for Pharmaceuticals

NFN	Nordiska farmakopénämnden
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
RVHP	Rada vzájemné hospodářské pomoci
USAN	United States Adopted Name
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization

LITERATURA

- Zákon č. 79/1997 Sb. o léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). Sbírka zákonů 1997, částka 26, str. 1801.
- Československý lékopis 2. vydání. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1954.
- Československý lékopis 3. vydání. Avicenum, Praha 1970.
- Československý lékopis 4. vydání. Avicenum, Praha 1987.
- Zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), v platném znění. Sbírka zákonů 2007, částka 115, str. 5342.
- Zákon č. 140/1998 Z. z. o liekoch a zdravotníckych pomôckach, o zmene zákona č. 455/1991 Zb. o živnostenskom podnikaní (živnostenský zákon) v znení neskorších predpisov a o zmene a doplnení zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 220/1996 Z. z. o reklame (zákon o liekoch a zdravotníckych pomôckach). Zbierka zákonov 1998, čiastka 49, str. 979.
- Slovenský liekopis Vydanie prvé. Herba, Bratislava 1997–2004.
- Melichar M.: Farm. Obzor 59, 275 (1990).
- Melichar B.: Cesk. Farm. 37, 138 (1988).
- Palát K., Melichar B., Kňazko L.: Farm. Obzor 59, 309 (1990).
- Rusek V., Kučerová M.: Úvod do studia farmacie a dějiny farmacie. Avicenum, Praha 1983.
- Chalabala M.: Farm. Obzor 70, 7 (2001).
- Chalabala M., Špringer V.: Slovakofarma Rev. 7, 74 (1997).
- Heger J.: Farm. Obzor 70, 143 (2001).
- Panico R., Powell W. H., Richer J.-C. (překlad Kahovec J., Liška F., Paleta O.): Průvodce názvoslovím organických sloučenin podle IUPAC. Doporučení 1993. Academia, Praha 2000.
- Kolář J., Špringer V.: Prakt. Lek. 83, 128 (2003).
- Mareš V.: Vestník SÚKL 1994, č. 6, str. 2.
- Elliott P. J., Walpole S., Morelli L., Lambert P. D., Lunsman W., Westphal C. H., Lavu S.: Drugs Future 34, 291 (2009).
- Špringer V., Kolář J., Chalabala M.: Vnitr. Lek. 50, 91 (2004).
- Đurinda J., Borovanský A.: Farm. Obzor 58, 491 (1989).
- Melichar B.: Cesk. Farm. 38, 69 (1989).
- Fidelino R. J.: J. Gen. Med. 5, 45 (2007).
- Guidelines on the Use of International Nonproprietary Names (INNs) for Pharmaceutical Substances. WHO, Geneva 1997.
- Beneš L.: Chem. Listy 101, 18 (2007).
- International Nonproprietary Names (INN) for Biological and Biotechnological Substances. WHO, Geneva 2007.
- Kahovec J.: Chem. Listy 94, 953 (2000).
- Český lékopis 1997. Grada, Praha 1997.
- Urdang G.: Bull. World Hlth. Org. 4, 577 (1951).
- Broncová D. (ed.): Historie farmacie v českých zemích. Milpo, Praha 2003.
- Drábek P.: Sborník přednášek z dějin farmacie přednesených na odborných symposiích v roce 2004, str. 6. ČFS, Praha 2004.
- Balázs L.: A kémia története. Gondolat, Budapest 1974.
- Schneider W.: Geschichte der pharmazeutischen Chemie. Verlag Chemie, Weinheim 1972.
- Pharmacopoea Austriaca Editio octava. Caes. Reg. Aulae et Imp. Typ., Vienna 1906.
- Kempler K.: A gyógyszeresek története. Gondolat, Budapest 1984.
- Heger J.: Cesk. Slov. Farm. 53, 99 (2004).
- Buriánek J., Hubík J., Parrák V.: Cesk. Farm. 21, 337 (1972).
- Compendium Medicamentorum. Akademie-Verlag, Berlin 1970.
- Mareš V.: Vestník SÚKL 1994, č. 7, str. 4.
- Československý lékopis 1. vydání. Státní tiskárna, Praha 1947.
- Český lékopis 2002. Grada, Praha 2003.
- Český lékopis 2005. Grada, Praha 2005.
- Český lékopis 2009. Grada, Praha 2009.
- Melichar M.: Cesk. Farm. 41, 198 (1992).
- Heger J., Kolář J., Špringer V.: Názvy léčiv a liekov a ich informačný potenciál. Osveta, Martin 2005.
- Negwer M., Scharnow H. G.: Organic-Chemical Drugs and Their Synonyms. Wiley, Weinheim 2001.

J. Kolář, T. Ambrus, and V. Špringer (Department of Applied Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno): **Drug Nomenclature in View of Pharmacopoeial Names**

A drug may have several different types of names: trivial name, code designation or drug code number, generic name, national and international non-proprietary name, chemical name, pharmacopoeial name and company name (brand name, or trade name). Each of these types of names conveys specific purposes and contexts a drug may be used for. Attention is primarily paid to pharmacopoeial nomenclature of drugs.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ANALÝZA PROTEINŮ POMOCÍ AUTOMATICKÉ ČIPOVÉ ELEKTRO- FORÉZY EXPERION A POROVNÁNÍ S METODOU SDS-PAGE

JAN BÁRTA, VERONIKA BÁRTOVÁ
a VLADISLAV ČURN

*Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fa-
kulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Stu-
dentská 13, 370 05 České Budějovice
barta@zf.jcu.cz*

Došlo 20.10.08, přijato 19.1.09.

Klíčová slova: SDS-PAGE, čipová elektroforéza, analýza
proteinů, patatin

Úvod

V posledních několika desetiletích představuje elektroforéza na polyakrylamidovém gelu probíhající v prostředí dodecyl síranu sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) – tak jak byla popsána v zásadní a dnes již světoznámé práci¹, ale i ve svých dalších modifikacích – jednu ze základních metod analýzy proteinů a je proto hojně používána v biochemii a příbuzných oborech (genetika, molekulární biologie, mikrobiologie aj.). Klasická Laemmliho práce má podle databáze ISI Web of Knowledge více než 100 000 citací. Základní odlišnost od primární nedenaturační polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) spočívá v přítomnosti a působení molekul anionického detergentu SDS na proteinový vzorek při jeho přípravě a v gelovém systému při vlastní separaci.

Účinkem detergentu SDS dochází k rozpadu kvarterní struktury proteinů na jednotlivé proteinové podjednotky (což se děje již při přípravě vzorků pro vlastní analýzu za spolupůsobení 2-merkapt ethanolu a krátkého záhřevu na denaturační teplotu 100 °C), které na sebe vážou molekuly SDS v konstantním poměru: 1 g polypeptidu naváže 1,4 g SDS (cit.^{2,3}). Skutečné náboje polypeptidů se proto stávají zanedbatelnými v porovnání s negativním nábojem, který poskytuje navázaný anionický detergent, takže vytvořené SDS-polypeptidové komplexy mají v podstatě stejné nábojové hustoty a migrují v polyakrylamidovém gelu o vhodné porozitě podle své velikosti^{4,5}. Mezi migrační dráhou (resp. mezi relativní mobilitou, Rf) proteinu a jeho mole-

kulovou hmotností existuje hyperbolická závislost³, která je většinou pomocí dekadického logaritmu z praktického hlediska převáděna do lineární podoby^{6–8}. Z vhodně sestavené směsi proteinů o známé molekulové hmotnosti (např. komerčně dostupné standardy molekulové hmotnosti proteinů), lze po provedené SDS-PAGE zjistit hodnoty Rf a sestavit kalibrační křivku pro stanovení molekulových hmotností i u neznámých proteinů^{3,9}. Účinnost SDS-PAGE systému pro stanovení molekulové hmotnosti v určitém hmotnostním rozpětí závisí na velikosti pórů separačních gelů. Porozita gelu je určena podílem monomerů akrylamidu a bis-akrylamidu v celkovém objemu gelu (% T) a také zastoupením bis-akrylamidu v celkovém množství obou typů monomerů (% C). Např. separační gel s T = 5 % je vhodný pro rozpětí molekulových hmotností 60 000 až 200 000 Da, naopak gel o T = 15 % je vhodný pro rozpětí molekulových hmotností 10 000–70 000 Da (cit.^{8,9}). Kromě stanovení molekulové hmotnosti je technika SDS-PAGE používána také pro analýzu čistoty proteinu, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, odhad relativní a absolutní koncentrace sledovaných proteinů v proteinové směsi, pro detekci proteinových modifikací, při studiu kvarterní struktury proteinů, ale i v jiných aplikacích^{3,7,8,10}.

Přestože je technika SDS-PAGE v biochemii a příbuzných oborech hojně používanou metodou, jde o metodu poměrně pracnou. Zjednodušeně lze průběh celé elektroforetické analýzy při použití klasické detekce pomocí Coomassie Blue shrnout do následujících na sebe navazujících pracovních kroků: příprava polyakrylamidových gelů, příprava vzorků a jejich aplikace na gel, samotný průběh elektroforézy, fixace a detekce podoby proteinových pruhů na gelu pomocí roztoku Coomassie Blue, odbarvování obarveného pozadí gelů, dehydratace a sušení gelů, vyhodnocení získaných dat pomocí obrazové analýzy a speciálního software. I přes použití komerčně nabízených předem připravených (pre-cast) gelů a jejich aktivním usušením po detekčních procedurách trvá analýza nejméně 3 hodiny, ve většině případů však déle (hodiny až dny)^{2,7}. Při přípravě polyakrylamidových gelů je potřebné k nevhodným této metody připočítat také práci s vysoce toxickým monomerním akrylamidem (jde o neurotoxin, karcinogen a mutagen)⁷.

Není proto překvapivé, že v průběhu let byla snaha zavést zjednodušení, automatizaci a vyšší bezpečnost práce při aplikaci této metody v laboratořích (velkokapacitní automaty na SDS-PAGE, kapilární elektroforéza aj.)². Zejména v posledním desetiletí umožnil prudký rozvoj mikrofluidní technologie výrazné zjednodušení a miniaturizaci i v oblasti elektroforetické separace proteinů^{11,12}. Firmy zabývající se separačními technologiemi proteinů, jako jsou Agilent, Bio-Rad, Shimadzu, začaly na trh dodávat automatické elektroforetické systémy pracující na prin-

čipu mikrofluidní technologie, kdy se celá analýza odehrává v miniaturním prostředí speciálního čipu.

Cílem tohoto příspěvku je zhodnocení výsledků analýzy proteinů získaných pomocí systému automatické elektroforézy Experion (Bio-Rad) a jejich porovnání s výsledky tradiční metody SDS-PAGE.

Experimentální část

Proteinové vzorky

a) Pro260 Ladder (Bio-Rad) – směs proteinových standardů, součást analytického kitu pro systém Experion. Obsahuje deset proteinů v rozsahu molekulové hmotnosti (MW) 1,2 až 260 kD. Jedná se o blíže nespecifikované rekombinantní proteiny o MW 1,2; 10; 20; 25; 37; 50; 75; 100; 150 a 260 kDa.

b) SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da (Sigma) – je proteinový standard určený pro použití v klasických systémech SDS-PAGE dle Laemmliho procedury¹. Sestává z 12 proteinů: aprotinin z hovězích plic (6,5 kDa), α -laktalbumin z kravského mléka (14,2 kDa), trypsinový inhibitor ze sójových bobů (20 kDa), trypsinogen z hovězího pankreatu (24 kDa), karbonátanhydrasa z hovězích erytrocytů (29 kDa), glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa ze svalu králíka (36 kDa), ovalbumin ze slepičích vajec (45 kDa), glutamátdehydrogenasa z hovězích jater (55 kDa), albumin z hovězího séra (66 kDa), fosforylase b ze svalu králíka (97 kDa), β -galaktosidasa z *E. coli* (116 kDa), myosin ze svalu králíka (200 kDa).

c) Pro demonstraci využitelnosti testovaných systémů v rámci sledování úspěšnosti purifikačního procesu byly použity tři vzorky charakterizující purifikaci patatinu (molekulová hmotnost 40–43 kDa, pI = 4,6–5,2, cit.^{13,14}), hlavního proteinu hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.), pomocí dvoustupňové chromatografie na sloupci. Výchozí materiál (vzorek 1) – centrifugovaná a filtrovaná hlízová voda získaná z bramborových hlíz odrůdy Westamyl byla po úpravě reakce na pH 8,0 pomocí roztoku 1 M Trizma (Sigma) aplikována na ekvilibrovanou kolonu s náplní 5 ml DEAE 52 – Cellulose Servacel (Serva), kolona byla promyta 35 ml promývacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4) a isokraticky eluována 7 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M-NaCl). Získaný eluát (vzorek 2) byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu s náplní 5 ml Con A – Sepharose 4B (GE Healthcare) a následně byl promyt stejným pufrům, jakým byla provedena eluce v minulém kroku. Po té byly navázané patatinové proteiny eluovány 7 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M-NaCl + 100 mM α -methyl-D-glukosid). Získaný eluát představuje vzorek 3.

Přístroje a analýza

a) Automatická čipová elektroforéza

Proteiny byly analyzovány na systému automatické čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad, USA). Vlastní separace a detekce proteinů probíhá ve speciálních čípech založených na kombinaci mikrofluidní technologie Lab-Chip (Caliper Life Sciences) a citlivé fluorescenční detekce proteinového (resp. RNA či DNA) vzorku. Pro analýzu proteinů byl použit analytický kit Experion Pro260, který obsahuje proteinový standard (Pro260 Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barvu, centrifugační filtry a mikrofluidní čipy; každý čip pojme 10 vzorků. Příprava vzorku pro analýzu spočívala ve smíchání 4 μ l vzorku a 2 μ l vzorkového pufru, který obsahoval 3,2 % β -merkapt ethanolu. Směs vzorku a pufru byla ve vodní lázni zahřata na teplotu 95–100 °C po dobu 3 min a poté rozředěna 84 μ l ultra čisté vody (Millipore). Na čipy, do kterých byly před vlastní analýzou zavedeny gelové roztoky pomocí přístroje „priming station“ (dodávaného jako součást systému) podle instrukcí výrobce (Bio-Rad), byly vzorky aplikovány v množství 6 μ l po výše uvedené úpravě. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat bylo řízeno a provedeno pomocí speciálního software Experion, verze 2.1 (Bio-Rad, USA).

b) SDS-PAGE

SDS-PAGE analyzovaných vzorků proběhla na vertikální elektroforéze Mini Protean pomocí „pre-cast“ gelů Tris-HCl s lineárním gradientem 4–20 % (Bio-Rad, USA). Vzorky byly připraveny smícháním 4 μ l vzorku a 4 μ l vzorkového pufru (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 25 % (v/v) glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) bromfenolová modř – těsně před použitím se k 19 objemovým dílům tohoto pufru přidá 1 díl β -merkapt ethanolu). Směs vzorku a pufru byla ve vodní lázni zahřata na teplotu 95–100 °C po dobu 3 min, poté ochlazená a dále byly vzorky aplikovány na gel v množství 4 μ l takto upraveného vzorku. Vlastní separace byla provedena za podmínek konstantního napětí 200 V po dobu 55 min (jako elektrodový pufr byl použit systém Tris (0,025 M) – glycín (0,192 M) obsahující 0,1 % SDS). Po separaci byly gely vyjmuty, opláchnuty v destilované vodě a separované proteiny byly detegovány pomocí roztoku složeného z 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 500 ml methanolu, 100 ml octové kyseliny a 400 ml destilované vody. Následné vymytí detekčního roztoku z pórů gelů tzv. „odbarvení“ bylo provedeno pomocí odbarvacího roztoku (25 % ethanolu, 10 % octové kyseliny, 65 % dest. vody) po dobu 2 h a pomocí destilované vody (2 \times 400 ml po dobu 2 h) za podmínek aktivního třepání gelů o velmi nízké intenzitě na upravené třepače. Po odbarvení byly gely usušeny na sušičce Gel AirDrier (Bio-Rad, USA) a digitalizovány pomocí scanneru Microtek ScanMaker i800 (UMAX). Digitalizované informace byly zpracovány vyhodnocovacím softwarem BioProfil Bio 1D++, verze 99 (Vilber Lourmat, Francie).

Statistické hodnocení analýz

Základní statistické hodnocení získaných dat o molekulové hmotnosti a kvantifikaci proteinů bylo provedeno softwarem STATISTICA, verze 6 (StatSoft, Inc., 2001).

Výsledky a diskuse

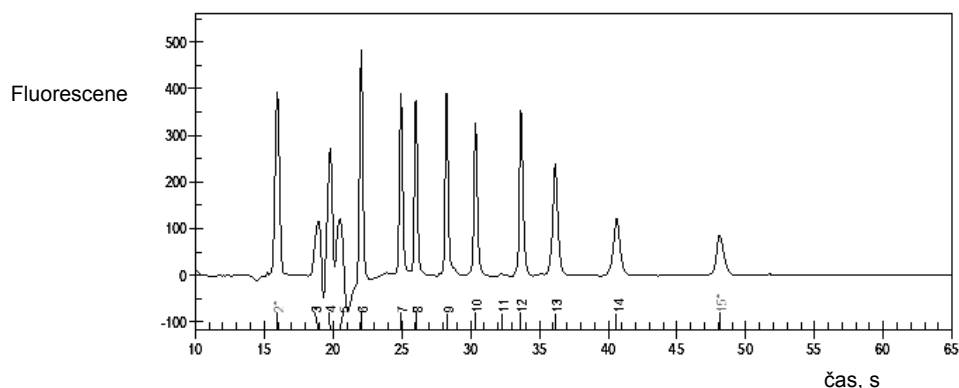
Stanovení molekulové hmotnosti

Stanovení molekulové hmotnosti (MW) je při studiu proteinů jedním ze základních požadavků a její určení pomocí SDS-PAGE je i přes řadu nevýhod této metody dostupná a snadno proveditelná s odpovídající přesností. Jak již bylo v úvodu uvedeno, existuje závislost MW proteinů na jejich migrační dráze resp. relativní mobilitě (Rf). Ta je v prvotní grafické podobě vyjádřena hyperbolou, nicméně používáno je zejména linearizované vyjádření závislosti dekadického logaritmu MW na relativní mobilitě^{3,9,15}. U systému čipové elektroforézy Experion vytváří obslužný a vyhodnocovací software kalibrační křivku,

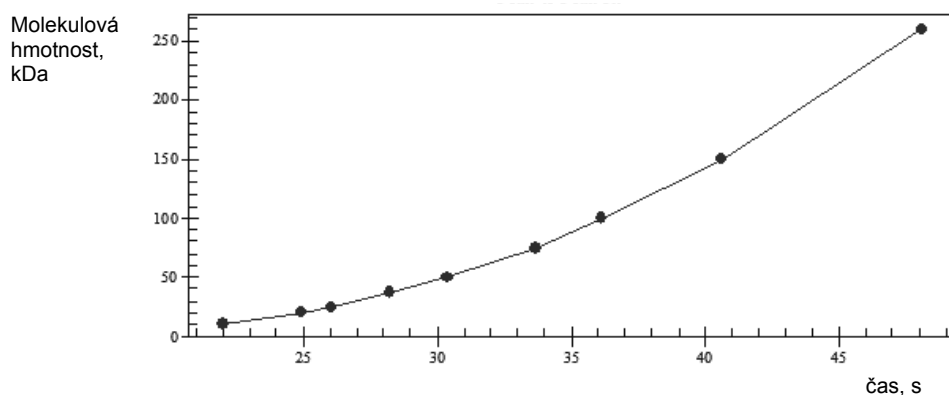
kteřá je založena na migračním čase (MT) a známé MW každého proteinu ve standardu „Pro260 Ladder“ (obr. 1 a 2). MT každého proteinu v rámci spektra vzorku jsou tímto softwarem nejprve normalizovány k separačnímu průběhu proteinového standardu pomocí hraničních proteinových markerů (1,2 a 260 kDa), které jsou přítomny ve vzorkovém pufru a jeho prostřednictvím jsou také součástí analyzovaného vzorku (jako interní standardy)¹⁶.

Pro porovnání přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení molekulové hmotnosti byla u obou hodnocených technik analyzována směs proteinů (obr. 3) v podobě proteinového standardu zahrnující široké rozpětí molekulové hmotnosti od 6,5 do 200 kDa (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da). Reprodukovatelnost stanovení MW byla vyjádřena užitím relativní směrodatné odchylky (RSD), která byla vypočtena jako směrodatná odchylka / průměr × 100. Přesnost stanovení MW byla naopak vyjádřena jako procentický rozdíl mezi naměřenými a deklarovanými hodnotami MW u jednotlivých proteinů obsažených v proteinové směsi.

Výsledky stanovení MW jsou shrnuty v tabulce I. Vyplývá z nich, že analýza MW proteinů na automatické



Obr. 1. Záznam průběhu analýzy proteinového standardu „Pro260 Ladder“ na systému čipové elektroforézy Experion



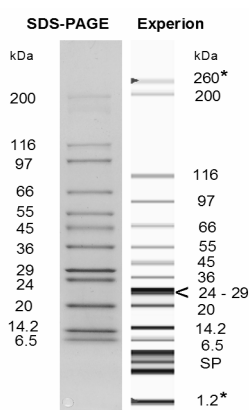
Obr. 2. Kalibrační křivka pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů na čipové elektroforéze Experion, konstruovaná na základě migračních časů devíti proteinů standardu „Pro260 Ladder“

Tabulka I

Porovnání přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení molekulové hmotnosti u proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da) na SDS-PAGE a automatické čipové elektroforéze Experion

Hodnocený protein	Deklarovaná molekulová hmotnost [kDa]	SDS-PAGE			Experion		
		analyzovaná molekulová hmotnost [kDa] ^a	přesnost ^b [%]	reprodukovatelnost ^c RSD [%]	analyzovaná molekulová hmotnost [kDa] ^a	přesnost ^b [%]	reprodukovatelnost ^c RSD [%]
Myosin ze svalu králíka	200	226,1 ± 3,1	13,1	1,4	239,6 ± 1,6	19,8	0,7
β-Galaktosidasa z <i>E. coli</i>	116	114,6 ± 3,9	-1,3	3,4	126,1 ± 1,5	8,7	1,2
Fosforylase b ze svalu králíka	97	93,5 ± 2,8	-3,6	3,0	96,9 ± 1,8	-0,1	1,8
Albumin (hovězí sérum)	66	64,5 ± 1,9	-2,3	2,9	73,3 ± 1,3	11,0	1,7
Glutamát dehydrogenasa (hovězí játra)	55	49,9 ± 1,3	-9,2	2,6	57,1 ± 0,9	3,8	1,5
Ovalbumin (slepičí vejce)	45	43,1 ± 1,1	-4,1	2,6	45,8 ± 0,9	1,8	1,9
Glycerinaldehyd-3-fosfát Dehydrogenasa (sval králíka)	36	35,4 ± 0,5	-1,8	1,5	37,5 ± 0,6	4,2	1,7
Karbonát anhydrasa (hovězí erytrocyty)	29	27,6 ± 0,6	-4,8	2,1	30,7 ± 0,5	5,9	1,5
Trypsinogen (hovězí pankreat)	24	24,4 ± 0,5	1,6	2,1	28,9 ± 0,6	20,5	2,1
Trypsin inhibitor (sója)	20	16,0 ± 0,2	-20,0	1,4	22,6 ± 0,3	12,9	1,1
α-Laktalbumin (kravské mléko)	14,2	11,4 ± 0,1	-20,0	0,9	14,5 ± 0,2	2,3	1,2
Aprotinin (hovězí plíce)	6,5	10,0 ± 0,1	53,7	0,8	10,2 ± 0,2	57,5	2,0

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD); ^b přesnost (v %) = 100[(analyzovaná molekulová hmotnost – deklarovaná molekulová hmotnost) / deklarovaná molekulová hmotnost]; ^c reprodukovatelnost jako relativní směrodatná odchylka RSD (v %) = [(směrodatná odchylka / průměr)*100]

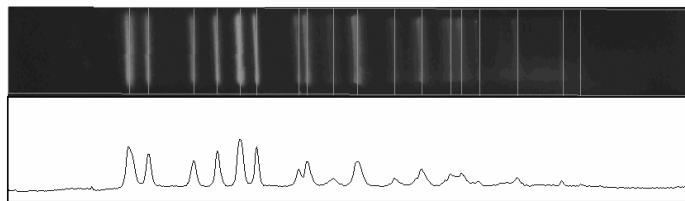


Obr. 3. Separace proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da) na SDS-PAGE a na čipové elektroforéze Experion; * proteiny s MW 1,2 a 260 kDa nejsou součástí proteinového standardu (SigmaMarker™ – Wide Range), ale jsou přítomny ve vzorkovém pufru, který je přidáván ke všem vzorkům analyzovaných pomocí kitu Pro260 na čipové elektroforéze Experion; SP – pruhy systémových pík

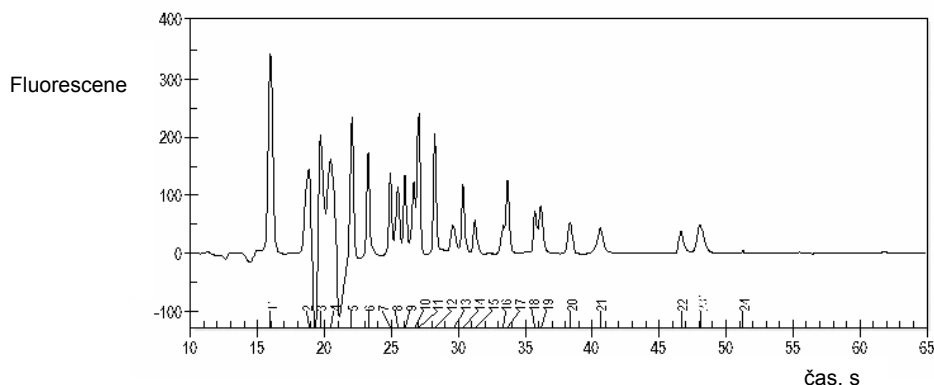
čipové elektroforéze Experion pomocí analytického kitu Pro260 měla vyšší reprodukovatelnost (RSD ≤ 2,09 %; v průměru 1,48 %) než analýza na SDS-PAGE (RSD ≤ 3,36 %; v průměru 2,17). Přesnost stanovení MW se u systému Experion pohybovala v rozpětí od -0,11 do 20,49 %, zatímco u SDS-PAGE bylo nalezeno rozpětí od -19,98 do 13,04 %. Do hodnocení obou charakteristik nebyl zahrnut protein aprotinin, jehož MW 6,5 kDa je mimo rámec analytických možností obou hodnocených metod. Tento fakt potvrzují i velmi výrazné odchylky zjištěných hodnot od deklarované hodnoty MW.

V podobně zaměřené studii, která se rovněž zabývala srovnáním výsledků obou metod¹⁷, bylo zjištěno, že systém Experion vykazuje přesnější a reprodukovatelnější výsledky (RSD ≤ 1,05 %), než tradiční SDS-PAGE (RSD ≤ 3,36 %). Pro systém Experion se v této studii pohybovala přesnost, vyjádřená stejným způsobem procentních odchylek od očekávané MW, v rozpětí od -8,56 do 8,49 %. To je sice o něco užší než u našich výsledků, ale počet provedených opakování u jednoho vzorku byl podstatně vyšší ($n = 25$), než v našem případě ($n = 3$), který se

a



b



Obr. 4. Grafický záznam dat z analýzy směsi proteinových standardů; a) výstup ze zpracování analýzy směsi proteinových standardů po SDS-PAGE pomocí software BioProfil Bio 1D++ (Vilber Lourmat), b) záznam separačního průběhu analýzy směsi proteinových standardů na systému číkové elektroforézy Experion (Bio-Rad)

v počtu provedených opakování více blíží běžné analytické praxi. Zajímavé je, že v této předešlé studii se procentní odchylky přesnosti stanovení MW pohybují jak v kladné, tak i v záporné oblasti, zatímco v našem případě se jedná o posun do kladné oblasti hodnot. V případě SDS-PAGE se v uvedené studii pohybovaly odchylky přesnosti spíše v záporné oblasti hodnot a v našem případě pokrývají kladnou i zápornou oblast hodnot.

Rozlišení

Podle dostupných informací výrobce by separační rozlišení systému Experion při použití analytického kitu Pro260 mělo být obdobné jako poskytují 4–20 % gradientové gely (Tris-HCl), které jsou doporučeny pro analýzy proteinů v rozpětí molekulové hmotnosti 10–260 kDa (cit.^{16,17}). Rozlišení je u separačních technik popisováno pomocí tzv. míry relativní separace dvou látek (R_S). Ta je obecně popisována vztahem $R_S = 1,18 \cdot (V_2 - V_1) / (w_1 + w_2)$, kde $V_1 - V_2$ reprezentuje vzdálenost maximálních bodů dvou píků resp. rozdíl jejich migračních časů, w_1 a w_2 jsou šířky těchto píků v polovině jejich výšky. Dokonalé rozlišení dvou píků až na základní linii je dosaženo při $R_S \geq 1,5$, většinou ale za předpokladu gaussovského tvaru píků postačuje rozlišení $R_S = 1$ (cit.^{18,19}). Z provedených analýz proteinů pomocí systému Experion (při použití analytického kitu Pro260), které se lišily o 10 % v MW, bylo zjištěno, že hodnota R_S roste se zvyšující se MW ana-

lyzovaných proteinů. Např. hodnota R_S při separaci proteinů s MW kolem 10 kDa byla 1,2, při separaci proteinů s MW 25 kDa je $R_S = 1,5$ a při 260 kDa je $R_S = 2$, z čehož vyplývá, že od 25 kDa by měly být rozděleny až na základní linii všechny analyzované proteiny lišící se v MW o 10 % (cit.¹⁷).

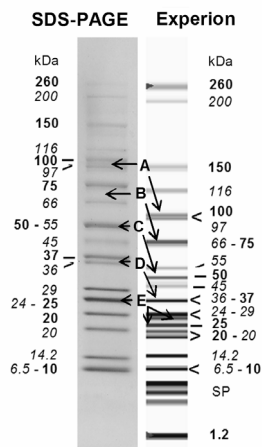
Náš test porovnání rozlišení obou elektroforetických technik zahrnoval 5 dvojic proteinů s podobnou MW v rozpětí od 24 do 100 kDa, které byly vybrány ve spektru proteinové směsi vzniklé smícháním proteinových standardů „Pro260 Ladder“ a „SigmaMarker™ – Wide Range, Molecular Weight 6,500–200,000 Da“ v objemovém poměru 1:1. Celkem takto vzniklá směs proteinů obsahovala 21 proteinů, ze kterých do samostatných píků rozlišil systém Experion 19 a tradiční SDS-PAGE 18 (obr. 4). Jak vyplývá z obr. 5 a dat uvedených v tab. II, oba dva elektroforetické systémy rozlišily tři dvojice proteinů – Experion dvojice A, B, C a SDS-PAGE dvojice A, B, D. Číková elektroforéza Experion dokázala rozlišit i čtvrtou dvojici proteinů (E), ale u trypsinogenu s deklarovanou MW = 24 kDa byla detegována MW = 28,94 kDa, takže nalezený rozdíl od molekulové hmotnosti druhého proteinu (Pro260 protein s deklarovanou MW = 25 kDa a nalezenou MW = 25,26 kDa) byl záporný (–12,72 %). Bradová a Matějová²⁰ se ve své práci zabývaly srovnáním výsledků analýz gluteninových podjednotek s vysokou MW (HMW-GS) u pšenice pomocí SDS-PAGE a číkové elektroforézy Experion. Autorky uvádějí, že v případě analýzy HMW-GS na Expe-

Tabulka II

Porovnání rozlišení vybraných proteinových párů analyzovaných na SDS-PAGE a automatické čipové elektroforéze Experion

Dvojice hodnocených proteinů	Deklarovaná molekulová hmotnost [kDa]	Nalezená molekulová hmotnost				Očekávaný rozdíl ^c [%]	Nalezený rozdíl ^d [%]	
		SDS-PAGE		Experion			SDS-PAGE	Experion
		průměr ^a [kDa]	RSD ^b [%]	průměr ^a [kDa]	RSD ^b [%]			
A Pro260 protein fosforylasy b	100	102,7 ± 3,3	3,2	100,5 ± 0,9	0,9	3,1	8,0	4,1
B Pro260 protein albumin (hovězí sérum)	75	77,2 ± 2,1	2,7	75,4 ± 0,9	1,1	13,6	18,0	2,1
C glutamát dehydrogenasa z hovězích jater	66	65,4 ± 2,1	3,2	73,8 ± 2,2	2,9			
Pro260 protein	55	50,6 ± 1,2	2,4	56,9 ± 0,6	1,1	10,0	0,0	13,3
D Pro260 protein glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa ze svalů králíka	37	37,3 ± 0,8	2,2	37,4 ± 0,6	1,6	2,8	4,3	0,0
Pro260 protein	36	35,8 ± 0,5	1,3	37,4 ± 0,6	1,6			
E Pro260 protein trypsinogen z hovězího pankreatu	25	24,9 ± 0,5	2,2	25,3 ± 0,6	2,5	4,2	0,0	-12,7
Pro260 protein	24	24,9 ± 0,5	2,2	28,9 ± 0,8	2,7			

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD); ^b RSD vyjadřující reprodukovatelnost jako relativní směrodatná odchylka $RSD (v\%) = [(směrodatná\ odchylka / průměr) * 100]$; ^c očekávaný rozdíl – relativní rozdíl mezi deklarovanými molekulovými hmotnostmi proteinů dané dvojice v %; ^d nalezený rozdíl (%) - relativní rozdíl mezi nalezenými molekulovými hmotnostmi proteinů dané dvojice v %



Obr. 5. Separace směšného vzorku proteinových standardů „Pro260 Ladder“ (hodnoty MW proteinů jsou tučně) + „SigmaMarker™ – Wide Range“ (hodnoty MW proteinů jsou kurzívou) na SDS-PAGE a čipové elektroforéze Experion s lokalizací pěti dvojic proteinů (A – E), které byly použity pro porovnání rozlišení obou metod; SP – pruhy systémových piků

rionu neodpovídá separační pořadí podjednotek striktně jejich MW a výsledek tak nesouhlasí s pořadím získaným pomocí SDS-PAGE. Tento fakt může být vysvětlen odlišnými podmínkami během separace proteinů při použití

zmiňovaných metod, pravděpodobně způsobených složenými efekty konformace a tvaru proteinových molekul, společně s rozdíly v interakci specifických proteinů se stěnami kapilár²¹. Tak mohou být vysvětlovány u některých proteinů i větší rozdíly mezi deklarovanými a naměřenými hodnotami MW. Např. MW hovězího sérového albuminu se při analýze na Experionu výrazněji odlišuje od deklarované MW (66 kDa). Podle našich výsledků dosažených na čipové elektroforéze Experion byla MW hovězího sérového albuminu 73,28 kDa (tab. I) resp. 73,80 kDa (tab. II). Zhu a spol.¹⁷ našli u tohoto proteinu při analýze na systému Experion hodnotu MW 71,60 kDa. Rozlišení obou porovnávaných metod tak lze hodnotit jako podobné a je možné souhlasit se závěry jiných autorů¹⁷, že systém Experion může mít v případě některých proteinových dvojic s podobnou MW lepší rozlišení než tradiční SDS-PAGE.

Kvantifikace proteinů

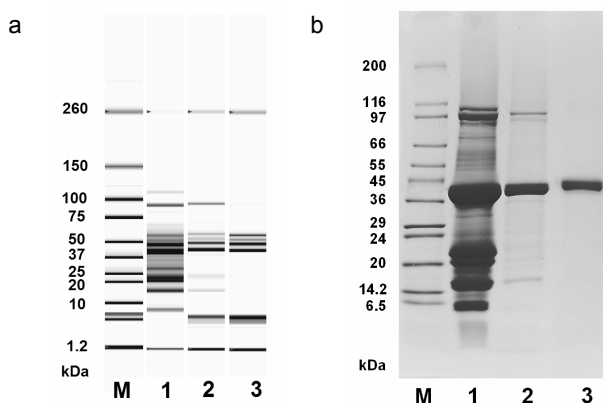
Mezi další uplatnění metody SDS-PAGE patří kvantifikace proteinů⁸. Možnosti metod používaných pro absolutní kvantifikaci proteinů např. UV spektroskopie při 280 nm nebo kolorimetrické techniky^{22,23} může tato separační metoda podstatně rozšířit o relativní a absolutní kvantifikaci konkrétního separovaného proteinu^{19,24}. Elektroforetické systémy založené na mikrofluidní technologii mohou tuto možnost také nabídnout a to v rychlejší a jednodušší podobě. Jako příklad zde uvádíme opět porovnání

Tabulka III

Porovnání SDS-PAGE a automatické čipové elektroforézy Experion při monitoringu relativního zastoupení patatinových proteinů v celkovém proteinu během jejich dvoustupňové chromatografické purifikace

Stupeň purifikace	SDS-PAGE		Experion	
	průměr [kDa] ^a	reprodukovatelnost RSD [%] ^b	průměr [kDa] ^a	reprodukovatelnost RSD [%] ^b
Vzorek 1 hlízová voda brambor (PFJ)	39,2 ± 2,2	5,7	38,6 ± 2,3	5,9
Vzorek 2 eluát po 1. stupni purifikace	86,0 ± 2,6	3,0	79,1 ± 0,6	0,8
Vzorek 3 eluát po 2. stupni purifikace	99,9 ± 0,1	0,1	98,5 ± 0,8	0,8

^a Průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD), ^b RSD – relativní směrodatná odchylka v % [(směrodatná odchylka / průměr)*100]



Obr. 6. Porovnání čipové elektroforézy Experion (a) a SDS-PAGE (b) při monitoringu dvoustupňové chromatografické purifikace patatinových proteinů z hlízové vody brambor; M – proteinový standard („Pro260 Ladder“ resp. „SigmaMarker™ – Wide Range“), 1 – výchozí stav, hlízová voda brambor, 2 – eluát z kolony s náplní DEAE 52 – Cellulose Servacel, 3 – eluát z kolony s náplní Con A–Sephrose 4B (purifikované patatinové proteiny)

účinnosti obou elektroforetických technik schopných analyzovat komplex SDS-protein (SDS-PAGE a systém Experion) při monitoringu purifikačního procesu skupiny patatinových proteinů. Ty se nacházejí v hlízách brambor ve velkém množství – běžně představují 20–40 % z celkového obsahu proteinů hlíz – a jsou proto považovány za hlavní zásobní proteiny hlíz brambor s MW kolísající v rozsahu 40–43 kDa v závislosti na stupni glykosylace. Úplná podstata fyziologické role těchto proteinů není plně objasněna, neboť vykazují i některé enzymové aktivity, zejména aktivitu nespecifické lipidové acylhydrolasy^{13,14}. Protože se jedná o proteiny s hodnotami isoelektrických bodů v rozmezí pH 4,6–5,2 (cit.¹³), byla v první fázi jejich

purifikace zvolena iontovýměnná adsorpce těchto proteinů spolu s dalšími kyselými proteiny na náplni slabého anexu DEAE 52 – Cellulose Servacel. Ve druhém stupni purifikace byl využit fakt, že patatin je glykoprotein, a proto byla využita afinitní chromatografie na sloupci s náplní Con A – Sepharose 4B s isokratickou elucí navázaných proteinů. Účinnost procesu v podobě změny relativního zastoupení cílových proteinů – patatinových hmotnostních isoform – lze sledovat na obr. 6 a v tab. III. Je patrné, že oba demonstované separační systémy dosáhly při stanovení relativního zastoupení patatinových proteinů (suma zastoupení jeho detegovaných hmotnostních isoform) podobných výsledků na všech třech hodnocených úrovních a bylo potvrzeno, že čistota purifikovaného komplexu patatinových proteinů je více než 98 %. Podobná byla i reprodukovatelnost stanovení (RSD) – u hlízové vody brambor (vzorek 1) byla 5,73 % v případě SDS-PAGE a 5,93 % v případě Experionu. Prakticky stejné hodnoty reprodukovatelnosti bylo dosaženo u vzorků 2 a 3 při analýze na systému Experion (0,81–0,83 %). V případě SDS-PAGE se hodnoty reprodukovatelnosti u vzorků 2 a 3 lišily. Z obr. 6 je zřejmé, že čipová elektroforéza Experion má lepší schopnost rozlišit jednotlivé hmotnostní isoformy patatinu (celkem 4 pruhy na gelu) než SDS-PAGE (pouze 1 pruh). Na druhé straně u SDS-PAGE odpovídala determinovaná MW patatinu jeho deklarované MW (40 až 43 kDa), kdežto u systému Experion byl zjištěn posun hodnot do oblasti 44–58 kDa. Systém automatické elektroforézy Experion je po kalibraci schopný určit také absolutní kvantifikaci separovaných proteinů¹⁷.

Závěr

V této studii byly testovány dvě elektroforetické techniky pro analýzu denaturovaných proteinů – tradiční metoda SDS-PAGE a automatická čipová elektroforéza Experion – z pohledu přesnosti a reprodukovatelnosti určení mo-

lekulové hmotnosti, rozlišení proteinů a odhadu relativního zastoupení cílového proteinu v průběhu purifikačního procesu.

Obě techniky poskytly podobné výsledky u hodnocených vzorků proteinů, technika automatické čipové elektroforézy Experion vykazovala vyšší hodnoty reprodukovatelnosti získaných dat. Je potřebné zdůraznit, že tato technika nabízí v porovnání s SDS-PAGE kratší dobu analýzy a v podstatě automatické vyhodnocení získaných dat, která jsou nabídnuta v podobě kompatibilní s běžným softwarem pro zpracování a úpravu dat. Významnou výhodou je rovněž velmi nízké množství analyzovaných vzorků a vyšší bezpečnost práce obslužného personálu, protože pro analýzu není potřebný toxický akrylamid v porovnání s přípravou gelů pro SDS-PAGE.

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu zemědělství ČR (projekt NAZV č. 1B44011) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (výzkumný záměr MSM 6007665806).

LITERATURA

- Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
- Westemeier R.: *Electrophoresis in Practice. A Guide to Theory and Practice*. 2. vyd. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1993.
- Makowski G. S., Ramsby M. L., v knize: *Protein structure* (Creighton T. E., ed.), kap. 1. Oxford University Press, New York 2002.
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- Weber K., Osborn M.: *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
- Andrews A. T.: *Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*. 2. vyd. Oxford University Press, New York 1993.
- Bollag D. M., Rozycki M. D., Edelstein S. J.: *Protein Methods*. 2. vyd. Wiley-Liss, New York 1996.
- Walker J. M., v knize: *The Protein Protocols Handbook* (Walker J. M., ed.), sv. 2, kap. 11. Humana Press, Totowa 2002.
- Garfin D. E., v knize: *Introduction to Biophysical Methods for protein and Nucleic Acid Research* (Glaser J. A., Deutscher M. P., ed.), kap. 2. Academic Press, San Diego 1995.
- Baines D., v knize: *Protein Purification Techniques. A practical Approach* (Roe S., ed.), kap. X. Oxford University Press, New York 2001.
- Grym J., Foret F.: *Chem. Listy* 99, 915 (2005).
- Chang B., Larson E., Whitman-Guliaev C.: *Bio-Rad bulletin* 5285. Bio-Rad Laboratories, Hercules 2006.
- Pots A. M.: *Dissertation*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1999.
- Bárta J., Čurn V.: *Chem. Listy* 98, 373 (2004).
- Hames B. D., Rickwood D.: *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1990.
- Zhu K., Strong W.: *Bio-Rad bulletin* 5328. Bio-Rad Laboratories, Hercules 2006.
- Zhu K., Nguyen M., Strong W., Whitman-Guliaev Ch.: *Bio-Radiations* 117, 22 (2005).
- Holzbecher Z., Churáček J.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha 1987.
- Janson J.-Ch., Rydén L.: *Protein Purification – Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, New York 1989.
- Bradová J., Matějová E.: *Chromatographia Suppl.* 67, S83 (2008).
- Uthayakumaran S., Listiohadi Y., Baratta M., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 44, 34 (2006).
- Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.: *Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).
- Smith B. J., v knize: *The Protein Protocols Handbook* (Walker J. M., ed.), sv. 2, kap. 29. Humana Press, Totowa 2002.

J. Bárta^a, V. Bártová^a, and V. Čurn^b (^a Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, ^b Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic): **Protein Analysis Using Automated Experion Chip Electrophoresis and Its Comparison with SDS-PAGE**

Two methods recommended for analysis of denatured proteins, automated Experion chip electrophoresis and SDS-PAGE, are compared. The Experion method is a novel technique based on combination of the LabChip microfluidic separation technique (Caliper Life Sciences) and sensitive fluorescent detection. Both methods were compared in molecular weight (MW) determination of a protein standard mixture, resolution of protein pairs of near molecular weights and estimation of the abundance of a target protein in the mixture to be purified. Both the methods are appropriate for MW determination and in purification of proteins. The accuracy of the methods is approximately the same (ca. 8%), but the Experion method shows better reproducibility (ca. 1.48%) than SDS-PAGE (ca. 2.17%).

STANOVENÍ TLOUŠŤKY OBALU TABLET BLÍZKOU INFRAČERVENOU SPEKTROSKOPIÍ

JAN MUSELÍK^a, KATEŘINA KREJČOVÁ^a,
MILOSLAVA RABIŠKOVÁ^a, ANNA
BARTOŠÍKOVÁ^a, MICHAELA DRAČKOVÁ^b
a LENKA VORLOVÁ^b

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ^b Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
muselikj@vfu.cz

Došlo 27.1.09, přijato 5.6.09.

Klíčová slova: blízká infračervená spektroskopie, farmaceutické aplikace, obalované tablety, tloušťka obalu

Úvod

Pro obalování perorálních lékových forem (tablet, tobolek, pelet) existuje celá řada důvodů – estetické¹ (zlepšení vzhledu, maskování nepříjemné chuti a zápachu, snadnější aplikace), identifikační^{2,3}, technologické^{1,4} (zajištění stability přípravku, mechanické odolnosti, oddělení inkompatibilních složek, ochrana léčiva před kyselým prostředím žaludku) a zejména důvody terapeutické. Vhodným obalem lze zajistit absorpci léčivé látky až ve střevním traktu⁵, její uvolňování z lékové formy v daném časovém intervalu⁶, či její cílené směřování do určité části střeva. Výhodami obalených přípravků s řízeným uvolňováním jsou snižena frekvence dávkování léku, redukce výkyvů plazmatické hladiny léčiva, menší výskyt nežádoucích účinků a s tím související zlepšená spolupráce pacienta⁷. Uvolňování léčivé látky z obalených přípravků řídí jak složení obalu, tak i jeho tloušťka.

Ke stanovení tloušťky obalu tablet se ve farmaceutické technologii využívá celá řada postupů. Tyto postupy zahrnují přímé mikroskopické stanovení, sledování hmotnostního přírůstku obalovaných tablet, analytické stanovení některé složky obalu (např. kapalinovou chromatografií). V některých případech je možné sledovat kvalitu obalu zkouškou disoluce. Všechny uvedené techniky jsou však časově náročné, což vede ke snížení kapacity a efektivity výroby a ke zvýšení provozních nákladů při výrobě obalovaných tablet. Snaha zajistit požadovanou kvalitu produktů a umožnit monitorování výrobních procesů vede farmaceutický průmysl k zavádění nových analytických metod⁸. NIR spektroskopie patří mezi tzv. procesní analytické metody, u kterých se klade důraz na rychlost analýzy

včetně možnosti kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu. Při porovnání s běžně používanými postupy nabízí NIR spektroskopie mnoho výhod: spektrum může být zaznamenáno v několika málo sekundách, charakter analýzy je nedestruktivní, nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku a v mnoha případech připouští opětovné použití již proměřených vzorků. Nevýhodou NIR spektroskopie je silný překryv absorpčních pásů, a proto musí být kalibrační algoritmus vytvořen pomocí chemometrických metod⁹. Na druhou stranu jednou vytvořená metoda je snadno aplikovatelná a poskytuje velmi rychle výsledky, a to i pro několik parametrů najednou¹⁰.

V literatuře je doposud uvedeno jen několik prací zabývajících se stanovením množství polymerního materiálu naneseného na jádra tablet^{11,12} nebo pelet¹³. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu, která by byla schopna spolehlivě stanovit průměrnou tloušťku polymerního obalu naneseného na jedné tabletě. Do kalibrační sady byly navíc zahrnuty dvě nezávislé připravené skupiny vzorků tak, aby byla popsána i variabilita výrobního procesu a tím ověřena možnost praktického využití NIR spektroskopie v kontrole procesu obalování ve farmaceutickém průmyslu.

Experimentální část

Výroba obalených tablet

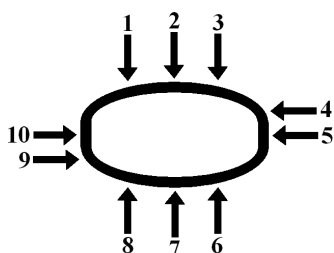
Pro přípravu tabletoviny byly použity mikrokrytická celulóza (Avicel[®] PH 101, Mingtai Chemical, Taiwan), hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát (Emcompress[®], Penwest Pharmaceuticals Co., Velká Británie), povidon (Kollidon[®] 25, BASF, Německo) a stearan horečnatý (RNDr. Jan Kulich, Česká republika). Z připravené tabletoviny se lisovaly tablety tvaru čočky na výstředníkovém tabletovacím lisu Korsch (EKO Korsch Pressen, Německo) s použitím razidel o průměru 10 mm. Hmotnost tablet byla nastavena přibližně na 0,450 g. Při zvolené lisovací síle 17 550 N byla pevnost tablet okolo 100 N.

K obalování se použila hypromelosa (Pharmacoat[®] 606, Schin-Etsu, Japonsko) ve formě 7,5% vodného roztoku. Dalšími složkami roztoku bylo 0,8 % makrogolu 400 (Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko) a 0,05 % barviva (methylrosanilinium chlorid, Lachema, Česká republika). Předehřátá jádra tablet (60 °C) byla obalena v laboratorním obalovacím bubnu CL 200 (Medipo Z.T., s.r.o., Česká republika). Roztok polymerního filmu byl do systému přiváděn peristaltickou pumpou rychlostí 50 g min⁻¹ pod tlakem 80 kPa a při teplotě 45 ± 3 °C. Obalené tablety byly následně sušeny 10 min při teplotě 50 ± 2 °C. Nástřikem odpovídajícího množství roztoku použitého k obalování (200–1100 gramů) bylo vyrobeno deset šarží (označení vzorků 1_200 až 1_1100) obalených tablet s teoretickým hmotnostním podílem obalu 3,2–15,5 %. S cílem postihnout variabilitu výrobního procesu byl celý postup zopakován a bylo připraveno dalších deset šarží obalených tablet (označení vzorků 2_200 až 2_1100). Obalené tablety byly

ponechány před dalším testováním 48 h v polyethylenovém sáčku při laboratorní teplotě.

Stanovení referenční tloušťky obalu

Tloušťka nanoseného obalu byla měřena optickým stereomikroskopem (STM902, Lambda, Česká republika) propojeným pomocí CCD videokamery (Alphaphot, Nikon, Japonsko) s počítačem. Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno programem Ia 32 (Leco Instruments, USA) umožňujícím přímé měření vzdáleností. U pěti náhodně vybraných tablet z každé šarže byla měřena tloušťka obalu na řezu podle schématu uvedeném na obr. 1 a výsledky pro každou tabletu byly vyjádřeny jako průměr z deseti měření.



Obr. 1. Schéma mikroskopického měření tloušťky obalu (počet měření $n = 10$)

NIR spektroskopie

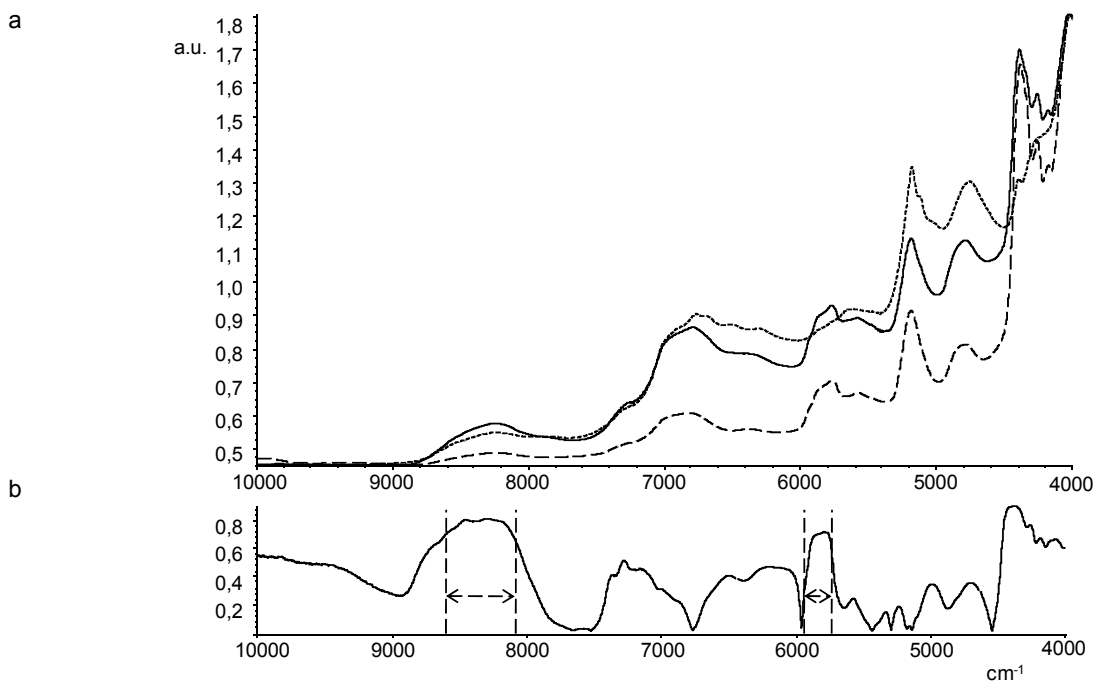
NIR spektra byla měřena v režimu difuzní reflektance na spektrometru FT-NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, USA) vybaveného integrační sférou. Vzorke byly vkládány do držáku tablet a měřená spektra byla zaznamenána v rozsahu vlnočtů $4\,000\text{--}10\,000\text{ cm}^{-1}$. U každého vzorku tablety bylo nasnímáno 100 spekter, a to pro obě strany tablety a pro následné vyhodnocení bylo použito spektrum průměrné. Celkový čas měření jedné tablety byl přibližně 3 min. Naměřená data byla zpracována počítačovým programem TQ Analyst verze 6.2.1.509 (Thermo Nicolet Corporation, Inc., USA).

Výsledky a diskuse

Vývoj kalibračního modelu

Hlavním krokem stanovení NIR spektroskopii je vytvoření kalibračního modelu, který je rozhodující v kvantitativní NIR spektroskopii¹⁴. Vytvoření kalibračního modelu zahrnuje výběr reprezentativní sady kalibračních vzorků, nasnímání spekter a stanovení referenčních hodnot u těchto vzorků, nalezení kalibračního algoritmu a následně validaci vytvořeného modelu¹⁵.

V prvním kroku vytvoření kalibračního modelu byla vyrobena sada referenčních vzorků obalených tablet. Ka-



Obr. 2. a) NIR spektra obalené tablety (—), polymerního filmu (---) a jádra tablety (···); b) míra korelace mezi změnami tloušťky obalu a změnami v intenzitě absorpce v závislosti na vlnočtu s vyznačením vybraných oblastí použitých při výpočtu algoritmu PLS (---)

Tabulka I
Tloušťky obalu tablet zjištěné mikroskopickou analýzou

Šarže	Tloušťka obalu [μm] ^a				
	tableta 1	tableta 2	tableta 3	tableta 4	tableta 5
1_200	22,8 ± 5,2	30,3 ± 5,0	29,6 ± 6,6	26,7 ± 7,5	26,0 ± 3,0
2_200	28,7 ± 4,5	27,3 ± 3,6	27,4 ± 3,8	27,3 ± 3,0	28,2 ± 4,2
1_300	30,5 ± 6,5	31,1 ± 4,5	38,1 ± 5,6	38,1 ± 5,6	34,5 ± 4,6
2_300	35,3 ± 3,9	34,1 ± 3,3	38,7 ± 5,0	41,8 ± 9,1	35,2 ± 3,9
1_400	44,7 ± 10,9	42,6 ± 7,5	42,8 ± 9,5	43,8 ± 8,6	43,4 ± 6,9
2_400	50,7 ± 18,2	52,8 ± 11,0	51,3 ± 11,2	48,6 ± 8,0	47,9 ± 8,5
1_500	63,5 ± 9,7	66,7 ± 10,4	60,9 ± 10,3	68,1 ± 6,8	63,4 ± 7,9
2_500	67,4 ± 17,9	60,6 ± 8,2	62,9 ± 8,9	64,1 ± 7,8	64,7 ± 8,8
1_600	67,3 ± 12,5	77,4 ± 11,5	69,9 ± 10,0	72,6 ± 10,8	77,8 ± 10,3
2_600	71,7 ± 11,8	67,4 ± 16,0	66,5 ± 13,0	71,0 ± 5,6	74,3 ± 11,5
1_700	81,6 ± 12,2	79,3 ± 8,1	80,1 ± 10,3	84,7 ± 10,4	83,3 ± 10,7
2_700	87,9 ± 14,7	82,7 ± 17,1	92,1 ± 38,1	92,0 ± 8,0	98,5 ± 16,2
1_800	79,9 ± 10,5	94,3 ± 10,2	107,1 ± 7,8	95,3 ± 8,4	94,4 ± 9,5
2_800	92,6 ± 10,6	102,3 ± 12,1	90,9 ± 16,7	100,5 ± 11,7	92,6 ± 15,7
1_900	102,6 ± 12,0	104,7 ± 11,0	94,8 ± 10,3	104,2 ± 9,9	99,1 ± 9,1
2_900	107,4 ± 15,4	111,0 ± 17,6	94,1 ± 10,8	105,4 ± 19,7	99,8 ± 18,8
1_1000	108,1 ± 12,9	118,1 ± 14,3	116,7 ± 12,4	116,2 ± 17,3	116,1 ± 12,5
2_1000	115,8 ± 23,9	99,4 ± 30,6	110,8 ± 11,3	113,9 ± 16,8	109,4 ± 11,5
1_1100	131,7 ± 14,9	119,1 ± 12,6	126,3 ± 11,6	134,6 ± 13,7	118,2 ± 11,7
2_1100	121,2 ± 24,5	107,8 ± 9,0	123,0 ± 17,5	124,7 ± 17,2	129,2 ± 17,2

^a Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z 10 měření ± směrodatná odchylka

librační sada zahrnovala 100 obalených tablet (5 tablet z každé z 20 vyrobených šarží) s tloušťkou polymerního filmu v rozmezí přibližně 25–125 μm . Referenční hodnoty tloušťky polymerního filmu obalených tablet byly stanoveny mikroskopickou analýzou a jsou uvedeny v tab. I.

Vzhledem k velkému množství vícekvantových přechodů (overtónů) a kombinačních vibrací jsou spektra v NIR oblasti málo charakteristická a můžeme pozorovat pouze obalovou křivku těchto absorpčních čar. Pro získání analyticky významných informací z NIR spekter je proto nutné použít metody matematické statistiky – chemometrie¹⁵. V této práci byl kalibrační model zkonstruován algoritmem PLS, přiřazením referenční hodnoty tloušťky obalu ke každému spektru a zadáním těchto dat do programu TQ Analyst. Rozsah vlnočtů vhodných pro výpočet kalibračního modelu byl hodnocen na základě pozorování změn intenzity absorpčních pásů ve spektrech tablet s různým množstvím naneseného polymerního obalu (obr. 2). Kalibrační proces umožňuje nalézt pro každý vlnočt míru korelace mezi změnami tloušťky obalu a změnami v intenzitě absorpce. Pro kalibrační model byly vybrány ty oblasti vlnočtů, ve kterých vykazovaly změny v intenzitách absorpčních pásů významnou korelaci v závislosti na změnách tloušťky obalu. Vybrané oblasti použité v kalibračním mo-

delu byly 5681–5926 cm^{-1} a 8040–8802 cm^{-1} (obr. 2) a při rozlišení 4 cm^{-1} obsahovaly 251 datových bodů. Za absorpci NIR záření obalenými tabletami v těchto oblastech vlnočtů zodpovídají zejména skupiny $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ a $>\text{CH}-$ (C–H první a druhý overtone).

Charakteristiky kalibračního modelu

Kvalita vyvinutého kalibračního modelu byla ověřena porovnáním referenčních hodnot tloušťky obalu s hodnotami vypočítanými algoritmem PLS, vyjádřením chyby kalibračního modelu (RMSEC), počtem odlehklých standardů a počtem faktorů PLS. Zjištěná korelační rovnice ve tvaru: predikovaná tloušťka Y (μm) = absolutní člen + směrnice \times referenční tloušťka X (μm) byla $Y = 1,964 + 0,975 \times X$ ($R^2 = 0,975$). Interval spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,943–1,007) zahrnoval hodnotu 1, což ukázvalo na nepřítomnost systematické chyby v kalibračním modelu. Interval spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro absolutní člen (–0,715 až 4,643) zahrnoval hodnotu 0, nenulový absolutní člen tudíž nebyl prokázán. Nalezená hodnota chyby kalibračního modelu RMSEC byla 4,9 μm .

Pro nalezení statisticky významně odlehklých standar-

du byl použit výpočet Mahalanobisovy vzdálenosti, která je vyjádřením odlišnosti mezi průměrným spektrem a spektrem každého kalibračního standardu. Pro posouzení, zda je odlišnost významná, byl použit Chauvenetův test. V naší kalibrační sadě nebyly odlehle standardy nalezeny.

Faktory PLS použité v kalibračním modelu zahrnují spektrální a současně koncentrační informace. Každý faktor reprezentuje nezávislý zdroj proměnlivosti v kalibračních datech. První faktor popisuje nejvíce variability kalibračních standardů a každý další faktor popisuje většinu ze zbývající variability. Význam každého dalšího faktoru PLS postupně klesá a je třeba počítat s tím, že vysoký počet faktorů PLS může zahrnovat variabilitu šumu a nemá pro analýzu význam¹⁵. Zvolený počet faktorů PLS v kalibračním modelu byl 6, což značilo nízké riziko modelování šumu měření z důvodu zahrnutí příliš mnoha komponent do modelu.

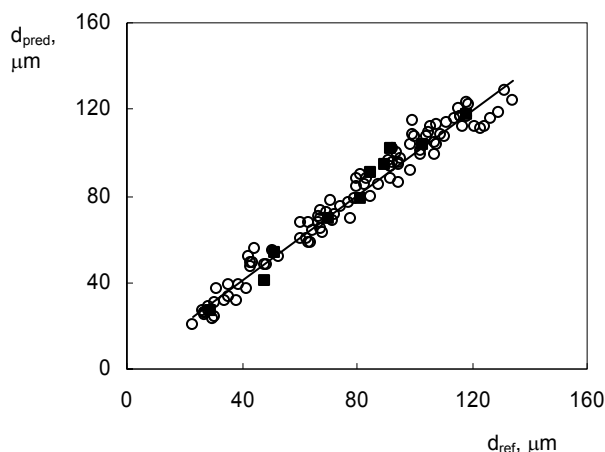
Opakovatelnost měření

Vliv náhodných proměnných na přesnost měření byl testován desetkrát opakovaným měřením NIR spekter náhodně vybraného vzorku obalené tablety z kalibrační sady (šarže 1_1000). Naměřená tloušťka polymerního obalu \pm interval spolehlivosti ($\alpha = 0,05$; počet měření $n = 10$) byla $108,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Relativní směrodatná odchylka těchto výsledků byla 0,27 %, což je výrazně méně, než je obvykle akceptovaná hodnota 1 % (cit.¹⁶). Opakovatelnost měření NIR spekter byla prokázána. Vliv náhodných proměnných (např. umístění tablety tvaru čočky v držáku tablet) nemá významný vliv na přesnost stanovení tloušťky polymerního filmu, protože zjištěný interval spolehlivosti byl řádově menší než chyba kalibračního modelu.

Validace kalibračního modelu

Pro ověření spolehlivosti kalibračního modelu byly použity křížová a externí validace. Při křížové validaci byla použita stejná sada vzorků jako při kalibraci. Křížová validace (leave-one-out) byla provedena vyloučením vždy jednoho ze standardů a ze zbylých kalibračních dat byl sestaven nový model, který byl použit pro kvantifikaci vyloučeného standardu¹⁷. Následně byla z regresní analýzy vypočítána korelační rovnice křížové validace a dále byla vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV). Zjištěná korelační rovnice popisující vztah mezi algoritmem PLS, predikovanou tloušťkou obalu a referenční tloušťkou obalu ve tvaru: predikovaná tloušťka Y (μm) = absolutní člen + směrnice \times referenční tloušťka X (μm) byla $Y = 1,893 + 0,975 \times X$ ($R^2 = 0,970$). Intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,942–1,009) a pro absolutní člen (–0,913 až 4,698) zahrnovaly hodnotu 1, resp. 0. Chyba zjištěná při křížové validaci byla 5,4 μm .

Externí validace byla provedena se sadou deseti vzorků obalených tablet (s tloušťkou polymerního obalu 29 až 119 μm) neobsažených v kalibrační sadě. Tyto vzorky



Obr. 3. Srovnání tloušťek obalu získaných referenční metodou (d_{ref}) a predikovaných (d_{pred}) při křížové (○) a externí (■) validaci

byly vyhodnoceny pomocí vyvinutého kalibračního modelu a výsledky byly porovnány s hodnotami získanými referenční metodou, podobně jako při křížové validaci (obr. 3). Nalezená rovnice korelace mezi predikovanými a referenčními daty byla: $Y = -4,898 + 1,075 \times X$ ($R^2 = 0,976$). Intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,939–1,212) a pro absolutní člen (–15,970 až 6,174) zahrnovaly hodnotu 1, resp. 0. Chyba zjištěná při externí validaci (RMSEP) byla 4,8 μm .

Správnost metody

Správnost byla vyjádřena jako průměrná výtěžnost vypočítaná porovnáním výsledků referenční metody (mikroskopická analýza) a výsledků predikovaných při křížové a externí validaci¹⁶. Průměrná výtěžnost a její interval spolehlivosti byly při křížové validaci $100,04 \pm 1,63$ % ($\alpha = 0,05$; $n = 100$) a při externí validaci $99,83 \pm 4,73$ % ($\alpha = 0,05$; $n = 10$). Výsledky predikované při křížové a externí validaci byly dále statisticky porovnány s výsledky referenční metody. Na základě párového t-testu ($\alpha = 0,05$) bylo prokázáno, že rozdíly mezi referenčními a predikovanými hodnotami nejsou statisticky významné.

Závěr

Byla vyvinuta a validována metoda pro off-line stanovení tloušťky polymerního obalu tablet. Dosažené výsledky prokázaly, že kvantitativní NIR spektroskopie je spolehlivou a rychlou metodou při stanovení tloušťky obalu. Tato metoda je použitelná jako jedna z procedur kontroly kvality obalených tablet ve farmaceutické technologii. Při

analýzách není vyžadována žádná úprava vzorku, doba trvání jedné analýzy je přibližně 3 min na rozdíl od běžných metod, které jsou časově náročnější.

LITERATURA

- Chisholm B. J., Stafslie S. J., Christianson D. A., Gallagher-Lein C., Daniels J. W., Rafferty C., Vander W. L., Webster D. C.: *Appl. Surf. Sci.* 254, 692 (2007).
- Pandey P., Turton R., Joshi N., Hammerman E., Ergun J.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7, 4 (2006).
- Krejčová K., Rabišková M., Vetchý D., Tomášek V., Prokopová A.: *Čes. Slov. Farm.* 56, 190 (2007).
- Levina M., Cunningham C. R.: *Pharm. Techn. Eur.* 17, 29 (2005).
- Siepmann F., Siepmann J., Walther M., Macrae R. J., Bodmeier R.: *J. Control. Release* 125, 1 (2008).
- Bose S., Bogner R. H.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 8, 57 (2007).
- Rabišková M., Fričová V.: *Praktické Lékárenství* 4, 186 (2008).
- Fitzgerald A. J., Cole B. E., Today P. F.: *J. Pharm. Sci.* 94, 177 (2005).
- Luypaert J., Massart D. L., Heyden Y. V.: *Talanta* 72, 865 (2007).
- Azzouz T., Tauler R.: *Talanta* 74, 1201 (2008).
- Andersson M., Josefson M., Langkilde F. W., Wahlund K. G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 27 (1999).
- Kirsch J. D., Drennen J. K.: *Pharm. Res.* 13, 234 (1996).
- Andersson J., Folestad S., Gottfries J., Johansson M. O., Josefson M., Wahlund K. G.: *Anal. Chem.* 72, 2099 (2000).
- Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Pagès J.: *Anal. Chim. Acta* 384, 207 (1999).
- Reich G.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 1109 (2005).
- Laasonen M., Harmia-Pulkkinen T., Simard C., Räsänen M., Vuorela H.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 493 (2004).
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., Jong S., Smeyers-Verbeke J., v knize: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* (Vandeginste B. G. M., Rutan S. C., ed.), kap. 10. Elsevier, Amsterdam 1997.

J. Muselík^a, K. Krejčová^a, M. Rabišková^a, A. Bartošiková^a, M. Dračková^b, and L. Vorlová^b (^a Department of Pharmaceutics, ^b Institute of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic): **Determination of the Thickness of Tablet Coating by Near-Infrared Spectroscopy**

The aim of this study was to develop a fast and reliable method for determination of tablet coating thickness. Tablets were coated with polymeric Pharmacoat[®] 606 in a laboratory coater. The coating thickness was measured by near-IR absorption of the coating material using calibration. The calibration and validation results afforded the following parameters: determination coefficient $R^2 > 0.97$, the number of factors 6 and the standard error of cross-validation 5.4 μm at the coating thickness 25–125 μm . The obtained results confirmed suitability of the method for evaluation of coating quality.

UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLIN-ESTERAS PŘI *IN VIVO* HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ

JANA ŽDÁROVÁ KARASOVÁ^a, KAMIL KUČA^{a,b}, DANIEL JUN^{a,b} a JIŘÍ BAJGAR^a

^a Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové,

^b Centrum pokročilých studií, vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
karasova@pmfhk.cz

Došlo 13.10.08, přepracováno 10.2.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Ellmanovo činidlo, reaktivátory, tabun, cyklosarin, acetylthiocholin

Úvod

Inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasy (BChE; EC 3.1.1.8) je v současnosti považována za hlavní mechanismus toxického účinku organofosfátových inhibitorů. Inhibice těchto enzymů má za následek změny v mnoha důležitých tělesných funkcích^{1,2}. Znalost aktuálního stavu aktivity cholinesteras v organismu je klíčová pro včasnou diagnózu intoxikace organofosforovými inhibitory (OFI) a také pro sledování účinnosti podané terapie, hlavně pak reaktivátorů AChE². Nejčastěji je pro toto stanovení využívána erytrocytární AChE, jelikož je dobře dostupná a míra její inhibice velmi dobře koresponduje se závažností otravy³.

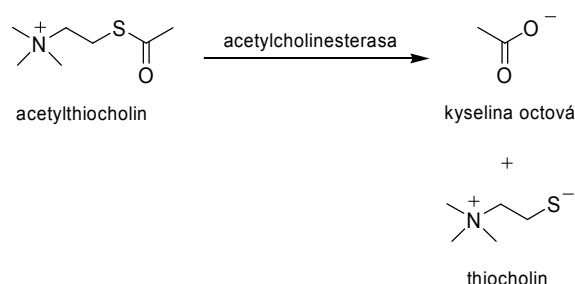
Existuje mnoho metodik, jež byly pro stanovení aktivity cholinesteras vyvinuty, mezi nejčastěji používané jsou řazeny metody elektrometrické⁴, titrační⁵, kolorimetrické⁶, měření změny pH s využitím indikátoru⁷, spektrofotometrické^{8,9}, fluorimetrické¹⁰, radiometrické¹¹, polarografické¹² a enzymové¹³. Výše uvedené metody však nemohou být zavedeny do rutinní praxe z mnoha důvodů, zvláště pak náročné úpravy vzorku, dlouhé doby měření nebo nedostatečné specifity enzymu k substrátu¹⁴.

Velmi citlivá a pro běžné využití vhodná metoda byla popsána Ellmanem¹⁵. Tato kolorimetrická metoda je dnes zavedena do praxe k hodnocení zdravotního stavu lidí, kteří běžně přichází do styku s organofosforovými inhibitory (pracovníci v průmyslu a zemědělství)^{16,17}.

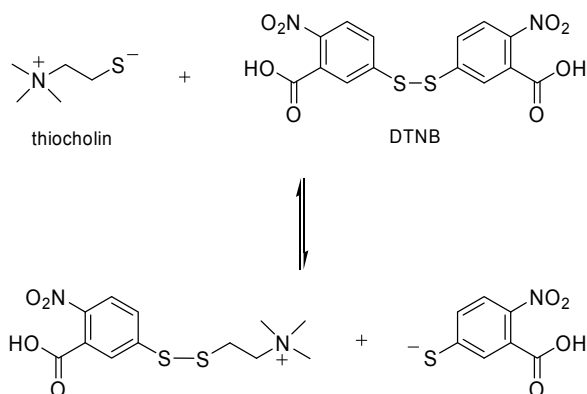
Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BChE). Po enzymové hydrolýze je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule skupinu SH je detegován pomocí 5,5'-dithiobis-2-

-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) tím, že po reakci s thiocholinem dochází k uvolnění 5-merkapt-2-nitrobenového aniontu (TNB⁻) (obr. 1, 2 a 3). Tento anion je pak detegován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. Tato metoda je v dobré korelaci s ostatními výše uvedenými postupy⁴⁻¹⁴.

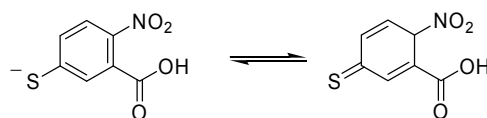
Ačkoliv je Ellmanova metoda rychlá, jednoduchá a levná, má také své nevýhody. Velmi zásadní při měření aktivity cholinesteras v krvi je interference s hemoglobinem. Absorpční maximum barevného indikátoru TNB⁻ (5-merkapt-2-nitrobenzoátového aniontu) je 412 nm. Při této vlnové délce však absorbuje záření také v krvi přítomný hemoglobin¹⁸. Pokud chceme vyloučit takto vzniklou chybu, je potřeba krevní vzorek hodně



Obr. 1. Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholin



Obr. 2. Štěpení DTNB a vznik chromoforu



Obr. 3. Přechod chromoforu na formu, která je fotometrována

ředit. Dalším problémem je pak reakce Ellmanova činidla (DTNB) s pomalu reagujícími sulphydrylovými skupinami v roztoku, jež mohou ovlivnit výsledky měření¹⁹.

Tyto nedostatky vedly k mnoha modifikacím původní Ellmanovy metody. Ve snaze o snížení interference s hemoglobinem byly na některých světových pracovištích použity k měření odlišné vlnové délky²⁰, dvoupráskové spektrofotometry nebo jiné chromogenní disulfidy, např. 4,4'-dithiopyridin^{21,22}. Jinou možností, jak zlepšit stanovení AChE v krvi, je použití selektivních inhibitorů BChE, jako jsou quinidin ((2-ethenyl-4-azabicyclo(2,2,2)oct-5-yl)-(6-methoxyquinolin-4-yl)-methanol)²³ nebo fenothiazinové deriváty^{24,25}.

Další možností je sledování změny aktivity BChE, které se používá v běžné medicíně²⁶ a klinické toxikologii^{27,28,29}. Tyto diagnózy intoxikace OFI pomocí BChE je používána v praxi při automatickém stanovování aktivity cholinesteras v klinické chemii. Stále se však objevují dohady, zda změna aktivity BChE dokáže přesně indikovat také změnu aktivity synaptické AChE³⁰.

Cílem této práce je sledovat změny aktivit cholinesteras v krvi a plasmě. Určit změny aktivit těchto enzymů po intoxikaci dvou organofosforových inhibitorů (cyklosarin a tabun) a zároveň sledovat terapeutický efekt reaktivátorů. V této studii je hodnocena reaktivační účinnost dvou reaktivátorů – v terapii běžně užívaného obidoximu (1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)2-oxapropanodichlorid) a nově připraveného oximu K 203 ((E)-1-(4-karbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-en dibromid).

Experimentální část

Chemikálie

Organofosforové inhibitory tabun a cyklosarin o čistotě ~ 98 % byly získány z institutu VTUO Brno (Česká republika) a skladovány ve skleněných ampulích po 0,3 ml. Roztoky inhibitorů použitých ve studii byly připraveny těsně před použitím. Oximy obidoxim a K 203 byly připraveny na Katedře toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví (Hradec Králové, Česká republika)³¹. Ostatní chemikálie čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

Zvířata

Samci potkanů kmene Wistar o váze 180–200 g (BioTest; Konarovice, Česká republika). Zvířata byla udržována v klimatizované místnosti (stálá teplota 22 ± 2 °C, vlhkost 50 ± 10 %, světelný cyklus 12 h světlo/tma), krmena byla standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*. Experiment byl pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.

Experiment *in vivo*

Atropin v terapeutické dávce (21 mg kg^{-1}) byl i.m. aplikován v kombinaci s reaktivátorem (obidoxim, K 203) 5 min před intoxikací. Otravné látky v dávkách odpovídajících 1 LD₅₀ byly aplikovány do svalu pravého zadního stehna zvířete. Kontrolní skupině byl podán atropin v terapeutické dávce a za 5 min byl i.m. aplikován fyziologický roztok.

Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 min po intoxikaci otravnými látkami, jako anestézie byl použit CO₂. Po dekapitaci byla odebrána hrdelní krev do zkumavek se standardním množstvím heparinu. Aktivita AChE byla stanovena ihned po odběru krve. Krev byla nejprve hemolyzována v 0,02 M Tris-puftru (pH 7,6) v poměru 1:20 (krev/puftr) po dobu 5 min.

Stanovení enzymové aktivity AChE

Aktivita AChE byla stanovována v nesrážlivé krvi v den odběru vzorků. Krev byla nejprve hemolyzována přidáním 0,02 M Tris-puftru o pH 7,6 v poměru 1:20. Hemolýza je kompletní po uplynutí 4minutového intervalu od přidání puftru. Měření aktivity enzymu AChE uvolněného z povrchu a vnitřního obsahu erytrocytů pak probíhal následovně: do kyvety byl pipetován roztok DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) v 0,1 M Tris-puftru o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána hemolyzovaná krev (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním substrátu specifického pro AChE, ATCh (0,2 ml). Aktivita enzymu byla měřena při 37 °C.

Pro stanovení aktivity AChE byla využita standardní spektrofotometrická metoda dle Ellmana¹⁵, byla modifikována vlnová délka na 436 nm tak, aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobinem. Pro stanovení absorbance byl použit Spektrofotometr Helios Alpha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie). Výsledky byly vyhodnoceny v jednotkách $\mu\text{kat ml}^{-1}$.

Stanovení enzymové aktivity BChE

Část nesrážlivé plné krve byla v den odběru odstředěna za stálé teploty 15 °C a při 3000 otáčkách/min po dobu 10 min. Plasma byla odebrána do mikrozkušavek a uchovávána při teplotě -80 °C (při této teplotě je zaručeno zachování stálé aktivity enzymů po dobu několika měsíců) až do dne, kdy byla ve vzorcích stanovována aktivita BChE. Před stanovováním BChE v plasmě je vhodné ustálit aktivitu enzymu přes noc při teplotě $+4$ °C (lednice) a 2 h při teplotě laboratorní.

Do kyvety byl pipetován roztok DTNB v 0,1 M Tris-puftru o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána plasma (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním substrátu specifického pro BChE, BTCh (0,2 ml). Aktivita enzymu byla měřena při 37 °C.

Pro stanovení aktivity BChE byla využita taktéž standardní spektrofotometrická metoda dle Ellmana¹⁵

s modifikovanou vlnovou délkou. Výsledky byly vyhodnoceny v jednotkách $\mu\text{kat ml}^{-1}$.

Kalibrace

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1 : 1 (koncentrovanější roztok cysteinu : destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž základní roztok je $0,2 \mu\text{M}$.

Pro kalibraci se do kyvety místo hemolyzátu krve nebo plasmy pipetuje stejný objem ($0,1 \text{ ml}$) roztoku cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB ($1,7 \text{ ml}$) v pufru a reakce se odstartuje přidáním $0,2 \text{ ml}$ příslušného substrátu (ATCh, BTCh). Absorbance vzorku se měří při 436 nm . Kalibrace se měří proti slepému vzorku, v něm je hemolyzátní nebo plasma (cystein) nahrazena destilovanou vodou.

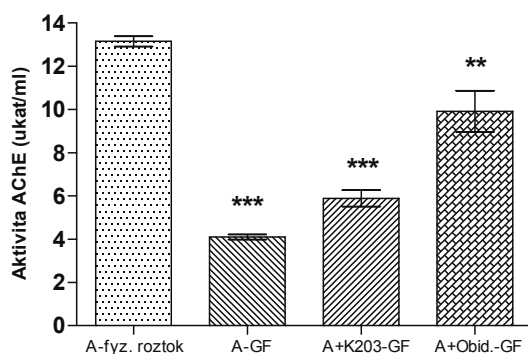
Statistické hodnocení

Počet zvířat ve skupině byl 6. Aktivity enzymu v krevním hemolyzátu byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka, pro zjištění statisticky významné změny mezi jednotlivými skupinami byl použit t-test.

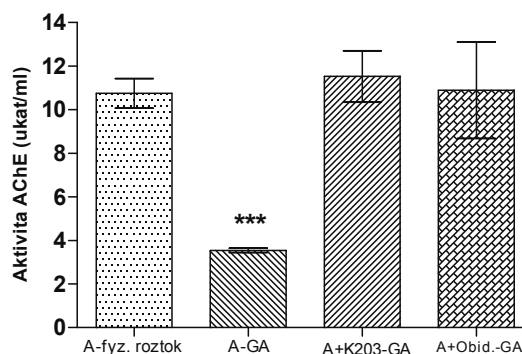
Výsledky a diskuse

Z výsledků vyplývá, že obě nervově paralytické látky způsobily výrazný pokles aktivit cholinesteras, po podání 1 LD_{50} cyklosarinu byl zaznamenán pokles aktivity AChE na 34 % a BChE na 23 % vzhledem k původní aktivitě (obr. 4 až 7). Po podání stejné dávky tabunu došlo také k výraznému snížení aktivit, a to na 38 % u AChE a 17 % u BChE (obr. 5 a 7).

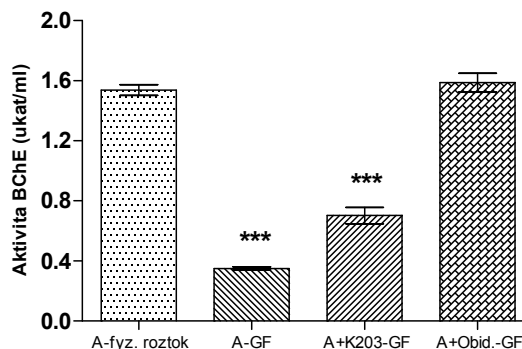
Při intoxikaci cyklosarinem došlo po podání reaktivá-



Obr. 4. Změna aktivit AChE v krvi po podání 1 LD_{50} cyklosarinu (GF), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim



Obr. 5. Změna aktivit AChE v krvi po podání 1 LD_{50} tabunu (GA), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

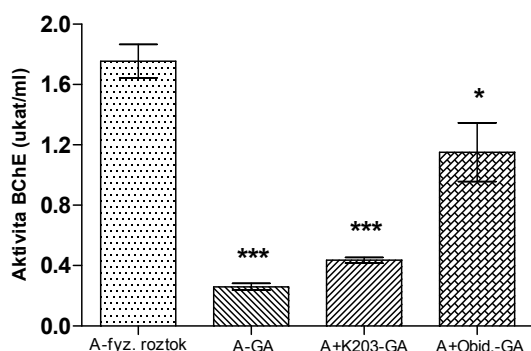


Obr. 6. Změna aktivit BChE v plasmě po podání 1 LD_{50} cyklosarinu (GF), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

torů k zlepšení klinického stavu. Zvýšení aktivity AChE nebylo po podání jednotlivých oximů srovnatelné (obr. 4), lepší výsledek vykázal obidoxim, který reaktivoval enzym na hodnotu 74 % vzhledem k aktivitě AChE kontrolní skupiny. Při sledování změn v aktivitě BChE byl také zaznamenán podobný průběh reaktivity. Zde prokázal výrazně lepší reaktiváční účinnost také obidoxim, došlo k úplné reaktivaci BChE. Po podání nově syntetizovaného oximu K203 bylo zaznamenáno dvojnásobné navýšení aktivity oproti skupině, již nebyla podána terapie (obr. 6).

Reaktivace enzymu AChE byla lepší po intoxikaci tabunem. Zde došlo k nárůstu aktivity AChE po podání reaktivátoru K 203 i obidoximu až na původní hodnoty vzhledem ke skupině, jež nebyla intoxikována (obr. 5). Naproti tomu lepší reaktivace BChE v plasmě byla zaznamenána po podání obidoximu (obr. 7).

Jak již bylo uvedeno v úvodu, největší nevýhodou stanovení aktivit cholinesteras v krvi je interference



Obr. 7. Změna aktivit BChE v plasmě po podání 1 LD₅₀ tabunu, terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

s hemoglobinem, jehož absorpční maximum se shoduje se vznikajícím barevným indikátorem. Tuto interferenci jsme v experimentu omezili dvěma způsoby, a to: přípravou hemolyzátu plné krve, kde byla krev ředěna 1 : 20 a zároveň byla upravena vlnová délka stanovení na 436 nm. Při této vlnové délce je absorbance hemoglobinu snížena asi na 1/4 hodnoty absorbance při vlnové délce 412 nm (cit.¹⁴).

AChE se nachází nejen v matrix erytrocytů, ale je také zabudována do jejich buněčné membrány³². Pro stanovení přesné aktivity AChE a snížení interferenci s plasmatickou BChE je nutné promýt erytrocyty pufr. Pro výplach je vhodné použít pufr, jež není k erytrocytárním buňkám agresivní (při hemolýze by došlo k uvolnění AChE do vyplachovacího pufru) a má vyváženou osmolalitu, z tohoto důvodu není možné k výplachu zbytkové plasmu použít 0,1 M Tris pufr o pH 7,6, který se používá při samotném stanovení. Mnohem výhodnější je použití 0,1 M fosfátového pufru o fyziologickém pH (pH 7,6). Další možností, jak snížit interferenci s BChE, je využití selektivních inhibitorů BChE (ethopropazin), které mají minimální vliv na hodnotu aktivity stanovené AChE³³.

Pro lepší uvolnění AChE z erytrocytů je přidáváno minimální množství tenzidu Tritonu X-100, který zlepšuje hemolýzu krevních buněk. Pro hemolýzu používáme roztoky o velmi nízkých koncentracích Tritonu (0,01 %), protože vyšší koncentrace ovlivní výsledek měření¹⁴.

Udržení stabilního pH po dobu měření aktivit cholinesteras je velmi důležité, protože enzymová hydrolyza substrátů (ATCh, nebo BTCh) používaných při tomto stanovení je závislá na pH. Při pH 7,6–7,8 je dosaženo optima pro enzymové štěpení acetyl- a butyrylthiocholinu³⁴.

Další možnou komplikací při stanovení aktivit cholinesteras v tělních tkáních a krvi je reakce DTNB s běžně v tkáních přítomným glutathionem a dalšími látkami obsahujícími skupinu SH (cit.¹⁹). Tyto látky reagují s DTNB stejným mechanismem jako substrát změněný cholineste-

rasou a vykazují pak chybně pozitivní výsledek. Tato reakce je při měření tkání nevyhnutelná. Takto vzniklou chybou je možné vyloučit preinkubací měřených vzorků po dobu asi 5 min. V tomto intervalu dojde k reakci DTNB se všemi těmito látkami a ty pak již neovlivňují následný odečet aktivit cholinesteras.

Závěr

Sledování změn aktivit cholinesteras v biologických vzorcích prokázalo reaktivaci inhibovaných enzymů po podání reaktivátorů (obidoxim, K203). Reaktivace byla potvrzena u obou látek v plasmě i krvi. Reaktivace AChE inhibované tabunem v plné krvi byla lepší po podání nově vyvinutého reaktivátoru K 203, jež byl vyvinut jako možné terapeutikum právě pro případ intoxikace tímto inhibitorem. Obidoxim vykázal horší reaktiváční schopnost vůči této nervově paralytické látce.

Uvedená práce byla vypracována díky podpoře grantu Ministerstva obrany (Česká republika) FVZMO0000501.

LITERATURA

- Holmstedt B.: *Pharmacol. Rev.* 11, 567 (1959).
- Bajgar J.: *Adv. Clin. Chem.* 38, 151 (2004).
- Bajgar J., Fusek J., Kuca K., Bartosova L., Jun D.: *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 461 (2007).
- Michel H. O.: *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1564 (1949).
- Nenner M.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 537 (1970).
- Hestrin S.: *J. Biol. Chem.* 180, 241 (1949).
- Winter G. D.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 87, 629 (1960).
- Voss G., Sachsse K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 764 (1970).
- Worek F., Kirchner T., Backer M., Szinicz L.: *Arch. Toxicol.* 70, 497 (1996).
- Sasaki M.: *Rinsko Biori.* 12, 555 (1964).
- Israel M., Lesbats B.: *Neurochemistry: A Practical Approach*, str. 113. IRL Press, Washington 1987.
- Fiserova-Bergerova V.: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 28, 3311 (1969).
- Abernethy M. H., George P. M., Herron J. L., Evans R. T.: *Clin. Chem.* 32, 194 (1986).
- Worek F., Mast U., Kiderlen D., Diepold Ch.: *Clin. Chim. Acta* 288, 73 (1999).
- Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V.: *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).
- London L., Thompson M. L., Sacks S.: *Occup. Environ. Med.* 52, 57 (1995).
- Wilson B. W., Sanborn J. R., O'Malley M. A.: *Occup. Environ. Med.* 12, 347 (1997).
- Ellman G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443 (1958).
- Ellman G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 (1959).
- Kassa J., Karasova J., Musilek K., Kuca K.:

- Toxicology. 243, 311 (2008).
21. George P. M., Abernethy M. H.: Clin. Chem. 29, 365 (1983).
 22. Hackathorn D. R., Brinkman W. J., Hathaway T. R.: Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 44, 547 (1983).
 23. Magnotti R. A., Dowling K., Eberly J. P.: Clin. Chim. Acta 315, 315 (1988).
 24. Gordon J. J.: Nature 162, 146 (1948).
 25. Meuling W. J. A., Jongen M. J. M., Hemmen J. J.: Am. J. Ind. Med. 22, 231 (1992).
 26. Lopez-Carrillo L., Lopez-Cervantes M.: Arch. Edvir. Healt 48, 359 (1993).
 27. Bajgar J.: Brit. J. Ind. Med. 49, 648 (1992).
 28. Bajgar J.: Voj. Zdrav. Listy 67, 1 (1998).
 29. Bajgar J.: Klin. Biochem. Metab. 13, 40 (2005).
 30. Ballantyne B., Marrs T. C., v: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*, (Ballantyne B., Marrs T. C., ed.), str. 3. Butterworth & Heinemann, Oxford 1992.
 31. Musílek K., Jun D., Cabal J., Kassa J., Guun-Moore F., Kuca K.: J. Med. Chem. 50, 5514 (2007).
 32. Paleus S.: Arch. Biochem. Biophys. 12, 153 (1947).
 33. Todrick A.: Br. J. Pharmacol. 9,76 (1954).
 34. Bajgar J.: Voj. Zdrav. Listy 41, 78 (1972).

J. Žďárová-Karasová, K. Kuča, D. Jun, and J. Bajgar (*Department of Toxicology, Faculty of Military Health Service, Defence University, Brno*): **Using the Ellman Method for *In Vivo* Testing of Cholinesterase Activity**

The changes in cholinesterase activity in tissues were evaluated and compared with the reactivation potential of reactivators. As reactivators, (*E*)-1-(4-carbamoylpyridinium-1-yl)-4-{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl}but-2-ene dibromide (K203) and common 1,3-bis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl}-2-oxapropane dichloride (obidoxime) were used. The reactivation of both oximes was monitored in blood and blood plasma. The reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase (AChE) was higher using the newly synthesized K203.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
upozorňuje, že pro přijímací řízení ve školním roce 2010/11**

v navazujícím magisterském studiu

je možno studovat v následujících studijních programech/oborech

Studijní program: Chemie

Studijní obory:

Analytická chemie

Anorganická chemie

Fyzikální chemie

Biofyzikální chemie

Jaderná chemie

Makromolekulární chemie

Organická chemie

Chemie životního prostředí

Modelování chemických vlastností nano- a biostruktur

Učitelství chemie a biologie pro SŠ

Učitelství chemie a matematiky (UK MFF) pro SŠ

Učitelství chemie jednooborové

Studijní program: Biochemie

Studijní obor:

Biochemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor:

Klinická a toxikologická analýza

Příhlášky a podrobné informace lze získat na adrese: PřF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2,
tel: 221 951 155, 221 951 156. Příhlášky ke studiu se přijímají do 28. února 2010.

Další informace naleznete na webových stránkách PřF UK – www.natur.cuni.cz.

SEPARACE KVARTÉRNÍCH BENZO[*c*]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ Z *Macleaya cordata*

JAROSLAV VIČAR^a, MIROSLAV SOURAL^b
a JAN HLAVÁČ^b

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta,
^b Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 47 Olomouc
jarvic@tunw.upol.cz

Došlo 25.2.09, přijato 4.11.09.

Klíčová slova: sanguinarin, chelerythrin, *Macleaya cordata*, dihydroderiváty

Úvod

Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]-1,3-dioxolo[4,5-*i*]fenanthridinium-chlorid, dále jen SG) a chelerythrin (1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]fenanthridinium-chlorid, dále jen CHE), vyskytující se v rostlinách čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae, jsou stále atraktivními sloučeninami pro základní a aplikovaný výzkum^{1,2}. Směsi sanguinarinu a chelerythrinu, na trhu nabízené jako sanguiritrin (alkaloidový extrakt *M. cordata*) a sanguinaria (alkaloidový extrakt z rhizomů *Sanguinaria canadensis*), jsou aktivními složkami přípravků ústní hygieny s prokázaným antiplakovým účinkem, resp. aditiva do krmiva hospodářských zvířat (prodáváno v EU pod názvem SANGROVIT[®], PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH, Německo). Ačkoliv je v literatuře popsána jejich úplná syntéza, jejich

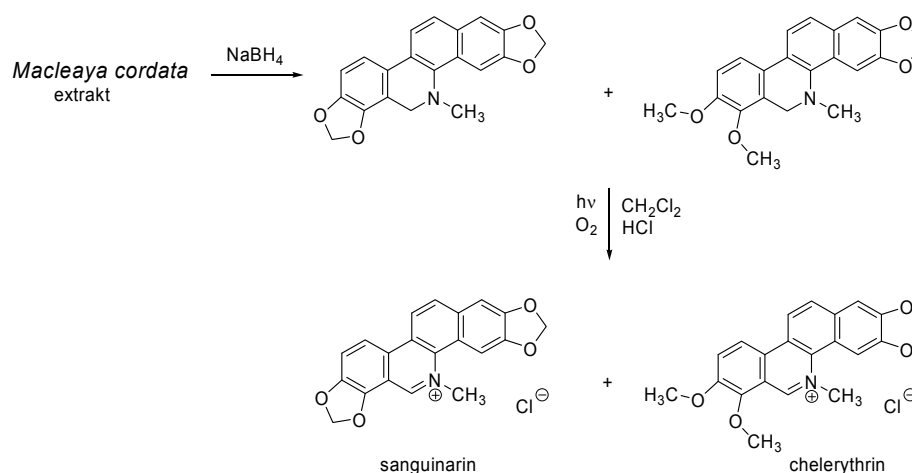
zdrojem zůstává nadále rostlinný materiál. Klíčovým faktorem ovlivňujícím cenu je pak vzájemná separace těchto alkaloidů.

Novější metody dělení SG a CHE se zřetelem na jejich stanovení v biologickém materiálu jsou shrnuty v článku³, přičemž většina prací citovaných v tomto přehledu, jakož i většina článků uveřejněných po tomto referátu, užívá pro separaci reverzní fáze (C₈-C₁₈) s gradientovou elucí, např. směsí pufr-acetonitril⁴⁻⁸, nebo pufr-methanol⁹. Jiný nosič, kopolymer methylakrylát-divinylbenzen, umožnil použití gradientu s ethanolem namísto acetonitrilu a je doporučován pro práci v průmyslovém měřítku¹⁰.

Pro preparativní dělení většího množství látek je však použití reverzní fáze ekonomicky velmi náročné. Pro preparativní dělení SG a CHE v laboratorním měřítku na jiných sorbentech byly popsány dva přístupy – buď kolonová chromatografie acetátů na Al₂O₃ s velkou spotřebou sorbentu a benzenu¹¹, nebo „flash“ chromatografie chloridů na tomtéž sorbentu, sice s použitím toluenu namísto problematického benzenu, nicméně stále experimentálně značně náročná¹². Dále byl popsán také obrácený přístup, nepolární sorbent typu kopolymer styren-divinylbenzen a eluce vodou a směsí voda-methanol¹³.

Celkově lze ale shrnout separace zmíněných alkaloidů ve formě kvartérních amoniových solí jako náročné jak po stránce chemické, tak zejména ekonomické.

Způsob, jak obejít přímou separaci kvartérních alkaloidů, navrhl Brossi a Borer¹⁴. Kvartérní alkaloidy redukovali na málo polární dihydroderiváty, ty potom dělili na sloupci Al₂O₃ elucí benzenem a produkty zpětně oxidovali Hg(CH₃COO)₂. Pro další zejména biologické studie je však použití rtuťnatých solí nevhodné a práce s karcinogenním benzenem nebezpečná. Proto byla naše snaha zaměřena na hledání efektivní ekonomicky přijatelné separace SG a CHE, navíc s ohledem na omezení toxicity použitých chemikálií.



Obr. 1. Schéma dělení směsi sanguinarinu a chelerythrinu z extraktu *Macleaya cordata*

V tomto článku navrhujeme ekonomicky přístupnou metodu dělení obou alkaloidů, založenou na postupu Brosiho a Borera, kdy eliminujeme použití benzenu a používáme fotochemickou oxidaci namísto rtuťnatých solí pro zpětné převedení rozdělených dihydroderivátů na kvartérní amoniové soli.

Experimentální část

Body tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. $^1\text{H-NMR}$ spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 MHz. Čistota produktů byla ověřována na přístroji LC-20 Prominence (Shimadzu) pomocí kolony Purospher Star RP-18e, 5 μm , 250/4 (Merck) vybaveném detektorem diodového pole SPD-M20A a fluorimetrickým detektorem RF-10Ax1. Mobilní fázi byla 0,01 M 1-heptansulfonová kyselina/0,1 M triethylamin, pH 2,5 (H_3PO_4) v 25% acetonitrilu v gradientu s 0,01 M 1-heptansulfonová kyselina/0,1 M triethylamin, pH 2,5 (H_3PO_4) v 60% acetonitrilu, průtok 1 ml min^{-1} , detekce při 285 nm (UV) a/nebo 327 nm excitace – 577 emise (fluorimetrie). Sloupcová chromatografie byla prováděna na přístroji Sepacore Flash Chromatograph (Büchi). Při izolaci byla používána rozpouštědla čistoty p.a., NaBH_4 byl produkt firmy Aldrich. Extrakt z *Macleaya cordata* (Wild.) R.Br., Papaveraceae (obvykle označován jako sanguiritrin (CAS 112025-60-2)) pocházel od firmy CAMAS Technologies, Inc. (Broomfield, USA) s deklarovaným obsahem 532 mg g^{-1} chloridu sanguinarinu a 164 mg g^{-1} chloridu chelerythrinu.

Separace redukováných alkaloidů

Sanguiritrin (16 g) byl redukován NaBH_4 (22 g, přidáván v 10 dávkách v intervalech 10 min) v methanolu (2,2 l), za míchání při laboratorní teplotě. Odparek po odpaření methanolu byl rozpuštěn v chloroformu, extrakt byl vytřepán vodou do neutrální reakce, sušen Na_2SO_4 a odpařen. Získaný produkt (7 g) byl podroben separaci sloupcovou chromatografií. Podmínky separace (Sepacore Flash Chromatograph): kolona 150 \times 45 mm, silikagelová stacionární fáze DAVISIL LC60A 40–60 μm (Chromservis), mobilní fáze pro eluci dihydrosanguinarinu: chloroform, mobilní fáze pro eluci dihydrocheletrythrinu: chloroform:methanol (9:0,5), průtok 10 ml min^{-1} , detekce UV 275 nm.

Získané odparky čistých frakcí dihydrosanguinarinu (1,71 g) a dihydrocheletrythrinu (0,66 g) nebyly bezbarvé, což ukazuje na malý podíl zpětné oxidace během separačního procesu. Proto byly oba produkty ještě čištěny na sloupci silikagelu (7 g, 3 g), eluce chloroformem. Barevné složky byly zachyceny na sloupci, odparky eluátů rekrystalizací ze směsi chloroform-methanol poskytly 1,60 g bezbarvého dihydrosanguinarinu, b.t. 190–193 $^{\circ}\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 195–196 $^{\circ}\text{C}$) a 0,56 g bezbarvého dihydrocheletrythrinu, b.t. 163–165 $^{\circ}\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 169–171 $^{\circ}\text{C}$).

Fotochemická oxidace dihydrosanguinarinu a dihydrocheletrythrinu

Dihydrosanguinarin (166 mg) a konc. HCl (50 μl) v CH_2Cl_2 (25 ml) za probublání vzduchem v intervalech 15 min byly ozařovány na solárním simulátoru SOL-500 (Dr. Höhle UV Technology, SRN) ultrafialovým zářením vlnových délek 295–315 nm po dobu 1 h. Získaná sraženina byla odfiltrována, promyta etherem a sušena nad P_2O_5 při 70 $^{\circ}\text{C}$. Bylo získáno 178 mg (84 %) chloridu sanguinarinu ve formě trihydrátu, b.t. 270–274 $^{\circ}\text{C}$ (rozklad) (cit.¹⁵ b.t. 277 až 280 $^{\circ}\text{C}$), 300 MHz NMR spektrum odpovídá dané struktuře a je ve shodě s cit.¹⁶. Pro trihydrát $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{Cl} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (421,8) vypočteno: 56,95 % C, 4,78 % H, 3,32 % N; nalezeno: 56,86 % C, 4,97 % H, 3,15 % N.

Dihydrocheletrythin (460 mg) a konc. HCl (130 μl) v CH_2Cl_2 (130 ml) za probublání vzduchem v intervalech 15 min byly ozařovány na solárním simulátoru SOL-500 (Dr. Höhle UV Technology, SRN) ultrafialovým zářením vlnových délek 295–315 nm po dobu 4 h. Během reakce bylo postupně doplněno 120 ml rozpouštědla. Rozpouštědlo bylo odpařeno na objem asi 50 ml, po stání přes noc v lednici byl produkt odfiltrován a promyt etherem. Bylo získáno 380 mg chloridu cheletrythrinu, který byl dále čištěn krystalizací: produkt byl za varu rozpuštěn ve vodě (25 ml), po ochlazení byl roztok filtrován, k filtrátu byla přidána konc. HCl (0,60 ml) a roztok byl ponechán 3 dny v lednici. Chlorid cheletrythrinu byl odfiltrován, promyt malým množstvím 2 M-HCl a sušen nad P_2O_5 při 70 $^{\circ}\text{C}$.

Bylo získáno 249 mg (46 %) produktu o složení $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{NCl} \cdot 1\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (410,8), b.t. 195–201 $^{\circ}\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 202–203 $^{\circ}\text{C}$). Vypočteno: 61,39 % C, 5,12 % H, 3,41 % N; nalezeno: 61,42 % C, 5,37 % H, 3,41 % N. 300 MHz NMR spektrum odpovídá dané struktuře a je ve shodě s cit.¹⁶.

Závěr

Popsaný postup umožňuje izolovat z ekonomicky dostupného extraktu dostatečná množství obou sloučenin v čistém stavu a tím výrazně zlevňuje vstupy pro farmakologické experimenty.

Autoři děkují za finanční podporu projektům GA ČR 525/07/0871 a MSM 6198959216.

LITERATURA

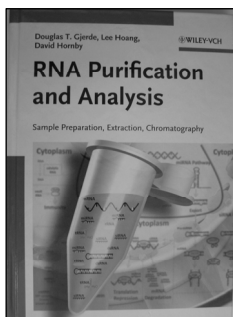
1. Dostál J., Slavík J.: Chem. Listy 94, 15 (2000).
2. Zdařilová A., Malíkova J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: Chem. Listy 100, 30 (2006).
3. Dvořák Z., Kubán V., Klejduš B., Hlaváč J., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V.: Heterocycles 68, 2403 (2006).
4. Chen Y. Z., Liu G. Z., Shen Y., Chen B., Zeug J. G.: J. Chromatogr., A 1216, 2104 (2009).

5. Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 283 (2007).
6. Klvana M., Chen J., Lepine F., Legros R., Jolicoeur M.: *Phytochem. Anal.* 17, 236 (2006).
7. Liang M., Zhang W., Hu J., Liu R., Zhang C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 178 (2006).
8. Luo X. B., Chen B., Yao S. Z.: *Phytochem. Anal.* 17, 431 (2006).
9. Psotová J., Klejduš B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr., B* 830, 165 (2006).
10. Pi G., Ren P., Yu J., Shi R., Yuan Z., Wang C.: *J. Chromatogr., A* 23, 17 (2008).
11. Slavík J., Slavíková L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 1667 (1960).
12. Dostál J., Táborská E., Slavík J.: *Fitoterapia* 63, 61 (1992).
13. Tanahashi T., Zenk M.: *J. Nat. Prod.* 53, 579 (1990).
14. Brossi A., Borer R.: *Lloydia* 28, 199 (1965).
15. Southon I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, London 1989.
16. Marek R., Toušek J., Dostál J., Slavík J., Dommissé R., Sklenář V.: *Magn. Reson. Chem.* 37, 781 (1999).

J. Vičar^a, M. Sural^b, and J. Hlaváč^b (^a*Institute of Medicinal Chemistry and Biochemistry*, ^b*Department of Organic Chemistry, Palacký University, Olomouc*): **Separation of Quaternary Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from *Macleaya cordata***

A cost-effective method for separation of sanguinarine and chelerythrine from commercial *Macleaya cordata* extract (sanguiritrin) is described. In the first step, the alkaloids are reduced with NaBH₄ to dihydro derivatives, which are easily separated by column chromatography on silica gel with chloroform and chloroform-methanol elution. In the second step, the dihydro derivatives are photochemically oxidized to the title alkaloids.

RECENZE



Douglas T. Gjerde,
Lee Hoang, David Hornby

RNA Purification and Analysis

Wiley – VCH
195 stran, pevná vazba
ISBN 978-3-527-32116-2

RNA je jednou z nejdůležitějších složek živého světa. Vyskytuje se jí velké množství typů, které se liší svou strukturou a účastní se velkého množství významných biochemických procesů, mezi které patří exprese genů a její regulace. Knižka proto začíná přehledným seznamem a popisem všech známých typů prokaryotní i eukaryotní RNA, za kterým následují kapitoly zabývající se její purifikací a analýzou.

Většina biochemiků a molekulárních biologů dnes s RNA běžně pracuje při své laboratorní praxi. Existuje celá řada komerčně dostupných kitů, které jim tuto práci usnadňují a umožňují prakticky bez větších znalostí o jejich fungování izolovat potřebný typ RNA. Na rozdíl od těchto kitů se v knížce nedozvíte podrobný návod, není to pouhá „kuchařka“. Autoři zde popisují fyzikální a chemické principy využívané při různých metodách a postupech práce s RNA. Pochopením těchto základních principů a možností jejich aplikace pro práci s RNA by měli být biologové schopni lépe využívat, popřípadě podle své potřeby modifikovat nástroje dostupné na trhu. Text je zaměřen na použití elektroforézy, extrakce na pevné fázi a nejvýznamnější část je věnována kapalinové chromatografii. Jsou zde popisovány jak mechanismy interakce RNA s pevnou fází, tak vlastní principy těchto metod. Principy jmenovaných metod jsou vykládány sice poměrně přehledně, ale v některých kapitolách obecně, a vzdělaný chemik se při čtení těchto částí určených především biologům bude trochu nudit. Poslední kapitola je věnována prostorové struktuře RNA a možnostem jejího zjištění. Dodatky se věnují výkladu pojmů využívaných ve chromatografii.

Tato publikace, první na trhu svého druhu, popisuje všechny nedávno objevené typy RNA a možnosti jejich izolace, purifikace a analýzy a může se tak stát velice užitečným nástrojem při optimalizaci laboratorních protokolů práce s RNA.

Vojtěch Škop

Jiří Jindra

Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882–1989

Nakladatelství Libri, Ústav pro soudobé dějiny AV ČR,
Praha 2009.

227 stran, doporučená cena 320 Kč

Tato publikace je zaměřena především na podrobnou dokumentaci výzkumu a výuky v oblasti elektrochemie v českých zemích v časovém období od rozdělení Karlovy univerzity na českou a německou část v roce 1882 až do konce komunistického režimu v ČSSR koncem roku 1989. Celá publikace je rozdělena do celkem deseti různě obsažených textových kapitol: 1. Úvod, 2. Co je elektrochemie?, 3. Česká elektrochemie, 4. Počátky české elektrochemie (do roku 1920), 5. Obory elektrochemie, 6. Střediska elektrochemie a elektroanalýzy, 7. Konference a semináře s elektrochemickým nebo elektroanalytickým zaměřením v letech 1950–1989, 8. Výstavy s prezentací elektrochemických zařízení, 9. Výuka a vzdělávání v elektrochemii a elektroanalýze, 10. Významní čeští (českoslovenští) elektrochemici a elektroanalytici. Na ně navazuje řada příloh o knižních publikacích, o kandidátských a doktorských disertacích a habilitačních pracích s elektrochemickou a elektroanalytickou tematikou a seznam přednášek z těchto oborů na jednotlivých univerzitách a vysokých školách ve sledovaném časovém období.

V knize je popsáno zaměření a výsledky výzkumu na jednotlivých vysokých školách, pracovištích ČSAV, resortních výzkumných ústavech i průmyslových závodech, čerpané hlavně z dostupných publikací, přičemž nejpodrobněji se autor, dřívější dlouholetý vědecký pracovník Polarografického ústavu ČSAV a později Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie J. Heyrovského ČSAV, věnoval výsledkům na tomto pracovišti. Přesto popis zaměření a výsledků výzkumu ostatních pracovišť je dostatečně výstižný. Za nedostatek celého díla, s ohledem na jeho název, je však nutno považovat zcela chybějící přehled o průmyslových elektrochemických výrobcích v českých zemích a jejich vývoji ve sledovaném časovém období. Drobné nedostatky lze spatřovat i v nevyváženém zpracování některých pasáží (např. mezi významné elektrochemiky by si nepochybně zasloužil zařadit i prof. I. Roušar, či na str. 175, v porovnání s výčtem badatelů na ostatních pracovištích, měli být u Ústavu anorganické chemie ČSAV uvedeni též I. Paseka, O. Špalek a M. Kadeřávek (†) a V. Koudelka (†), u katedry anorganické technologie VŠCHT Praha vedle jediného I. Roušara dále V. Srb (†), S. Tichý (†), V. Cezner a P. Novák).

Přes uvedené nedostatky je tato publikace bohatým zdrojem informací o vývoji a výsledcích výzkumu a výuky elektrochemie v českých zemích v uvedeném časovém období a zaujme jistě širší okruh čtenářů zajímajících se o nedávné dějiny vědy a výzkumu v českých zemích a jejich přínos světové vědě.

Jan Balej



19. CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ KONFERENCE S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

APROCHEM 2010

TECHNOLOGIE • ROPA • PETROCHEMIE • POLYMERY • BEZPEČNOST • PROSTŘEDÍ
19. – 21. DUBEN 2010 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

PCHE • APROCHEM 2010 • Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6 • Tel/Fax: 220 518 698
Mobil: 607 671 866 • E-mail: pche@csvts.cz • www.aprochem.cz
Připravuje PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCHI, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR.

ODPADOVÉ FÓRUM 2010

5. ROČNÍK ČESKO-SLOVENSKÉHO SYMPOSIA
VÝSLEDKY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO ODPADOVÉ HOSPODÁŘSTVÍ
21. – 23. DUBEN 2010 • KOUTY NAD DESNOU • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

Připravuje CEMC – České ekologické manažerské centrum, Jevanská 12, 100 31 Praha 10
Tel.: 274 784 448, 723 950 237 • Fax: 274 775 869 • E-mail: symposium@cemc.cz • www.odpadoveforum.cz

V RÁMCÍ OBOU AKCÍ DOPROVODNÁ TECHNICKÁ VÝSTAVKA.
FIREMNÍ PREZENTACE A LOGA V TIŠTĚNÝCH MATERIÁLECH I NA CD ROM.

Přihlášky přednášek prosíme do 31. 1. 2010, plná znění elektronicky do 15. 3. 2010.
2. Cirkulář s Odborným programem a Přihláškou účasti vyjde koncem února 2010.
Přihlášky účasti budou žádány do 31. 3. 2010.

Registrace na jedné z akcí umožní účast na obou za výhodných podmínek.
Nepřehlédněte prosím nové místo konání v Koutech n.D., Jeseníky. Sledujte web.

Zveme Vás k účasti a těšíme se na společné setkání.

LIBLICE 2009 – DODATKY

FLAVONOIDS IN THE APIACEAE FAMILY

KHALED ABDULMANEA^a, PETRA LANKOVÁ^a, ELENA A. PROKUDINA^a, RADKA KOBLOVSKÁ^a, VÁCLAV ZELENÝ^b, and OLDŘICH LAPČÍK^a

^a Department of Natural Compounds, Faculty of Food and Biochemical Technology, ICT Prague. Technická 5, 166 28 Prague 6; ^b Czech University of Life Sciences, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6

Flavonoids are polyphenolic compounds of plant secondary metabolism, found in fruits, vegetables and certain beverages, which have multiple effects on human health. In this work we have studied the occurrence of flavonoids in ten selected representatives of the Apiaceae family using immunoaffinity chromatography (IAC) with HPLC-MS-SIM and HPLC-ELISA. Following species were tested: *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi*, *Ammi visnaga*, *Coriandrum sativum*, *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, *Daucus carota*, *Aegopodium podagraria* and *Anethum graveolens*. Leafs and seeds were lyophilized, grinded and extracted with 70% ethanol. After evaporation, the extracts were analyzed directly or after pre-extraction on IAC columns containing immunosorbents specific for several isoflavonoids (i.e. daidzein, genistein, biochanin A and their derivatives). After that they were analyzed by HPLC-MS. Some extracts were fractionated on HPLC and after that analyzed by ELISA methods specific for daidzein, genistein, biochanin A and their derivatives substituted either at the 4'- or 7-positions. Aglycons and glycosides of flavonoids (i.e. narigenin, narigenin-7-glucoside, quercetin, and isoflavonoids (i.e. daidzin, daidzein, genistin, genistein, glycitin, sissotrin, genistein-7,4 dimethyl ether, prunetin, formononetin, isoformononetin and biochanin A) were detected. These data extend the knowledge about the occurrence of isoflavonoids in the Apiaceae.

Acknowledgment: Projects MSM 6046137305 and GACR 525/09/0994.

REFERENCES

1. Liang H., Zhao Y., Cui Y., Liu Q.: Beijing Yike Daxue Xuebao 32, 223 (2000)
2. Tan L., Zhao Y., Yu Y., Wang B., Zhang R.Y., Tu G.Z.: Chin. Chem. Lett. 9, 71 (1998).
3. Vaničková L., Abdulmanea K., Lanková P., Prokudina E.A., Zelený V., Lapčík O.: Chem. Listy 102, 1077 (2008).

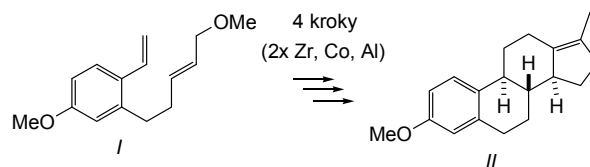
FORMÁLNÍ TOTALNÍ SYNTÉZA ESTRONU

ROBERT BETÍK^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^b Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
rбетik@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz

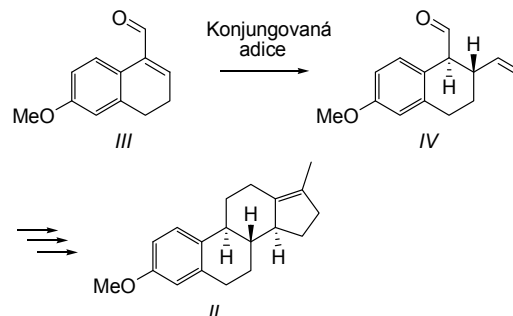
Cílem naší práce bylo vyvinout novou metodu, která by umožňovala diastereoselektivní a enantioselektivní přípravu látek se steroidním skeletem. Nedávno byl publikován syntetický postup přípravy derivátů 16-ketoestronu, který byl založený na opakované cyklizaci α,ω -dienů pomocí Cp_2ZrBu_2 a následné reakci s allylhalogenidy^{1,2}. Podobný přístup byl použit i pro formální totální syntézu estronu³.

Tuto metodiku jsme chtěli dále zefektivnit a proto jsme vyvinuli alternativní syntézu klíčového tetracyklického intermediátu. Jako výchozí látka sloužil již známý methoxydien **I**, který po sledu 2 reakcí zprostředkovaných Cp_2ZrBu_2 , Pauson-Khandově reakci a chemoselektivní redukcí karbonylové skupiny poskytl kýžený estratetraen **II**. Ten může být převeden na estron ve 2 krocích⁴. Celkově byl meziprodukt **4** připraven z komerčně dostupných látek v 7 krocích (50%). Tento postup je vysoce diastereoselektivní.



Nejnovější výsledky ukazují, že další modifikací tohoto postupu je možné připravit intermediát **II** i enantioselektivně.

Klíčovou reakcí je v tomto případě konjugovaná adice na aldehyd **III**, která je uskutečněna asymetricky přes chirální aldímín za vzniku meziproduktu **IV**⁵. Další postup je již podobný výše zmiňovanému a vede k tetracyklickému derivátu **II** enantioselektivně.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

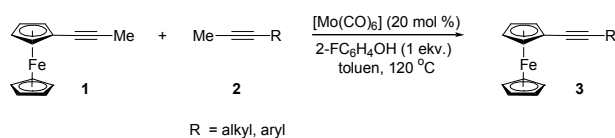
- Herrmann P., Kotora M., Buděšínský M., Šaman D., Císařová I.: *Org. Lett.* 8, 1315 (2006).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *Chem. Lett.* 36, 1268 (2007).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).
- Barlett P. A., Johnson W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7501 (1973).
- Kogen H., Tomioka K., Hashimoto S, Koga K.: *Tetrahedron Lett.* 21, 4005 (1980).

Mo-KATALYZOVANÁ CROSS-METATHESA
PROPYNILFERROCÉNU

**TOMÁŠ BOBULA^a, J. HUDLICKÝ^a, R. GYEPES^b,
P. ŠTĚPNIČKA^b a MARTIN KOTORA^{a,c,*}**

^a Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^b Katedra anorganické chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^c Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
tomasbobula@gmail.com; kotora@natur.cuni.cz

Metathesa dvou alkinů založená na Mo(CO)₆-halofenol katalytickom systéme patří medzi moderné a selektivné metody syntézy substituovaných acetylénov. Metodiku homo-metathesy (prop-1-yn-1-yl)ferrocénu **1** sme úspešne využili pri príprave bis(ferrocenyl)etynu¹. V prípade cross-metathesy (prop-1-yn-1-yl)ferrocénu **1** s alkyl a arylpropíni **2** sme sa zamerali na selektivitu vzniku substituovaných derivátov etynylferrocénu **3**, optimalizáciu reakčných podmienok, správnu voľbu katalytického systému a možnosť rozšírenia aplikácie aj na iné typy propínových substrátov².



Vyššie uvedená metodika umožňuje prípravu série alkylovaných aj π -konjugovaných arylovaných derivátov etynylferrocénu nesúcich elektrón-donorné a elektrón-akceptorné skupiny. Reakcia sa javí ako vysokoselektívna a vedie prednostne k vzniku heterodimérov (30–70 %). Získané produkty boli podrobené fyzikálno-chemickým štúdiám z hľadiska ich potenciálneho využitia v rôznych oblastiach chémie (v oblasti nových materiálov, elektrochémie, organickej syntézy, rentgenoštruktúrnej analýzy atď).

LITERATÚRA

- Nečas D., Kotora M., Štěpnička P.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 68, 1897 (2003).
- Bobula T.; Hudlický J.; Gyepes R.; Štěpnička P.; Kotora M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008, 3911.

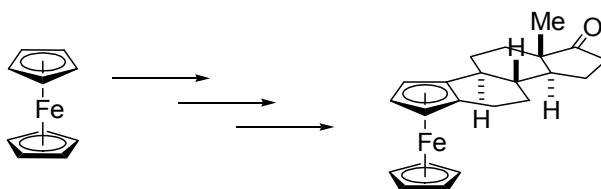
SYNTEZA FERROCENESTRONU

FILIP HESSLER^a a MARTIN KOTORA^{a,b,*}

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^b Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
fhessler@c-box.cz; kotora@natur.cuni.cz

Sloučeniny ferrocenu s různými přírodními a biologicky aktivními látkami jsou předmětem zkoumání v organické chemii již řadu let pro své jedinečné vlastnosti^{1,2}. Příkladem může být ferrocifen, derivát tamoxifenu obsahující ferrocen, s potenciální aktivitou proti rakovině prsu.

Je známo několik sloučenin ferrocenu a steroidů, ale ještě nikdy nebyl zabudován ferrocenový fragment přímo do steroidního skeletu. Vycházejí z nedávných výsledků při syntéze estronu³, rozhodli jsme se připravit ferrocenestron, první steroid s integrovaným ferrocenovým motivem.



Syntéza byla založena na přípravě substituovaného chirálního ferrocenu a jeho následných transformací katalyzovaných přechodnými kovy. Mezi použité reakce patří například oxidativní adice s navazující alkylací pomocí zirkonocenu, cross-coupling katalyzovaný palladiem, enynová metathese katalyzovaná rutheniem a další.

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857 a IM0508 (Center for New Antivirals and Antineoplastics).

LITERATURA

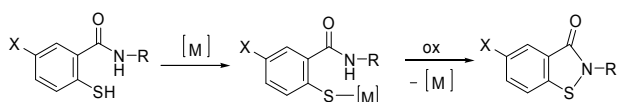
- Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N.: *Chem. Rev.* 104, 5931 (2004).
- Schatzschneider U., Metzler-Nolte N.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 1504 (2006).
- Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).

EFFECTIVE SCAVENGING OF HEAVY METALS
BY ORGANOSULFUR MOIETIES

DENISA HIDASOVÁ and JIŘÍ ŠROGL

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6
dhidasova@centrum.cz.*

Metal-thiol interactions occur commonly and are important in the biochemistry of life sustaining processes¹. Given the stability of the metal-thiol bond, it is of interest that Nature has evolved significant metalloenzymatic processes, which use key interactions of sulfur-containing functionalities with metals such as Ni, Co, Cu and Fe.



M = Cu
X = nitro and aminotoluoyl groups
R = isopropyl, *p*-methoxyphenyl, dodecyl

In this work we will discuss variety of heavy metal-thiol interactions to form S-N bond.

This work was supported by grant ASCR number M200550908.

REFERENCE

1. Šrogl J., Liu W., Marshall D., Liebeskind L. S.: J. Am. Chem. Soc. 121, 9449 (1999).

DEWAROVÝMI BENZENY K POLYAROMATICKÝM SLOUČENINÁM

ŠTĚPÁNKA JANKOVÁ^a, PETR ŠTĚPNIČKA^b
a MARTIN KOTORA^{a,c}

^a Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^b Katedra anorganické chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^c Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 kotora@natur.cuni.cz.

Dewarovy benzeny společně s benzvalenem a dalšími sloučeninami jsou valenčními izomery benzenu, které mohou být připraveny jejich termickým přesmykem¹. V naší předchozí práci jsme ukázali, že přítomnost vhodného substituentu – fenylu – výrazně zvyšuje termickou stabilitu Dewarových benzenů². V další práci jsme se pak zabývali možností záměny fenylu za ferrocen³ a možností přípravy valenčních izomerů terfenylů a kvarfenylů⁴ použitím aromatických dipropynoátů (Schéma 1).

Pro porovnání syntetických možností jsme takto substituované terfenyly a kvarfenyly připravili také reakcí aromatických dipropynoátů s zirkonacyklopentadienem v přítomnosti CuCl, popř. NiBr₂(PPh₃)₂.

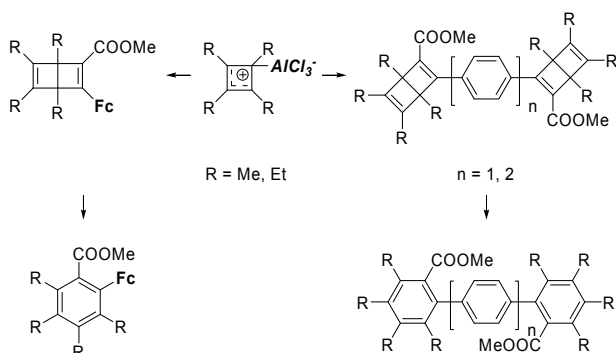


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620857, LC06070, a Z40550506.

LITERATURA

1. van Tamelen E. E., Pappas S. P.: J. Am. Chem. Soc. 84, 3789 (1962).
2. Janková Š., Dračínský M., Císařová I., Kotora M.: Eur. J. Org. Chem. 47 (2008).
3. Janková Š.; Štěpnička P.; Kotora M.: Dalton Transactions 2009, 3137.
4. Janková Š., Kotora M.: rukopis v přípravě.

ELISA STANOVENÍ DAIDZEINU, GENISTEINU A EQUOLU VE VZORCÍCH LIDSKÉ MOČI

LUCIE SOSVOROVÁ^a, PETRA LANKOVÁ^a, NAWAF AL MAHARIK^b a OLDŘICH LAPČÍK^a

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT v Praze, 166 28 Praha 6; ^b University of Dundee, College of Life Sciences, Division of Biological Chemistry & Drug Discovery, Sir James Black Centre, Dundee DD1 5EH, UK lucie.sosvorova@vscht.cz

Isoflavonoidy daidzein a genistein patří do široké skupiny fytoestrogenů – rostlinných metabolitů s estrogenními účinky. Tyto látky jsou podstatou potravinových doplňků určených pro ženy v klimakteriu (nehormonální substituční terapie – NHRT) jako alternativa nebo doplněk k hormonální substituční terapii. Část daidzeinu se činností střevní mikroflóry v lidském těle transformuje na equol, který je považován za látku se silnějším estrogenním účinkem. Produkce equolu závisí na složení střevní mikroflóry a je individuálně velmi rozdílná.

Cílem této studie bylo optimalizovat dříve vyvinuté ELISA metody pro stanovení daidzeinu, genisteinu a equolu v lidské moči. Jako imunogeny byly použity konjugáty isoflavonů s BSA navázaných na nosič prostřednictvím karboxymethylového můstku v pozicích 4'-O a 7-O. Byla provedena optimalizace koncentrací imobilizovaných antigenů a protilátek, zjištěn vliv matrice, rozpouštědla a extračního stupně.

Vyvinuté metody byly použity pro stanovení isoflavonoidů ve vzorcích moči pacientek Endokrinologického ústavu v Praze. Vyšetřeny byly vzorky negativní (před zahájením terapie fytoestrogeny) a pozitivní (po 3 měsících užívání NHRT). Hladiny volných fytoestrogenů v pozitivních vzorcích moči se pohybovaly v rozmezích 0,32–11 600 ng daidzeinu/ml moči, 0,43–64,8 ng genisteinu/ml moči a 0,015–31,1 ng equolu/ml moči.

Práce vznikla za podpory projektů MSM 6046137305 a GAČR 303/08/0958.

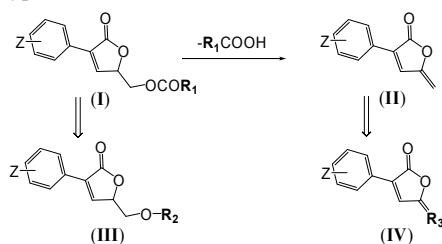
STUDIUM VZTAHŮ STRUKTURA – ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA U SUBSTITUOVANÝCH BUTENOLIDŮ

PETR ŠENEL, JIŘÍ KRATOCHVÍL, JIŘÍ KUNEŠ a MILAN POUR

^a *Centrum pro výzkum nových virostatik a antineoplastik, UK v Praze, FarmF v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie, Heyrovského 1203, 500 02 Hradec Králové petr.senel@faf.cuni.cz*

Podrobnější studium^{1,2} mechanismu antifungálního účinku látek typu 3-halogenfenyl-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onů (**I**, *in vitro* aktivita srovnatelná s amfotericinem B) odhalilo, že vlastní antifungálně aktivní látkou je γ -metylenbutenolid **II** (způsobující destrukci buněčné membrány hub), vzniklý eliminací odpovídající kyseliny.

Cílem této práce byla syntéza nových, potenciálně antifungálně aktivních, 3,5-disubstituovaných furanů (**III**, **IV**) s obměněným substituentem v poloze 5 a vyhodnocení změny antifungální aktivity v porovnání s předlohovými strukturami (**I**, **II**). Pozornost jsme zaměřili především na substituenty alkyldenového typu a alkyl- resp. aryloxymethylového typu.



Z = halogen, R₁ = alkyl, R₂ = alkyl or subst. aryl, R₃ = H, alkyl, subst. alkyl, aryl...

Za finanční podporu děkujeme „Centru pro výzkum nových virostatik a antineoplastik“; MŠMT ČR (1M6138896301), GA ČR(203/04/2134) a VZ MSM0021620822.

LITERATURA

- Vale-Silva L.A., Buchta V., Vokurková D., Pour M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2492 (2006).
- Nobilis M., Pour M., Šenel P., Pavlík J., Kuneš J., Vopršalová M., Kolářová L., Holčápek M.: *J. Chromatogr. B* 853, 10 (2007).

PŘÍPRAVA JODOVANÝCH FLAVONOIDŮ

ADÉLA TUNTUROVÁ, LUCIE SOSVOROVÁ, ELENA PROKUDINA a OLDŘICH LAPČÍK

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 tunturoa@vscht.cz

Potraviny bohaté na flavonoidy se často doporučují jako „zdravá výživa“. O některých flavonoidech je však známo, že jsou inhibitory thyroideální peroxidázy (TPO) a při větším dietním příjmu snižují účinnost využití jódu a ovlivňují tak funkci štítné žlázy. Studie posledních let ukazují, že se isoflavonoidy genistein

a daidzein mohou chovat jako falešné substráty pro TPO. Cílem práce je připravit jodované flavonoidy, které by sloužily jako standardy při stanovení látek vznikajících v biologickém systému. Kvercetin, apigenin, genistein a daidzein reagovaly s jedním ekvivalentem benzyltrimethylamonium dichlorodáta v systému CH₂Cl₂-MeOH-CaCO₃ a za laboratorní teploty. V případě apigeninu, genisteinu a daidzeinu bylo pomocí TLC v reakčních směsích detekováno několik nových produktů. U genisteinu HPLC-MS analýza prokázala přítomnost dvou látek o hmotě odpovídající monoiodod derivátu, přičemž obě byly v ELISA systému rozpoznávány protilátkami specifickými pro deriváty genisteinu. V současné době pracujeme na jejich podrobnější charakterizaci.

Práce vznikla s podporou grantů MSM 6046137305 a GACR 303/08/0958.

LITERATURA

- Doerge D.R., Chang H.: *J. Chromatogr. B.* 777, 269 (2002).

Rektor Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vyhlašuje, ve smyslu § 49 odst. 5 a § 98 odst. 1c) Zákona 111/1998 Sb., přijímací řízení pro akademický rok 2010/2011 do následujících oborů doktorských studijních programů uskutečňovaných na fakultách VŠCHT Praha:

Fakulta chemické technologie

<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie</i>	<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie a technologie materiálů</i>
<i>Studijní obory:</i>	Anorganická chemie Organická chemie Makromolekulární chemie	<i>Studijní obor:</i>	Technologie makromolekulárních látek Metalurgie Chemie a technologie anorganických materiálů Materiálové inženýrství
<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie a chemické technologie</i>		
<i>Studijní obory:</i>	Anorganická technologie Organická technologie		

Fakulta technologie ochrany prostředí

<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie a technologie ochrany životního prostředí</i>	<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie a technologie paliv a prostředí</i>
<i>Studijní obor:</i>	Chemie a technologie ochrany životního prostředí	<i>Studijní obor:</i>	Energetika v chemicko-technologických procesech Chemické a energetické zpracování paliv

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie</i>	<i>Studijní program:</i>	<i>Biochemie a biotechnologie</i>
<i>Studijní obor:</i>	Organická chemie Biochemie	<i>Studijní obor:</i>	Biotechnologie
<i>Studijní program:</i>	<i>Mikrobiologie</i>	<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie a technologie potravin</i>
<i>Studijní obor:</i>	Mikrobiologie	<i>Studijní obor:</i>	Chemie a analýza potravin Technologie potravin

Fakulta chemicko-inženýrská

<i>Studijní program:</i>	<i>Chemie</i>	<i>Studijní program:</i>	<i>Aplikovaná matematika</i>
<i>Studijní obor:</i>	Analytická chemie Fyzikální chemie	<i>Studijní obor:</i>	Aplikovaná matematika (studium 3 roky)
<i>Studijní program:</i>	<i>Chemické a procesní inženýrství</i>		
<i>Studijní obor:</i>	Chemické inženýrství Technická kybernetika Řízení a ekonomika podniku (studium 3 roky)		

Všechny doktorské studijní programy jsou uskutečňovány formou prezenční nebo kombinací prezenční a distanční formy. Standardní doba studia v DSP v prezenční formě je u vyznačených oborů tři roky u ostatních oborů student může studovat v této formě studia nejdéle čtyři roky s podporou stipendia po celou dobu studia.

Žádosti na předepsaném formuláři doložené životopisem, doklady o dosaženém vzdělání a dosavadní praxi, soupisem publikovaných prací a ostatních výsledků odborné činnosti, podávejte nejpozději do **31. března 2010** na děkanáty příslušných fakult, Technická 5, 166 28 Praha 6.

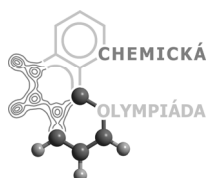
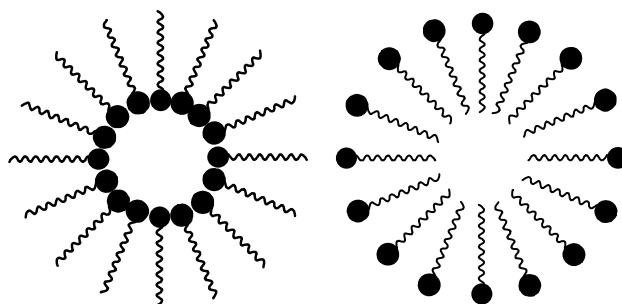


BULLETIN

ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Ročník 41

Číslo 1



Český komitét
ČKCH
pro chemii



ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÉHO INŽENÝRSTVÍ
CZECH SOCIETY OF CHEMICAL ENGINEERING



Obsah Chemické listy 2009, číslo 11 a 12

ČÍSLO 11/2009

ÚVODNÍK	879
REFERÁTY	
Hrst vzpomínek na pana profesora Heyrovského a jeho polarografii	880
R. Kalvoda	
Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii	889
J. Barek, K. Pecková a V. Vyskočil	
Jaroslav Heyrovský a Jan (Johann) Böhm	894
J. Jindra	
50. výročí Nobelovy ceny za chemii – putovní výstava s názvem Příběh kapky	898
K. Stejskalová	
Jaroslav Heyrovský – 50. výročí udělení Nobelovy ceny za chemii	900
L. Pospíšil a M. Hromadová	
Styren a styren-7,8-oxid: metabolismus a analytické metody stanovení aduktů s proteiny	902
M. Jágr, V. Pacáková a M. Petříček	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Compaction mechanism of intermediate-sized DNA elucidated by fluorescence lifetime correlation spectroscopy	911
J. Humpolíčková, A. Benda, L. Beranová a M. Hof	
Stanovení koncentrace osteokrinu v séru novou metodou ELISA	915
D. Stejskal, M. Švesták, H. Kotolová, M. Karpíšek, K. Adamcová, L. Sporová a P. Hejduk	
Rychlé elektroforetické stanovení močové kyseliny v alantoické tekutině s dávkováním z krátkého konce kapiláry	919
P. Tůma a E. Samcová	
Kopolymérna síra ako vulkanizačné činidlo pre nenasýtené kaučuky	924
M. Olšovský, P. Gášek, S. Ľalíková, T. Bazyláková a V. Macho	
Použití jednoduché a postupné extrakce ke zhodnocení chování zinku v kompostech a v půdě	931
A. Hanč, P. Tlustoš, J. Száková a J. Habart	
DISKUSE	935
ERRATA	935
LIBLICE 2009	937

ČÍSLO 12/2009

ÚVODNÍK	1008
REFERÁTY	
Bezpečná nanovlákná	1009
D. Petráš, D. Kimmer, K. Soukup a P. Klusoň	
Fluorované sloučeniny značené ¹⁸F jako účinné látky v radiofarmakách	1017
L. Procházka, M. Kropáček, M. Mirzajevová, J. Zimová, M. Fösterová, H. Švecová, F. Melichar a O. Bělohávek	
Syntéza intermediálních fází systému Ti-Al-Si metodou reaktivní sintrace	1022
P. Novák, D. Vojtěch, J. Šerák, J. Kubásek, F. Průša, V. Knotek, A. Michalcová a M. Novák	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Obsah minerálních látek ve vybraných produktech z mořských a sladkovodních řas	1027
L. Mišurcová, I. Stratilová a S. Kráčmar	
Porovnání kyselá a bazicky katalyzované transesterifikace kafilerního tuku methanolem	1034
A. Prošková, J. Kučera a Z. Kopicová	
Nové explicitní vztahy pro vyjádření terminálních pádových rychlostí tuhých částic	1037
M. Hartman, O. Trnka a M. Pohořelý	
Zajištění zdravotně nezávadné a bezpečné pitné vody v distribuční síti	1041
J. Říhová Ambrožová	
Sorpce nasycených par perchloroethylenů na zeminy a porovnání výtěžků extrakčních technik	1047
B. Zdravkov, J. J. Čermák a J. Janků	

LZE NĚČÍM NAHRADIT RADIOIZOTOPY ^3H A ^{14}C V BIOMEDICÍNSKÉM VÝZKUMU?

TOMÁŠ ELBERT

ÚOCHB AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Odpověď na tuto řečnickou otázku je jednoduchá – v dohledné době nikoliv. Autor tohoto článku se od r. 2005 účastní pravidelně mezinárodních setkání International Isotope Society (IIS) (2006 Edinburgh, 2009 Chicago) a Central European Division of IIS (CED-IIS) (tradičně v Bad Soden, Německo). Od r. 2007 je také členem výboru CED-IIS ve funkci poradce. Zahraniční účastníci těchto konferencí jsou převážně pracovníci radioizotopových laboratoří velkých farmaceutických firem popř. pracovníci nezávislých laboratoří poskytujících na komerčním základě služby testování potenciálních léčiv pro velké firmy.

V současné době připadá v průměru na jeden nový lék, který projde až do fáze I. klinického testování, 100 neúspěšných kandidátů. Velký odpad nastává právě v nulté fázi klinického testování, kdy se potenciální lék poprvé zkouší na lidech v tzv. studiích Admission-Distribution-Metabolism-Excretion (ADME). Nejčastěji používaným značícím radionuklidem umožňujícím tyto studie je uhlík ^{14}C . V případě, že potenciální lék je účinný v tak malých dávkách, že specifická radioaktivita ^{14}C už nestačí, používá se ke značení radioaktivní isotope vodíku – tritium. Velmi často se až v této fázi vývoje zjistí, že látka vykazující vysokou účinnost na cílový receptor *in vitro* se v organismu špatně vstřebává, nebo že se nedostane k buňkám cílové tkáně, protože se rychle metabolizuje a vylučuje. Někdy dochází k nežádoucímu ukládání potenciálního léku či jeho metabolitů do orgánů a to samozřejmě vede k jeho vyloučení z dalšího vývoje. Protože studie ADME na lidech jsou velmi drahé, byly vyvinuty modely pro předběžné testování metabolismu potenciálních léčiv. Používají se buněčné kultury anebo promývané zvířecí tkáně. Ale i tyto modely jsou založeny na použití radioaktivně značených sloučenin. Protože se takto testuje stále větší počet sloučenin, vznikl velký tlak na jejich značení. Syntéza sloučenin značených radionuklidem ^{14}C je přece jen časově náročnější a tak se pozornost obrátila ke katalytickým tritiačním metodám. Požadované specifické aktivity jsou řádově stovky mCi/mmol. Používány jsou homogenní katalyzátory – sloučeniny rhodia a iridia – a jako zdroj tritia slouží buďto plynné tritium, anebo tritiovaná voda. K charakterizaci tritiem značených sloučenin slouží kromě radio-HPLC hlavně ^3H NMR. Pro správné vyhodnocení metabolických testů je nezbytná znalost poloh, ve kterých je vodík částečně nahrazen tritiem.

I pro aplikaci ^{14}C -značených sloučenin se otvírají nové možnosti. Použití Accelerator Mass Spectrometry (AMS) pro měření ^{14}C namísto metody založené na kapalných scintilátorech snižuje mez detekce ^{14}C o 3 až 4 řády. To vedlo k vyvinutí metody „mikrodosingu“ pro testování

nových léčiv. Při „mikrodosingu“ se aplikuje jedna setina farmakologicky účinné dávky potenciálního léku na člověka (maximálně ale 100 μg), takže odpadá riziko možných nežádoucích fyziologických účinků na lidské dobrovolníky během studie ADME. Aplikovaná aktivita 100 nCi radiouhliku ^{14}C v jedné dávce je pak tisíckrát nižší než doposud používaná. Pro ilustraci, dospělý člověk o váze 70 kg má v těle po celý svůj život 100 nCi ^{14}C pocházejícího z přírodních zdrojů. Každého pochopitelně hned napadne, že stonásobně nižší dávka ovlivní průchod látky organismem. Srovnávací studie jednoznačně prokázaly, že farmakokinetické výsledky získané s použitím „mikrodosingu“ velmi dobře korelují s výsledky získanými při aplikaci farmakologických účinných dávek a tím byla tato námitka vyvrácena. Nevýhodou AMS zatím zůstává nutnost přípravy diskretních vzorků, zatím nebyl doveden do výrobní fáze žádný přímý interface pro napojení na HPLC. Ale i na tom se ve světě usilovně pracuje.

Také další nová metoda měření zastoupení ^{14}C ve vzorku – Intracavity Optogalvanic Spectroscopy (ICOGS) – se rychle vyvíjí. Paprsek laseru s pracovní náplní 100% $^{14}\text{CO}_2$ se zavádí do optické rezonanční dutiny obsahující měřený vzorek ve formě CO_2 . Měřenou veličinou je impedance plynu v optické dutině, která závisí na poměru $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$. Dosažená citlivost je již srovnatelná s AMS. Forma vzorku, oxid uhličitý (na rozdíl od nezbytné grafitizace pro AMS), je nespornou výhodou. Zvládnuté postupy online oxidace na výstupu z chromatografických kolon lze převzít z již existujících radiometrických a MS metod. Citlivosti dosahované při stanovení obsahu ^{14}C v biologických vzorcích u obou nových metod otevírají úžasný prostor pro vývoj zcela nových postupů i v základním biologickém a biochemickém výzkumu.

Doufám, že se mi podařilo přesvědčit čtenáře tohoto časopisu o tom, že sloučeniny značené radionuklidy neztrácejí své postavení v biomedicíně výzkumu ani v konkurenci vysoce citlivých MS metod a že se bez nich ani v budoucnu neobejdeme.

Účast na práci CED-IIS byla hrazena z grantu programu INGO č. LA 288 Ministerstva školství a tělovýchovy.

T. Elbert (IOCB ASCR, v.v.i., Prague): Can Radioisotopes ^3H and ^{14}C Be Replaced in Biomedical Research?

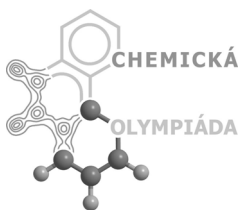
Answer to this rhetorical question is simple – absolutely not in near future. Author presents his point of view on the use of tritium and ^{14}C radionuclides in drug research based on his regular participation on international scientific meetings. Mentioned are new very sensitive techniques of radionuclide ^{14}C assay which open new horizons in basic and applied research.

Ze života chemických společností

Zpráva z prvního zasedání nově zvoleného Hlavního výboru České společnosti chemické

Hlavní výbor ČSCH, zvolený pro období říjen 2009 – září 2013 se sešel na svém prvním zasedání 6. 11. 2009 v Praze, na Novotného lávce 5. Prvním bodem jednání byla volba předsednictva Společnosti, kterou řídil předseda volební komise Vilím Šimánek. Jako členové předsednictva byli zvoleni: Jiří Barek, Pavel Drašar, Martin Fusek, Jaroslav Koča, Václav Slovák, Jitka Ulrichová a Jarmila Vinšová. Ex offio se dle Stanov stal osmým členem předsednictva vedoucí redaktor Chemických listů Bohumil Kratochvíl. Za předsedkyni Společnosti byla zvolena Jitka Ulrichová, profesorka biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Pro Jitku Ulrichovou je to druhé volební období v této funkci. Prvním místopředsedou a statutárním zástupcem předsedkyně se stal Pavel Drašar, profesor organické chemie VŠCHT Praha, druhou místopředsedkyní Jarmila Vinšová, docentka organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové a hospodářem Jiří Barek, profesor analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK. Hlavní výbor potvrdil ve funkci zvolené revizory Oldřicha Lapčíka, Ivo Paseku a Karolinu Peckovou. Nově zvolenému Hlavnímu výboru a jeho předsednictvu si dovoluji jménem všech členek a členů ČSCH blahopřát k jejich zvolení a popřát jim, aby Českou společnost chemickou po následující 4 roky řídili moudře a vždy ku prospěchu jejich členek a členů a celé obce chemické.

Vilím Šimánek



Informace k organizační změně Chemické olympiády

Chemická olympiáda (ChO) je odborná soutěž pro středoškolské studenty, která v letošním školním roce vstoupila již do svého 46. ročníku. V roce 1968 se v tehdejší Československu zrodila i mezinárodní nadstavba – Mezinárodní chemická olympiáda (IChO). Ta se v letošním školním roce tedy bude konat již po čtyřicáté druhé. Pro nejlepší soutěžící ze středních průmyslových škol existuje mladší evropská soutěž, která se koná jednou za dva roky, Grand Prix Chimique (GPCh, v roce 2009 proběhl její 10. ročník).

ChO vyhláší MŠMT ČR, které ji spolu s účastí reprezentačních týmů na IChO a GPCh také financuje. Chod soutěže po odborné stránce zajišťuje Ústřední komise ChO (ÚK ChO) ve spolupráci s pedagogy a odborníky z vysokých a středních škol, ČSCH a dalších institucí. Garantem soutěže odpovědným za organizační chod soutěže byl od počátků do roku 1989 Ústřední dům pionýrů

a mládeže Julia Fučíka, později Institut dětí a mládeže ČR (IDM) se sídlem v Gröbeho vile v pražských Havlíčkových sadech. V té době měl IDM k dispozici výborně vybavenou chemickou a biologickou laboratoř, rozsáhlou odbornou knihovnu a letní táborovou základnu v Běstvině. Laboratoře byly využívány zájmovými kroužky a pro přípravná soustředění olympiád.

V důsledku restitucí se musel IDM v roce 1995 přestěhovat a tento rok se tak stal černým rokem ChO. Kompletní archiv ChO, který sahal až do počátků soutěže, nebyl přestěhován, ale zničen. Za své vzalo i vybavení laboratoří a odborná knihovna. Od té doby byla odborná přípravná soustředění organizována na PřF UK v Praze, později i na VŠCHT Praha. V roce 2006 se IDM sloučením s dalšími organizacemi transformoval na Národní institut dětí a mládeže (NIDM). Od tohoto roku se také datuje snaha NIDM o prodej táborových základen, což by v případě Běstviny znamenalo konec tolik oblíbených odborných soustředění. Několikaleté úsilí tuto snahu odvrátit nakonec vyústilo v převedení areálu pod správu České zemědělské univerzity, která se zavázala základnu nadále poskytovat pro účely olympiád.

V lednu tohoto roku došlo v rámci ChO k další organizační změně. Ministryně školství vyhověla žádosti VŠCHT Praha stát se garantem soutěže od 1. 1. 2010. Tato změna je zejména organizačního charakteru, nijak se nedotkne stávajícího zaběhlého systému fungování soutěže ani činnosti ÚK ChO. Jediná zásadní personální změna je na pozici tajemnice ChO, od ledna se jí stala pracovnice VŠCHT Praha Mgr. Andrea Nová. Osoba tajemnice je pro hladký chod soutěže klíčová (doposud docházelo k silné fluktuaci, v průběhu posledních let se na této pozici vystřídal 6 osob).

Financování soutěže bude probíhat nadále podle pravidel MŠMT, kterými se řídí čerpání poskytnuté dotace. O možnost podporovat ChO projeví zájem i partneři VŠCHT Praha. Spolupráce s partnery a sponzory je v dnešní době s ohledem na omezený rozpočet soutěže nezbytná. O změně byla informována i Nadace Alfreda a Isabel Baderových, která patří mezi štědré podporovatele účastníků ChO a jejich učitelů.

Chemická olympiáda byla vždy společným projektem všech vysokých škol či fakult s přírodovědným a chemickým zaměřením. Tato spolupráce se odvíjí zejména ve dvou rovinách – v práci autorských kolektivů na tvorbě a recenzi soutěžních úloh, a v organizaci nejvyššího kola soutěže. Právě Ústřední kolo soutěže je pro vysoké školy příležitostí, kdy se mohou studentům představit a nabídnout jim svoje možnosti studia. V průběhu posledních let se Ústřední kolo uskutečnilo na těchto vysokých školách:

- 2004 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- 2005 Univerzita Pardubice
- 2006 Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
- 2007 Vysoké učení technické, Brno

2008 Ostravská univerzita, Ostrava

2009 PřF Univerzity Karlovy, Praha

V letošním roce se Ústřední kolo koná na VŠCHT Praha, organizace v následujícím roce se ujala Univerzita Pardubice. Nejvyšší kolo soutěže bude i nadále rotovat mezi VŠ, které o pořadatelsví projeví zájem (informace viz www.chemicka-olympiada.cz).

Vhledem k tomu, že funkční období ÚK ChO skončilo v roce 2009, proběhly v září volby pro funkční období 2010–2012. Členy ÚK ChO se automaticky stávají zástupci krajů – předsedové krajských komisí (14 členů). Volí se pouze 9 členů předsednictva, přičemž členem se může stát i zástupce kraje. V tajném hlasování na zasedání ÚK ChO dne 23. 9. 2009 byli zvoleni tito členové nového předsednictva:

Mgr. Petr Cígler, Ph.D., ÚOCHB AV ČR v.v.i., Praha

doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D., PřF, UK Praha

RNDr. Petr Holzhauser, Ph.D., FCHT, VŠCHT Praha,
předseda

Ing. Josef Janků, SPŠCH Brno

RNDr. Jan Kotek, Ph.D., PřF, UK Praha

RNDr. Karel Lichtenberg, CSc., Gymnázium Jírovcova,
České Budějovice, *místopředseda*

doc. RNDr. Václav Slovák, Ph.D., PřF, Ostravská univerzita

RNDr. Jitka Šedivá, Gymnázium Jihlava, *místopředsedkyně*

prof. Ing. Karel Ventura, CSc., FCHT, Univerzita Pardubice,
zástupce ČSCH

Pevně věřím, že se spolupráce vysokých škol na všech úrovních soutěže bude i nadále rozvíjet a přeji Chemické olympiádě do nového roku mnoho zdaru a hodně zapálených účastníků!

RNDr. Petr Holzhauser, Ph.D.

předseda ÚK ChO

www.chemicka-olympiada.cz

Mgr. Filip Teplý Ph.D., nositel Ceny Alfreda Badera za organickou chemii v roce 2009

Nový nositel je v pořadí šestnáctý, který tuto cenu pro české chemiky do 35 let získal. Dr. Teplý (33 let) z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR předložil do soutěže soubor prací o syntézách helikálních sloučenin. Slavnostní předání Ceny* se tradičně uskutečnilo na 44. konferenci „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – Liblice 2009“ konané ve dnech 27.–29.11.2009 v Nymburku. Na této konferenci, opět tradičně, nový laureát přednesl plenární přednášku na téma oceněného souboru prací s názvem „Helquat a tvorba vazeb C-C prostřednictvím organokovů v přítomnosti biologického materiálu“.

Nový nositel Ceny se narodil v Hradci Králové v roce 1976. Vysokoškolské studium zahájil na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v r. 1994, kde získal titul bakaláře v r. 1997. Diplomovou práci v magisterském studiu vypracoval na již výše zmíněném ÚOCHB AVČR pod

vedením Dr. I. Starého a obhájil ji v r. 1999. Pod stejným vedoucím pokračoval v doktorském studiu na AV ČR a rovněž téma bylo do jisté míry pokračováním problematiky helikální chiralitě za uplatnění katalýzy sloučeninami přechodných kovů. Část doktorského studia absolvoval u prof. P. Kočovského (University of Glasgow, UK). Po získání vědecké hodnosti (2003) absolvoval v letech 2004 až 2006 zahraniční stáže na Max-Planck-Institut, Mülheim (prof. A. Fürstner) a na University of Glasgow (prof. P. Kočovský). Od r. 2007 je vedoucím pracovní skupiny organické syntézy na ÚOCHB AV ČR, výzkumné práce jsou v současnosti financovány ze tří grantových projektů. Laureát publikoval 29 původních sdělení v předních vědeckých časopisech a je prvním autorem na dvou patentových přihláškách.

Nový nositel Ceny získal ocenění za své výsledky také dříve, a to 1. cenu firmy Sigma-Aldrich (2001), Národní cenu české vlády Prix Academia udělovanou studentům (2002), Cenu firmy Rhodia ČR a Francouzského velvyslanectví (2003) a konečně Cenu ÚOCHB AV ČR za dizertační práci (2004).

Srdečně blahopřejeme k získání prestižní Ceny Alfreda Badera a přejeme hodně dalších odborných úspěchů.

Dosavadní nositelé Ceny Alfreda Badera 1: 1) RNDr. Ivo Starý CSc. (1994), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha. 2) RNDr. Martin Smrčina CSc. (1995), Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha. 3) Dr. Ing. Vladimír Havlíček (1996), Mikrobiologický ústav AVČR, Praha. 4) Ing. Pavel Lhoták CSc. (1997) Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. 5) Ing. Michal Hoskovec CSc. (1998), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha. 6) Ing. Michal Hocek CSc. (1999), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha. 7) Ing. Vladimír Církva Ph.D. (2000), Ústav chemických procesů AVČR, Praha. 8) Doc. RNDr. Milan Pour Ph.D. (2001), Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové. 9) Mgr. Štěpán Vyskočil Ph.D. (2002), Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha. 10) Mgr. Tomáš



Foto: Prof. Oldřich Paleta předává ceny Janu Kotkovi a Filipu Teplému – laureátům Ceny Alfreda Badera pro rok 2009.

Kraus PhD. (2003), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha. 11) Ing. Dana Hocková CSc. (2004), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha. 12) Ing. Radek Cibulka PhD. (2005), Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. 13) Doc. RNDr. Petr Štěpnička PhD. (2006), Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha. 14) Doc. Ing. Jiří Hanusek PhD. (2007), Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice. 15) Doc. Ing. Aleš Růžička PhD. (2008), Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice.

*) Hodnotící komise: Prof. P. Drašar (tajemník), Prof. D. Dvořák, Prof. J. Hlaváč, Prof. A. Klásek, Prof. M. Kotora, Prof. V. Macháček, Prof. M. Potáček, Prof. O. Paleta (předseda), Dr. I. Starý, Prof. T. Trnka, Prof. M. Pour, Dr. J. Závada.

Oldřich Paleta

Přihlášky do soutěží o Ceny Alfreda Badera v r. 2010

V roce 2010 bude Česká společnost chemická tradičně pořádat soutěže o dvě prestižní Ceny Alfreda Badera. „Starší“ Cena od r. 1994 je za *organickou chemii*, „mladší“ Cena je od r. 2002 udělována za *bioorganickou a bioorganickou chemii*. Oblasti působení obou Cen se mohou více či méně překrývat. V minulých ročnících se stávalo, že soubor prací, který neuspěl v jedné soutěži, byl přihlášen do soutěže o druhou Cenu – a zde uspěl. Nadále však platí omezení, že je možno získat jen jednu z Cen Alfreda Badera pro české chemiky, přitom obě Ceny jsou rovnocenné.

Uzávěrka přihlášek do konkurzu o „Cenu za organickou chemii v roce 2010“ byla stanovena na 15. červen 2010 (případně jde o datum poštovního razítka). Podmínky a náležitosti přihlášky zůstávají stejné jako v minulých letech: Cena se uděluje za práce v oblasti organické chemie uchazečům české státní příslušnosti, kteří nepřekročí věk 35 let v den uzávěrky přihlášek a nemají hlavní pracovní poměr v zahraničí (postdoktorská stáž se za takový pracovní poměr nepovažuje). Soubory přihlášených prací mohou rovněž zahrnovat studie mechanismů. Na druhé straně do působnosti Ceny nepřísluší práce z analytické oblasti (včetně strukturní analýzy), rovnováh a výpočetní chemie. Uchazeči o Cenu se zpravidla přihlašují sami na

sekretariátu České společnosti chemické (Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1), návrh však mohou podat také kolegové, instituce a rovněž vědecké rady a senáty. *Cena je udělována nejlepšímu souboru prací bez ohledu na to, kolikrát se autor o ni ucházel. Od r. 2005 je Cena je dotována částkou 3300 USD.* Tato úprava odpovídá původní dotaci a týká se obou Cen.

Uzávěrka přihlášek do konkurzu o „Cenu za bioorganickou a bioorganickou chemii v roce 2010“ byla stanovena na 31. březen 2009. Přihlášky musí obsahovat stejné náležitosti jako přihlášky do konkurzu o Cenu za organickou chemii.

K přihlášce je potřeba zaslat následující materiály: 1) Hlavní částí přihlášky jsou *separáty* publikovaných prací přihlášených do soutěže a 2) k nim zpracovaný *souhrn vlastních výsledků* s příslušným komentářem o tom, v čem spočívá přínos prací, v rozsahu do 10 běžných strojopisných stran. Souhrn obsahuje vhodná schémata a struktury ilustrující výsledky uchazeče, dále jsou v souhrnu uvedeny citace jen na vlastní práce, které jsou předmětem soutěže. 3) V *seznamu publikací* se hvězdičkou označí autor, který práci podal do redakce a vyřizoval komunikaci s redakcí. Rada publikací vzniká týmovou činností, a z toho důvodu je potřeba v seznamu publikací uvést, jak se uchazeč na publikaci a jejím zveřejnění podílel (např. šlo (zčásti) o výsledky diplomové práce, výsledky doktorské práce, (zčásti) řešení grantu získaného uchazečem, samostatně řešenou část projektu, uchazeč udělal syntézy, jde o vlastní projekt, výsledky diplomanda nebo doktoranda – které uchazeč školil apod.). Nedoporučuje se hodnotit svůj podíl procentuálně. 4) Přiložený *životopis* by měl zachytit odborný vývoj, např. téma diplomové a doktorské (kandidátské disertace) se jménem školitele, pracovní zařazení, získaná ocenění, stáže a jejich tematické zaměření, získané granty apod. Hodnotící komise posuzuje soubory prací nezávisle na doporučeních školitelů, vedoucích apod., takže přihláška je plně platná a plnohodnotná i bez těchto doporučení. Na druhé straně *pokud zasláné materiály nebudou úplné, nemohou být zařazeny do soutěže.*

Na závěr zdůraznění – **uzávěrka do soutěže o Cenu Alfreda Badera za bioorganickou a bioorganickou chemii je již 31. března 2010 a do soutěže za organickou chemii je 15. června 2010**, což může být v obou případech datum poštovního razítka na zápisce s přihláškou.

Oldřich Paleta, předseda Komise pro Cenu Alfreda Badera 1
Tomáš Trnka, předseda Komise pro Cenu Alfreda Badera 2

Akce v ČR a v zahraničí

rubriku kompiluje Lukáš Drašar, drasarl@centrum.cz

Rubrika nabyla takového rozsahu, že ji není možno publikovat v klasické tištěné podobě. Je k dispozici na webu na adrese <http://konference.drasar.com>. Pokud má některý čtenář potíže s vyhledáváním na webu, může se

o pomoc obrátit na sekretariát ČSCH. Tato rubrika nabyla již tak významného rozsahu, že ji po dohodě přebírají i některé zahraniční chemické společnosti.

Členská oznámení s služby

Profesoři jmenovaní s účinností od 18. září 2009

Prof. Martin Hof, Dr. DSc.
pro obor fyzikální chemie
na návrh Vědecké rady UP Olomouc

Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
pro obor farmaceutická chemie
na návrh Vědecké rady UK Praha

Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
pro obor biochemie
na návrh Vědecké rady UK Praha

Prof. Ing. Andréa Kalendová, Dr.
pro obor chemie a technologie anorganických materiálů
na návrh Vědecké rady Univerzity Pardubice

Prof. Ing. Simeon Karamazov, Dr.
pro obor materiálové vědy a inženýrství
na návrh Vědecké rady VŠB-TU Ostrava

Prof. RNDr. Josef Komenda, CSc.
pro obor biochemie
na návrh Vědecké rady UP Olomouc

Prof. RNDr. Ludmila Křivánková, CSc.
pro obor analytická chemie
na návrh Vědecké rady MU Brno

Prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčák
pro obor biochemie
na návrh Vědecké rady VŠCHT Praha

Prof. Ing. Jan Masák, CSc.
pro obor biotechnologie
na návrh Vědecké rady VŠCHT Praha

Prof. Ing. Lucie Obalová, Ph.D.
pro obor chemická metalurgie
na návrh Vědecké rady VŠB-TU Ostrava

Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
pro obor fyzikální chemie
na návrh Vědecké rady VUT Brno

Prof. Dr. Ing. Jaroslav Sojka
pro obor materiálové vědy a inženýrství
na návrh Vědecké rady VŠB-TU Ostrava

Prof. Ing. Petra Šulcová, Ph.D.
pro obor chemie a technologie anorg. materiálů
na návrh Vědecké rady Univerzity Pardubice

Prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
pro obor analytická chemie
na návrh Vědecké rady Univerzity Pardubice

Docenti jmenovaní od února do října 2009

Doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.
pro obor analytická chemie, Univerzita Pardubice

Doc. Ing. Peter Baran, CSc.
pro obor anorganická chemie, Univerzita Palackého,
Olomouc

Doc. Ing. Radek Cibulka, Ph.D.
pro obor organická chemie, VŠCHT Praha

Doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.
pro obor analytická chemie, Univerzita Pardubice

Doc. Ing. Jiří Dohnal, CSc., MBA
pro obor farmaceutická chemie, VFU Brno

Doc. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D.
pro obor farmaceutická chemie, VFU Brno

Doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.
pro obor Hygiena a technologie potravin, VFU Brno

Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.
pro obor Lékařská farmakologie, Univerzita Palackého,
Olomouc

Doc. Ing. et Ing. Ivo Kuřitka, Ph.D. et Ph.D.
pro obor technologie makromolekulárních látek, UTB Zlín

Doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
pro obor fyzikální chemie, Univerzita Palackého, Olomouc

Doc. Ing. Šárka Langová, CSc.
pro obor chemická metalurgie, VŠB-TU Ostrava

Doc. Ing. Michal Příbyl, Ph.D.
pro obor chemické inženýrství, VŠCHT Praha

Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.
pro obor biochemie, UK Praha

Doc. Ing. Petr Slobodian, Ph.D.
pro obor technologie makromolekulárních látek, UTB Zlín

Doc. Ing. Vojtěch Spiwok, Ph.D.
pro obor biochemie, VŠCHT Praha

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
pro obor analytická chemie, UK Praha

Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.
pro obor biochemie, UK Praha

Doc. Ing. Jiří Štětina, CSc.
pro obor technologie potravin, VŠCHT Praha

Doc. Ing. Petr Tomčík, Ph.D.
pro obor materiálové vědy a inženýrství, VŠB-TU Ostrava

Doc. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.
pro obor analytická chemie, UK Praha

Doc. PharmDr. et Mgr. David Vetchý, Ph.D.
pro obor farmaceutická technologie – galenická farmacie,
VFU Brno

Noví členové ČSCH

Adamec Martin, Ph.D., PedF UK Praha
Bílková Eliška, Bc., studující Univerzity Pardubice
Bláha Pavel, studující FJFI ČVUT Praha
Čigl Martin, Bc., studující VŠCHT Praha
Čech Petr, Bc., studující VŠCHT Praha
Čerňová Miroslava, Mgr., studující ÚOCHB AV ČR v.v.i.
Praha
Čížková Věra, doc.RNDr., CSc., PŘF UK Praha
Daďová Jitka, Bc., studující VŠCHT Praha
Dostál Radim, Ing., studující ÚOCHB AV ČR v.v.i. Praha
Fišerová Alena, VÚANCH Ústí nad Labem
Florová Petra, Mgr., studující PŘF UP Olomouc
Fraňková Veronika Bc., studující VŠCHT Praha
Fribert Petr, Ing., studující VŠCHT Praha
Fuitová Lucie, Ing., studující VŠCHT Praha
Hanzlová Věra, Bc., studující VŠCHT Praha
Havelcová Martina, Mgr., Ph.D., ÚSMH AV ČR v.v.i. Praha
Herzegová Lenka, Ing., studující VŠCHT Praha
Holba Pavel, Ing., CSc., Praha
Hrvolová Barbora, studující PŘF Ostravské univerzity Ostrava
Hundáková Marianna, Ing., studující VŠB Ostrava

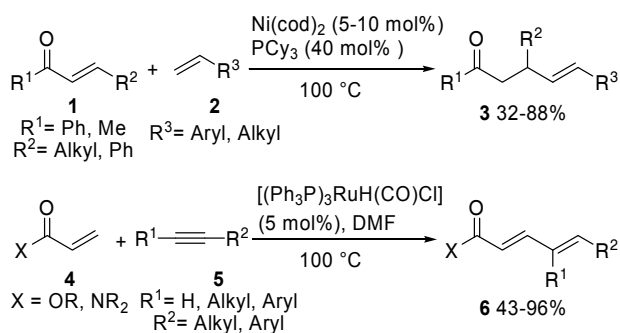
Chevko Alexej, studující VŠCHT Praha
Kment Ondřej, studující gymnázia Opava
Knittlová Petra, Ing., studující Univerzity Pardubice
Kobliha Daniel, Mgr., studující FJFI ČVUT Praha
Kociánová Radana, Mgr., studující ÚFCH AV ČR v.v.i. Praha
Kocman Mikuláš, studující PŘF UP Olomouc
Kořuha Jan, Bc., studující PedF ZČU Plzeň
Kozák Ondřej, Ing., studující VŠB Ostrava
Krenk Ondřej, Mgr., studující FarmF UK Hradec Králové
Kubala Martin, RNDr., Ph.D., PŘF UP Olomouc
Kubička David, Ing., Ph.D., VÚANCH Litvínov
Kudrlička Ladislav, Ing., VÚANCH Ústí nad Labem
Linhová Michaela, Ing., studující VŠCHT Praha
Lipovský Jakub, Ing., studující VŠCHT Praha
Liška Alan, studující PŘF UK Praha
Lučaníková Mária, Mgr., Ph.D., ÚJV Řež a.s. Řež
Macíčková-Cahová Hana, Ing., studující ÚOCHB AV ČR v.v.i.
Praha
Martinů Tomáš, Ing., Ph.D., VŠCHT Praha
Matoušková Šárka, Mgr., studující PŘF UK Praha
Merová Barbora, Mgr., LF UP Olomouc
Motyčka Jan, Bc., studující VŠCHT Praha
Neuwirthová Lucie, Ing., studující VŠB Ostrava
Paterová Jana, Bc., studující VŠCHT Praha
Pečová Michaela, Mgr., studující PŘF UP Olomouc
Pechar Michal, Ing., CSc., ÚMCH AV ČR v.v.i. Praha
Plachá Daniela, Ing., Ph.D., VŠB Ostrava
Polívková Kateřina, studující ÚOCHB AV ČR v.v.i. Praha
Ponomarov Alexandr, studující Univerzity Pardubice
Popr Martin, Bc., studující PŘF UK Praha
Pustková Petra, Ing., studující VŠB Ostrava
Rambousek Lukáš, studující Fyziologického ústavu AV ČR
v.v.i. Praha
Rejšek Jan, studující PŘF UK Praha
Rohlíček Jan, Ing., studující VŠCHT Praha
Soukup Ondřej, Mgr., studující FVZ UO Hradec Králové
Svoboda Ladislav, Ing., Plzeňský Prazdroj a.s. Plzeň
Svozil Daniel, Mgr., Ph.D., VŠCHT Praha
Šeděnková Ivana, ÚMCH AV ČR v.v.i. Praha
Šimková Ludmila, Mgr., studující VŠCHT Praha
Šustrová Barbora, Mgr., studující PŘF UK Praha
Táborská Zdeňka, studující PŘF UK Praha
Toufarová Martina, Ing., studující FJFI ČVUT Praha
Tydlitát Jiří, Ing., studující Univerzity Pardubice
Yosypchuk Oksana, Bc., studující PŘF UK Praha
Zgarbová Marie, Mgr., studující PŘF UP Olomouc

Anglické okénko, horké novinky z chemie

Direct Catalytic Hydrovinylation of α,β -Unsaturated Ketones and Alkynes

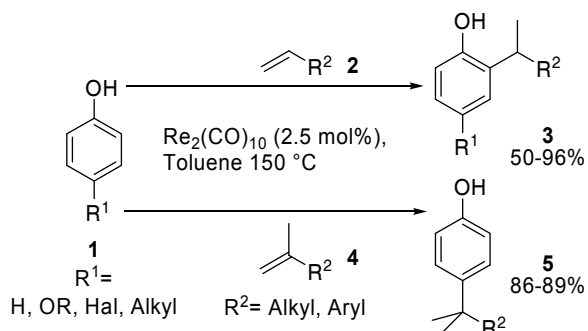
The selective direct coupling of unfunctionalized alkenes with multiple-bond systems is an almost unexplored field. The Ogoshi and Plietker groups present now two complementary methods applying such couplings. Ogoshi et al. reported the direct conjugate addition of ole-

fins **2** to α,β -unsaturated ketones **1** giving **3** in good yields using a $\text{Ni}(\text{cod})_2/\text{tricyclohexylphosphine}$ catalyst system [J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 10350]. Neisius and Plietker applied a ruthenium catalyst to perform direct additions of acrylate derivatives **4** to terminal or internal alkynes **5** [Angew. Chem. Int. Ed. 48, 5752 (2009)]



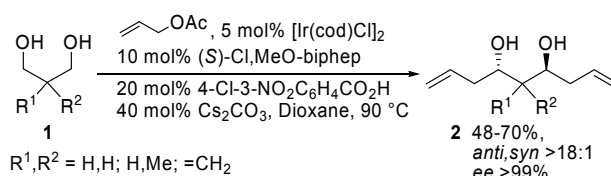
Regioselective Synthesis of Alkylated Phenols

The regioselective synthesis of alkyl phenols is not trivial even today, especially when branched alkyl groups should be introduced. Kuninobu and coworkers developed a Re-catalyzed method for the selective coupling of alkenes to phenols **1**, which is *ortho*-selective providing **3** when linear olefins **2** are applied, even if the *para*-position is unsubstituted. 1,1-Disubstituted olefins **4** react in contrast selectively at the *para*-position under similar conditions furnishing **5**. An additional advantage of the method compared to the commonly used Friedel-Crafts alkylation is that multiple substitution does not occur. [J. Am. Chem. Soc. *131*, 9914 (2009)]



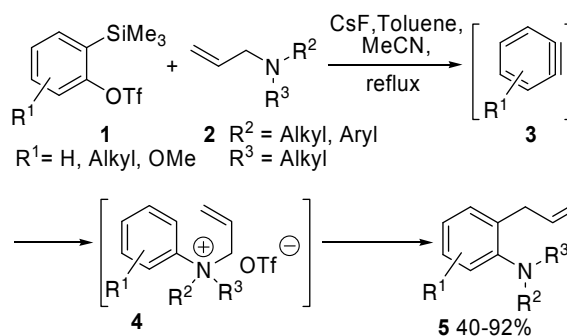
1,n Glycols as Carbonyl Equivalents for the Fast Construction of Polyketide Segments

The asymmetric allylation of carbonyl compounds is one of the most important methods for the synthesis of homoallylic alcohols, which are versatile building blocks in natural product synthesis. Dialdehydes, such as malonic or succinic aldehydes are in principle also attractive for the bidirectional construction of polyketide skeletons. Their low stability and high reactivity prevent such applications. Krische and coworkers devised a very useful alternative, in which the corresponding diols **1** were subjected to iridium-catalyzed oxidation and subsequent allylation with allyl acetate to afford bis(homoallyl alcohols) **2**. This approach allows a catalytic quick entry to defined stereotriads with high enantiomeric excess. [Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 5018 (2009)]



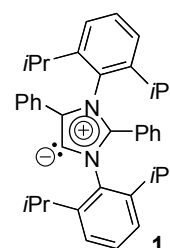
Arynes and Allylic Amines in Azonia-Claisen Rearrangements

Aza-Claisen rearrangements of *N*-allyl anilines are in contrast to the classical rearrangement of allyl aryl ethers not facile. They require harsh conditions and the substrate scope is very limited. Greaney and coworkers found now, that azonia-Claisen rearrangements are efficient when arynes **3**, which are easily accessible in situ from *ortho*-trimethylsilylaryl triflates **1**, react with allylamines **2** to ammonium ions **4**. Functionalized allylanilines **5** become available in mostly good yields and selectivities using this method. [Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 5199 (2009)]



A Crystalline “Abnormal” Heterocyclic Carbene

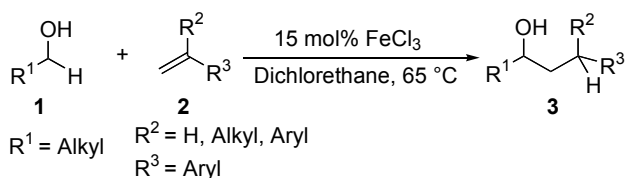
Stable carbenes are a very hot research topic, since they can serve as excellent ligands in transition metal catalysis or they can act even as organocatalysts themselves. The most common known heterocyclic carbenes are imidazole-based and have the divalent carbon in position two between the two nitrogen atoms. Not much is known about structures which bear the carbene in different ring positions. The Frenking and Bertrand groups report now the preparation of a imidazole carbene at C5 **1** by deprotonation of the corresponding imidazolium salt by KHMDS and its structure determination by X-ray crystallography.



The compound can be stored for a few days at room temperature and undergoes the typical carbene reactions, such as coordination to metals, carboxylation or C-H activation reactions. [Science 326, 556 (2009)]

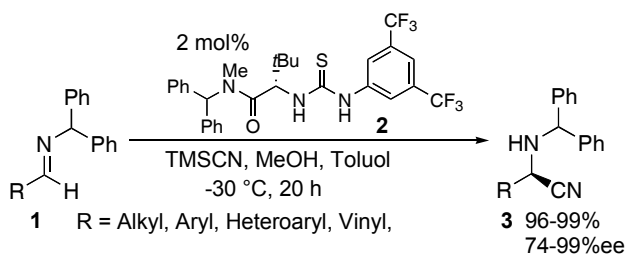
Catalytic Alkylation of Alkenes with Alcohols

The catalytic C-C bond formation based on C-H activation is one of the most attractive but also most challenging strategy for the sustainable synthesis of functionalized organic compounds. The methodic arsenal to accomplish this goal is still hardly developed. Tu and coworkers communicated a methodology to react alcohols **1** with olefins **2** using iron catalysis. A broad range of substrates can be used to synthesize functionalized alcohols **3**. The reaction proceeds via hydrogen transfer from **1** to the iron catalyst, addition of the coordinated hydroxyalkyl radical to the alkene and reduction of the resulting radical to **3**. [Angew. Chem. 121, 8917 (2009)]



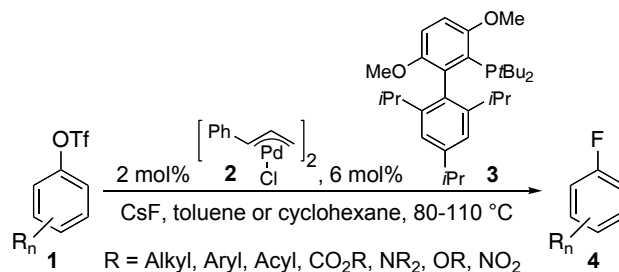
Simple and Highly Enantioselective Approach to Non-natural Amino Acids by a Strecker Reaction

Non-natural enantiomerically pure α -amino acids are indispensable building blocks in medicinal chemistry and biology. Their preparation in large scale and high optical purity takes, however, a huge effort. Jacobsen and coworkers describe now a simple and easily scalable Strecker reaction of *N*-benzhydryl imines **1** with trimethylsilyl cyanide in the presence of the *N*-*tert*-leucine thiourea catalyst **2**. The reaction provides a broad range of (*R*)-amino nitriles **3** under very mild conditions in high yields and good to excellent enantioselectivities. The corresponding amino acids were liberated from **3** by standard acid treatment. [Nature 461, 968 (2009)]



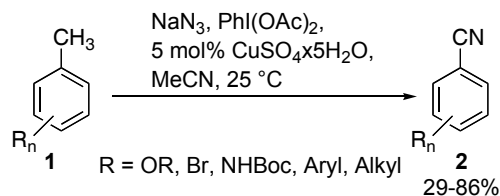
Aryl Fluorides Catalytic from Phenols

Fluorinated aromatic compounds enjoy a strongly growing interest, since they influence the stability, solubility, bioavailability as well as processing of agrochemicals, pharmaceuticals and organic electronic materials favorably. Their production is, however, not easy and requires often expensive starting materials and/or reagents. The Buchwald group found now that the selective fluorination of aryl triflates **1**, which are easily accessible from phenols, succeeds with cesium fluorides as the fluoride source and a catalyst generated in situ from (cinnamyl)palladium chloride dimer **2** and ligand **3**. The transformation proceeds under comparably mild conditions in good yields. Key to success is the catalyst structure, from which the otherwise difficult reductive elimination of aryl or heteroaryl fluorides **4** from the corresponding arylpalladium fluoride intermediates occur easily. [Science 325, 1661 (2009)]



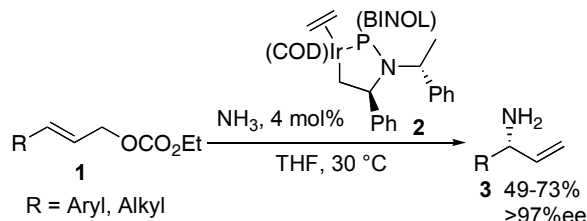
Mild direct Conversion of Methylarenes in Benzonitriles

The Sandmeyer reaction or the dehydration of primary benzamides were commonly used for the preparation of substituted benzonitriles in the past, which require harsh conditions, toxic reagents, and produce metal waste. A direct method comparable to the ammoxidation of propene requires drastic conditions. Zhou and coworkers report now a direct synthesis of substituted benzonitriles **2** from cheap methylarenes **1**, sodium azide and iodobenzene diacetate. The reaction follows a radical mechanism via the oxidatively generated azidyl radical. [Angew. Chem. Int. Ed. 121, 7228 (2009)]



Asymmetric Allylic Alkylations now also with Ammonia

The selective catalytic synthesis of primary allylic amines is still not easily accomplished and it remains



a challenge to use ammonia as the nitrogen source. It is especially difficult to use ammonia in metal-catalyzed transformations, because it acts competitively as a good ligand for transition metals and diminishes thus the catalytic activity. Hartwig and colleagues present a method, in which linear achiral allylic carbonates **1** react with NH_3 in the presence of the chiral iridium catalyst **2**. The transformation provides a direct access to 1-substituted chiral allylic amines **3** in good yields and high enantioselectivities.

Ulrich Jahn

Odborná setkání

40. Zasedání Divize analytické chemie Evropské asociace pro chemické a molekulární vědy (Division of Analytical Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Science)

40. výroční zasedání DAC EuCheMS proběhlo 6. září 2009 v Innsbrucku v návaznosti na mezinárodní konferenci EUROANALYSIS XV, která se konala ve dnech 6. až 10. září 2010 rovněž v Innsbrucku, a který patří mezi největší evropské analytické konference. V této souvislosti je potěšitelné, že této významné konferenci se zúčastnilo 36 vědců z České republiky, čímž jsme obsadili čestné 4. místo v pomyslné soutěži národních účastí na této konferenci. Lze jen doufat, že tento trend bude pokračovat i v budoucích konferencích této úspěšné řady. Autor tohoto článku přednesl na této konferenci jako jeden z mála českých účastníků referát na téma “New Electrode Materials and Arrangements for Voltammetric and Amperometric Determination of Organic Environmental Pollutants”.

Zasedání DAC se zúčastnili zástupci 25 evropských chemických společností z 21 evropských zemí. Byly na něm projednány otázky související s činností DAC, příprava analytické sekce na 3. Evropském chemickém kongresu v Norimberku (29. srpna – 20. září 2010) a na 4. Evropském chemickém kongresu v Praze (26.–30. srpna 2012), jehož pořádáním byla pověřena Česká společnost chemická, příprava konference EUROANALYSIS XVI, která proběhne 11.–15. září 2011 v Bělehradě a konference EUROANALYSIS XVII, která se bude konat ve Varšavě ve dnech 25.–29. srpna 2013.

Účast zástupce České společnosti chemické na práci DAC FECS byla umožněna grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu INGO LA 273 (2009) (Reprezentace české analytické chemie v Evropské asociaci pro chemické a molekulární vědy) a jednak laskavou podporou firem Merck s.r.o.

Praha a ChromSpec, Praha. Je milou povinností autora poděkovat výše uvedeným firmám za jejich pochopení a podporu aktivit České společnosti chemické a odborné skupiny analytické chemie. Všechny materiály související s činností DAC EuCheMS jsou k dispozici na níže uvedené adrese.

Jiří Barek,
zástupce České společnosti chemické v DAC EuCheMS

61. Zjazd chemikův

61. Zjazd chemikův sa konal v dňoch 7. – 11. 9. 2009 už tradične v hoteli Hutník v Tatranských Matliaroch. V hoteli bolo ubytovaných 470 účastníkov zjazdu a prebiehali tam prednáškové a posterové sekcie ako aj spoločenský program. K dispozícii boli aj bazén, sauna, masáže, kolký a telocvičňa určené na relax a šport po prednáškach a v neposlednom rade aj dva hotelové bary. V prvý deň bola od rána registrácia účastníkov, ktorí v ruksakoch dostali konferenčné materiály vrátane zborníka príspevkov uverejneného v časopise ChemZi. Od 17,00 mali členovia SCHS možnosť prísť na Valné zhromaždenie SCHS, kde sa mohli informovať a zároveň aj mali možnosť svojimi nápadmi a názormi ovplyvniť činnosť a smerovanie spoločnosti. Večer od 19,00 sa konal Uvitací večierok, kde všetkých prítomných pozdravili predseda SCHS Milan Drábik a riaditeľ hotela Ján Čelinák.

V utorok, 8. 9. 2009 v kine Tatry v Tatranskej Lomnici bolo slávnostné otvorenie zjazdu za účasti predstaviteľov chemických spoločností a hlavných sponzorov. Program moderoval predseda organizačného výboru Dušan Velič a účastníkom zjazdu sa najprv prihovoril predseda SCHS Milan Drábik a za mesto Vysoké Tatry prednosta Juraj Hudáč. Pozvaným čestným hosťom zjazdu bol predseda SAV prof. Jaromír Pastorek, ktorý predniesol plenárnu prednášku na aktuálnu a zaujímavú tému „Diagnostické



Foto: Slávnostné odovzdávanie Pamätnej medaily SCHS čestnému hosťovi a plenárnemu prednášajúcemu prof. J. Pastorekovi, vpravo predseda SCHS M. Drábik

a terapeutické využitie sulfónamidov ako inhibítorov karboonických anhydráz“. Predseda SCHS mu pri tejto príležitosti odovzdal Pamätnú medailu Slovenskej chemickej spoločnosti. Medzi pozvanými hosťami vystúpila aj predsedkyňa ČSCH prof. Jitka Ulrichová a vo svojom príhovore pozvala všetkých prítomných na 62. zjazd, ktorý sa bude konať v roku 2010 v Pardubicách. Ďalej vystupovali hostia z akademickej aj priemyselnej sféry ako aj zástupcovia hlavných sponzorov: Ing. D. Dörnerová za Sigma-Aldrich, Ing. J. Mlynár za Shimadzu, doc. J. Lederer za Českú asociáciu priemyselných spoločností ako aj ďalší hostia Š. Petkanič za ZCHFP a dlhoročný priaznivec SCHS J. Kollár.

Po skončení slávnostného otvorenia sa poobede začali prednášky v šiestich sekciách s celkovo 8 pozvanými prednášajúcimi:

Prof. Ing. Jozef Lehotay, DrSc.: Význam analytickej chémie v súčasnosti, *Ústav analytickej chémie, FCHPT STU Bratislava*

Ing. Jozef Rychlý, DrSc. a Ing. Lýdia Rychlá, DrSc.: Svetelná emisia z teplom iniciovanej oxidácie polymérov a jej vzťah so zvyškovou stabilitou polymérneho materiálu, *Ústav polymérov, SAV Bratislava*

Prof. Ing. Vladimír Filip, CSc.: Možnosti využitia rastlinných olejů, *Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha*

Prof. Ing. Vladimír. Kvasnička, DrSc.: Umelá chémia a Darwinova evolúcia, *Ústav aplikovanej informatiky, FCHPT STU Bratislava*

Prof. PhDr. Ľubomír Held, CSc. a Doc. Ing. Ján Reguli, CSc.: „Last Reaction Hero“ – Hrozí koniec chemikov na Slovensku?, *Katedra chémie, PdF TU Trnava*

Dr. Ing. Robert Mistrík: *De novo* určovanie chemickej štruktúry látok pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie, *HighChem s.r.o., Bratislava*

Dr. Roman Szücs: Vplyv inovácie v separačných metódach na vývoj nových farmaceuticky aktívnych látok a produktov, *Pfizer Global R&D Analytical R&D, Sandwich, UK*

Po dva večery prebiehala posterová sekcia v hotelovej telocvični spojená najprv s vínnym večerom, kde sa podávali značkové vína od sponzora zjazdu, firmy Chowanica a Krajčírovič, Vínné pivnice Svätý Jur. Prijemným sprestrením večera bola účasť p. Chowanica so zaujímavou prednáškou o produkovaných vínach a následnou búrlivou diskusiou. Druhá časť posterovej sekcie bola spojená so spoločenským pivným večerom, kde sa podávalo čapované pivo a kofola od miestneho pivovaru Pilsberg, s.r.o. v Poprade. Počas tohto večera sa konal aj slávnostný večer s názvom 80 rokov SCHS, kde prednášajúci spomínali na históriu a úspechy SCHS v uplynulých rokoch. Počas posterovej sekcie zároveň prebiehala súťaž o najlepší poster v dvoch kategóriách, mladí vedeckí pracovníci do 35 rokov a študenti. Ďalšou možnosťou zúčastniť sa súťaže na zjazde bola sekcia pod názvom Cena Shimadzu ako súčasť prednáškových sekcií. Súťažilo 10 vybraných študentov a mladých chemikov do 30 rokov s prednáškami o výsledkoch nameraných ľubovoľnou analytickou technikou pred odbornou porotou.

Vrcholným a záverečným spoločenským podujatím bol Spoločenský večer s goralskou muzikou. Na úvod sa podával už tradičný prípitok hruškovica a potom všetkých na večierku privítal predseda SCHS Milan Drábik. Vyhlásili sa aj výsledky všetkých súťažných sekcií a odovzdali sa diplomy a ceny úspešným študentom a mladým vedcom. Potom už len zábava voľne plynula, gorali hrali do tanca a azda každý účastník našiel svoj spôsob, ako sa na večierku dobre cítiť a zabaviť.

V posledný deň konferencie odzneli v doobedňajších hodinách posledné odborné prednášky v sekciách a záverom zjazdu bola panelová diskusia, kde garanti a pozvaní prednášatelia zhodnotili priebeh zjazdu a vyjadrovali sa k otázkam z publika. Zjazd sa definitívne ukončil posledným obedom a účastníci, ktorí ostali až do konca, odchádzali pripravenými autobusmi k vlakovkej stanici do Popradu. Na záver ostáva poďakovať všetkým, ktorí prispeli k celkovej dobrej atmosfére zjazdu a vysloviť prianie, nech sa na zjazde v Tatrách stretne aj nabudúce.

Monika Aranyosiová

Prednáškového turné v Rakousku. Mé zkušenosti a dojmy

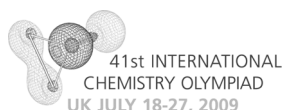
V létě 2009 jsem přijal nominaci České společnosti chemické přednést výsledky své práce na vybraných rakouských univerzitách v rámci dohody o spolupráci mezi ČSCH a Rakouskou chemickou společností. Výměna mladých přednášejících se uskutečňuje od roku 2006, střídavě na české a rakouské straně. Podle smlouvy se přednášky mají uskutečnit na dvou až třech institucích. Mým prvním zastavením byla 13. konference Österreichische Chemietage, konaná 24.–27. srpna 2009 ve Vídni. Zde jsem v sekci analytická chemie vystoupil s přednáškou „Analytical Methods for Plant Hormones Cytokinins“. První část přednášky byla věnována moderním přístupům

k izolaci, purifikaci a finální analýze jedné skupiny fytohormonů – cytokininů. V druhé, aplikační části, jsem hovořil o využití moderních analytických metod (UPLC-MS/MS, CE-MS/MS) při studiu metabolismu cytokininů, přenosu cytokininového signálu a při studiu interakcí s dalšími fytohormony. Podrobnější verzi přednášky jsem měl možnost přednést v rámci přednášek Rakouské chemické společnosti počátkem listopadu na Fakultě chemie a farmacie Univerzity v Innsbrucku. Mým pozorným hostitelem byl prof. Hubert Huppertz z Ústavu obecné, anorganické a teoretické chemie, který se věnuje chemii pevných látek. Velmi inspirující byly jeho názory na význam demonstrativních přednášek. Každý výklad obecné a anorganické chemie doplňuje velmi zajímavými pokusy. Jeho přednášky jsou hojně navštěvovány a v průběhu Dnů otevřených dveří jen kapacita přednáškového sálu je nedovoluje shlédnout všem zájemcům z řad veřejnosti. Poslední, třetí přednášku jsem měl na Fakultě technické chemie, chemických procesů a biotechnologie Technické univerzity ve Štýrském Hradci. Přesto, že její obsah byl poměrně

dost tématicky vzdálený technické chemii, kterou studují tamní studenti, diskuse byla mnohem živější, zajímavější a delší než bývá, dle mých zkušeností, zvykem na naší akademické půdě. Chtěl bych poděkovat prof. Hubertu Huppertzovi (Ústav obecné, anorganické a teoretické chemie, Univerzita Innsbruck) za nesmírně poutavý výklad o „High-pressure chemistry“, prof. Georgu Gescheidtovi, prof. Günteru Gramppovi a Dr. Brigitte Bitschnau (Ústav fyzikální a teoretické chemie, Technická univerzita ve Štýrském Hradci) za diskusi o základním, aplikovaném výzkumu a způsobu financování vysokých škol, vědy a výzkumu v Rakousku a prof. Robertu Safovi za diskusi o MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii. Dr. Erichu Leitnerovi, tajemníkovi Rakouské chemické společnosti, děkuji za péči, kterou věnoval koordinaci mého přednáškového turné a České společnosti chemické za jedinečnou možnost přednést výsledky své výzkumné práce a diskutovat je s rakouskými kolegy.

*Petr Tarkowski
Katedra biochemie PřF UP Olomouc*

Chemik na cestách



Taková (ne)obyčejná olympiáda

Po několika nejrůznějších kolech a výběrových soustředění naše skupinka čtyř studentů a dvou mentorů konečně stála na letišti. Čekali jsme na naše letadlo do Londýna. Bylo v nás plno očekávání, ale i pochybností – umím tady to?, nezapomněl jsem se podívat na toto? A to vše kvůli jediné události, 41. ročníku Mezinárodní chemické olympiády, kterého se letos zhostila univerzita v Cambridge a jako spolupřátel neméně známá univerzita v Oxfordu.

Letošní rok byl navíc pro Cambridge neobvyklý ještě v něčem, právě letos uběhlo 800 let od založení této světoznámé univerzity. A to už je nějaká doba. Hned na první procházce s průvodcem jsme to poznali. Historie na nás přímo dýchala. Cambridge je opravdu hojně navštěvované turistické místo. Turista, kam se podíváte. Tamější studenti mají až skoro problém dostat se ráno do školy. A to, že se zde konala nějaká mezinárodní olympiáda, většina místních lidí ani netušila, podobné akce se zde konají skoro na každodenním pořádku.

Taková olympiáda probíhá zhruba následovně: krátce po příjezdu jsou od sebe striktně odděleni studenti a mentoři, studentům jsou navíc zabaveny mobily a notebooky. V době, kdy mentoři překládají soutěžní úlohy do rodných jazyků účastníků, je pro soutěžící připraven „zábavný a záživný“ program. V našem případě se jednalo o návštěvu hradu spojenou se středověkými aktivitami, kdy jsme například stříleli z luku. Poté, co jsou všechna zadání přeložená, vytisknutá a nachystaná, přichází den D₁: praktická část. Stručně řečeno: 5 hodin na opravdu (ale opravdu)

velmi malém prostoru, kde téměř ani nemáte volné místo na odložení papírů. Za úkol máte vyřešit dvě až tři úlohy, které jsou většinou moc hezké, ale náročné, jak na provedení, tak i čas. Letos jsme měli za úkol aldolovou kondenzaci prováděnou bez přidaného rozpouštědla (zajímavý postřeh – když zhruba stovka studentů drtí „popřípadně hrudky“ skleněnou tyčinkou ve svých kádinkách, výsledkem je docela velký randál), analýzu měďnatého komplexu a určení kritické micelární koncentrace surfaktantu. Poslední uvedená úloha byla netradiční v tom, že si její provedení museli studenti sami naplánovat a z něj vyvodit závěry, tedy že už neměli pracovat jen jako cvičené opice, ale jako myslící cvičené opice. Po praktické části následuje den volna, který jsme strávili v anglickém lese v provozním centru a na vypůjčených horských kolech, opravdu podařený den to byl. Po dni volna přichází den D₂: teoretická část. Opět stručně řečeno: 5 hodin, sice na větším místě, ale o to více úkolů máte vyřešit. Řešení se řídí heslem „správně a rychle“. V úlohách se mísí všechny oblasti chemie od hlavně fyzikální (zmíním např. úlohu „Vznik H₂ mezi hvězdami“, která byla otištěna v minulém Bulletinu), přes anorganickou („Komplexy přechodných kovů“) až po organickou („Syntéza Amprenaviru“).

Po teoretické části následuje tak zvaná Re-union párty, kdy se po několika dnech strávených odděleně setkají mentoři se studenty a navzájem si sdělují své dojmy ohledně úloh. Ta letošní se konala ve velkolepých prostorách Přírodopisného muzea v Londýně, přímo pod tamějším dinosaurem. Mezinárodní olympiáda však není jen o úlohách a medailích, ale i o navazování kontaktů, diskuzi a někdy i celoživotních přátelství s lidmi z celého světa, které byste jindy asi jen těžko potkali takhle pohromadě.



Foto: Český soutěžní tým v zajetí fullerenu C_{60} , nahoře zleva: Pavel Švec, Ondřej Henych, Petr Motloch, dole: Ondřej Hák

Některé národy na olympiádu pak jezdí spíše kvůli socializování a soutěž berou jen jako nutné zlo.

Po Re-union párty již mají studenti od veškerého soutěžení klid, mentoři ovšem musí veškeré odpovědi opravit a ohodnotit a nadto pak ještě vyhádat nějaký ten bodík navíc v diskuzi s pořadateli, kteří úlohy ohodnotili taktéž.

Nakonec tedy vše dospěje k závěrečnému ceremoniálu a rozdávání medailí. Náš tým letos nedopadl vůbec špatně: Ondřej Henych obdržel stříbrnou medaili, Pavel Švec, Ondřej Hák a já jsme dostali medaili bronzovou. První tři zmiňovaní mladí chemici se navíc mohou zúčastnit ještě dalšího ročníku, který se uskuteční v dalekém Japonsku, tak jim držme palce a přejme zlaté medaile.

Poděkování za celý průběh jistě patří našim mentořům – Petru Holzhauserovi a Janu Kotkovi. Dále určitě nemohu opomenout uvést našeho guida, Rudolfa Píšu, který se o nás v Cambridgi velmi dobře staral a popsal nám Cambridge i z jiné stránky, neboť zde studuje.

Nakonec jsme po deseti a půl uplynulých dnech stáli opět na Ruzyni. Sice unavení nocí na letišti a o půl den později než jsme měli, ale plní dojmů a zážitků z této velkolepé akce, kterou Mezinárodní chemická olympiáda určitě bezesporu je.

Petr Motloch

P.S.: Všechny zážitky, postřehy a dojmy se bohužel do limitované délky tohoto článku nevejdou, například na popis anglické kuchyně by nestačilo ani deset knih, tudíž jej musím zkrátit na prosté konstatování: Absolutně tasteless.

Osobní zprávy

K osmdesátinám prof. RNDr. Josefa Louba, CSc. a doc. RNDr. Bohuslava Straucha, CSc.

Na slavnostním semináři katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty UK dne 12. 12. 2009 si chemická veřejnost připomněla významné jubileum dlouholetých členů pracoviště prof. RNDr. Josefa Louba, CSc. a doc. RNDr. Bohuslava Straucha, CSc., kteří se v prosinci letošního roku dožili úctyhodných osmdesáti let. Vzhledem k tomu, že odborný přínos oslavenců byl podrobně zmíněn při příležitosti jejich předcházejících výročí (viz např. tento časopis v r. 2000), připomeňme při této příležitosti některé zásluhy oslavenců alespoň krátce.

Prof. Loub jako jeden z prvních českých chemiků pochopil význam rychle se rozvíjejících RTG difrakčních metod a postupně vybudoval na katedře anorganické chemie renomovanou rentgenovou laboratoř, která dnes patří mezi špičková pracoviště, a to nejen v celorepublikovém měřítku. Vlastní odbornou práci v počátcích zaměřil na studium kyseliny orthotellurové, později na rentgenografický výzkum komplexních sloučenin, ve kterém úzce spolupracoval s výzkumnými skupinami mateřské katedry i Ústavem anorganické a užití chemie Univerzity v Hamburku. Doc. Straucha lze bez nadsázky označit za průkopníka Ramanovy spektroskopie v českých zemích. Již v r. 1960 uvedl na katedře anorganické chemie PFF UK v Praze do provozu první spektrograf pro měření Ramano-

vých spekter. Jeho mezinárodně uznávaná vědecká práce byla zaměřena především na vibračně spektroskopické studium anorganických sloučenin, zejména komplexů přechodných kovů, lanthanoidů a biologicky významných molekul.

Neméně úspěšné bylo i pedagogické působení obou jubilantů. Rentgenografickou laboratoř prof. Louba prošla řada diplomantů, aspirantů a doktorandů, kteří se dnes řadí mezi špičkové odborníky v této problematice. Širší chemické společnosti je znám i tím, že zorganizoval ve své době velmi pozitivně přijímané semináře „Rentgenová difrakce pro chemiky“, pro které napsal i učební texty. U doc. Straucha lze vyzdvihnout zejména systematické úsilí o seznámení nejen studentů, ale i široké odborné veřejnosti s moderními vibračně-spektroskopickými metodami a technikami. Nejen že vchoval řadu svých následovníků, ale organizoval a vedl kurzy měření a později i interpretace vibračních spekter, jejichž popularita hodnocená jak počtem účastníků, tak jejich zájmem, byla vždy velká. Obdobně byla významná činnost doc. Straucha i ve Spektroskopické společnosti, kde působil jako vedoucí Odborné skupiny. Díky svému přínosu k rozvoji spektroskopie byl doc. Strauch jmenován čestným členem Spektroskopické společnosti a je nositelem medaile J. M. Marci.

Přestože čas nelze zastavit, oba jubilanti jsou stále velmi aktivní a často se s nimi setkáváme na jejich domácím pracovišti, a to nejen při významných příležitostech.

A jsou stále stejní. Kolega Loub překypující fyzickou aktivitou a vyzářující kolem sebe příjemnou a usměvavou pohodu, kolega Strauch vždy komunikativní a zajímavější se nejen o „svou“ chemii, ale udivující svým širokým rozhledem, který mladší generace mohou jen závidět. Jejich život především díky společenským okolnostem nebyl vždy jednoduchý, přesto nikdy nezahofkli a jejich vitalita i v tomto věku je příkladná a záviděníhodná. Co tedy říci závěrem. Nelze než zopakovat slova, která zazněla na slavnostním semináři. Pepiku i Bohouši, ještě jednou vše nejlepší, trvalé zdraví, klid a spokojenost do mnoha dalších let. To Vám přeji Vaši žáci, kolegové a přátelé.

Zdeněk Mička

Ing. Miloslav Vobecký, CSc. osmdesátníkem

Jubilant se narodil 20. 10. 1929. Vystudoval Státní průmyslovou školu chemickou a poté chemii na technice v Praze a v Brně. Krátce působil v Syntesii Semtín a v Chemku Strážské. Dlouholetou odbornou kariéru radiochemika zahájil krátce po založení Ústavu jaderné fyziky (ÚJF). V r. 1956 nastoupil do oddělení jaderné spektroskopie, které tehdy sídlilo v Hostivaři. Po přestěhování laboratoří z Hostivaře do nově vybudovaného areálu v Řeži a po absolvování aspirantury, v rámci níž působil v roce 1963 na katedře radiochemie Leningradské státní univerzity u externího školitele prof. V. D. Nefedova, vybudoval v oddělení jaderné spektroskopie ÚJF vyspělé radiochemické pracoviště, které vedl až do r. 1971.

Na tomto pracovišti Ing. Vobecký významně přispěl k rozvoji spektroskopie záření beta, konverzních elektronů a záření gama. Vypracoval originální metody přípravy tenkých filmů jako podložek radioaktivních zdrojů, které se osvědčily i jako vstupní okénka Geiger-Müllerových počítačů. Jako jeden z prvních u nás se zabýval radiochemickými postupy pro separaci radionuklidů z terčů, které byly ozařovány v jaderném reaktoru a cyklotronu v ÚJF a synchrotronu v SÚJV Dubna. Jednalo se především o separace neutronodeficitních izotopů vzácných zemin, vznikajících při ozařování Ta, Au a Pb protony o energii 660 MeV pro studium struktury deformovaných jader. Ing. Vobecký zavedl radiochemickou separaci vzácných zemin bez přidání nosiče chromatografií na měničích iontů. V té době byl tento postup používán jen v několika málo laboratořích na světě, např. v Berkeley u G. T. Seaborga.

V druhé polovině šedesátých let se začal jubílant věnovat také rozvoji radioanalytických metod, zejména neutronové aktivační analýzy (NAA). Právem můžeme Ing. Vobeckého považovat za jednoho ze zakladatelů tohoto oboru v naší republice. Zabýval se rovněž nedestrukční gama spektrometrickou metodou stanovení stupně vyhoření jaderného paliva. V těchto pracích využil nově zavedené (a v ÚJF vyrobené) polovodičové Ge(Li) detektory záření gama a přičinil se tak o vznik v té době špičkového gama spektroskopického pracoviště. V NAA docílil brzy významných výsledků a s kolektivem radioanalytické laboratoře Ústavu nerostných surovin v Kutné Hoře vypracoval přehled možností nedestrukční, tzv. instrumentální NAA

(INAA) pro stanovení prvků v nerostných materiálech – horninách a minerálech. Ing. Vobecký také vyvinul nedestrukční stanovení uranu měřením zpóźděných neutronů. V r. 1969 pak byla jeho kolektivu svěřena analýza hornin, separovaných minerálů a skel z amerických lunárních expedic Apollo 11 a 12. Ačkoliv hmotnost některých vzorků činila i jen několik mg, bylo v nich metodou INAA stanoveno až 30 prvků. Pro účast na 2nd Lunar Scientific Conference v Houstonu v lednu 1971 připravil M. Vobecký souborný referát o výsledcích analýz lunárních vzorků s názvem „Radioanalytical determination of elemental composition of lunar samples“ (M. Vobecký, J. Frána, J. Bauer, Z. Řanda, J. Benada, J. Kuncič), který byl přijat. Účast M. Vobeckého na konferenci se však neuskutečnila z politických důvodů a ani mu nebylo dovoleno pokračovat v analýzách vzorků z dalších expedic. Stejně tak mu byla zakázána práce i na analýzách vzorků z sovětského lunárního výzkumu. V r. 1971 byl Ing. Vobecký donucen z politických důvodů opustit jím vybudované pracoviště v Ústavu jaderné fyziky ČSAV.

V dalších letech pracoval v Geologickém ústavu ČSAV, Ústavu experimentální mineralogie a geochemie ČSAV a Ústavu nukleární biologie a radiochemie ČSAV, jehož část byla později administrativně převedena do Ústavu analytické chemie AV ČR. V tomto ústavu pracuje dodnes. Na těchto pracovištích pokračoval v rozvoji metody INAA. Věnoval se jak metodickému vývoji (příprava standardů, studium jaderných interferencí ze štěpení U a Th, koincidenční měření záření gama, vývoj BGO detektorů záření gama), tak důležitým aplikacím (stanovení stop prvků, zejména Se, I a Br, v biologických materiálech, INAA hlubokomořských sedimentů, arzenidu galia, aj.). Studoval také možnosti využití měření promptního záření gama emitovaného při ozařování látek neutrony (metoda PGNA), metodu měření štěpných trosků a vypracoval řadu nedestrukčních radioanalytických postupů pro průmyslové využití (stanovení S a C v uhlí, Ni a Cr v rudách radiačním zachytem neutronů, stanovení Si a C v uhlí neprůzračným rozptylem neutronů, aj.).

Zásluhy Ing. Vobeckého o rozvoj radioanalytických metod u nás spočívají nejen ve výsledcích jeho odborné činnosti, ale v nemenší míře i v jeho organizačním talentu a nadšení. Pro zajímavost lze uvést, že se v šedesátých letech podílel na organizaci převozu ozařených terčů z SÚJV Dubna do ÚJF v Řeži, kde prováděl jejich zpracování. Ozaření terčů v SÚJV Dubna, odvoz na letiště Šeremetěvo, let do Prahy, odvoz do ÚJF Řež a provedení radiochemické separace se podařilo zvládnout za 10 hodin, což umožnilo studovat i poměrně krátkodobé radionuklidy. Dnes je něco podobného zcela nemožné, nebo neuskutečnitelné z důvodu vysokých nákladů.

Kromě členství v České společnosti chemické, kde je dlouholetým členem výboru odborné skupiny Jaderná chemie, je Ing. Vobecký aktivním členem Spektroskopické společnosti J. M. Marci, kde v rámci svých organizačních aktivit v r. 1971 založil odbornou skupinu Instrumentálních radioanalytických metod, jejímž vedoucím je dosud. V letech 1972–1992 pořádal každoročně konferenci o In-

strumentální aktivační analýze (IAA), na níž se setkávali domácí odborníci, v posledních letech i pozvaní zahraniční hosté, z oborů NAA a gama aktivační analýzy, rentgenfluorescenční analýzy, metod na svazcích nabitých částic (PIXE a RBS) i neutronů (PGNAA a NDP), gama a beta spektroskopie a radioindikátorových metod. Tato setkání byla pro rozvoj oboru a navazování kontaktů mezi odborníky v uvedených metodách neocenitelná a dodnes nezapomenutelná jak po odborné, tak po společenské stránce. V roce 2001 bylo pořádání těchto akcí (nadále pod vedením Ing. Vobeckého) obnoveno v podobě semináře pořádaného společně SS JMM a OS JCH ČSCH. Ing. Vobecký měl významný podíl i na organizaci řady mezinárodních akcí, zejména série Radiochemických konferencí (naposledy v r. 2006), ve které dosud působí jako místopředseda organizačního výboru, Spektroskopických konferencí, konference Nuclear Methods in the Life Sciences a dále řady odborných seminářů pořádaných Chemickou nebo Spektroskopickou společností, na nichž také přispíval kromě odborných sdělení i referáty o velikánech naší a světové vědy. Za vynikající odbornou a organizační činnost mu byla v r. 1980 udělena medaile Jana Marka Marci z Kronlandu za vynikající vědecké úspěchy v oboru instrumentálních radioanalytických metod; u příležitosti jeho osmdesátých narozenin mu byla udělena Hanušova medaile „Za významný přínos k jaderné chemii“.

Osmdesátiny zastihují Ing. Vobeckého v obdivuhodné fyzické i psychické kondici. Přejeme proto jubilantovi mnoho zdraví, neutuchající elán a hodně úspěchů i do dalších let.

Jan Kučera a Vlastislav Brabec

In memoriam: Pavel Rosmus

Dne 13. října zemřel ve Frankfurtu po těžké nemoci profesor teoretické chemie Pavel Rosmus. Odešla světově uznávaná vědecká osobnost, která zanechala v oblasti teoretické chemie nesmazatelnou stopu svým příspěvkem k obecné racionalizaci a interpretaci vlastností molekul v termínech elektronové struktury.

P. Rosmus se narodil 11. 8. 1938 v Přerově na Moravě v rodině tragicky poznamenané druhou světovou válkou. Jeho otec byl za aktivní účast v odboji proti německé okupaci odsouzen k několikaletému vězení, což otce těžce zdravotně poznamenalo, i nepříznivě ovlivnilo celou rodinu. V roce 1957 maturoval P. Rosmus na Průmyslové škole chemické v Přerově a zahájil svá vysokoškolská studia na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Jako vynikající student byl v roce 1960 doporučen ke studiu na Technische Universität Dresden, kde v roce 1964 obhájil titul Diplom Chemiker. Na Ústavu organické chemie Drážďanské univerzity vypracoval doktorskou práci specializovanou na siriné sloučeniny a její úspěšnou obhajobou získal v roce 1968 titul Dr. rer. nat. V roce 1968 se v Drážďanech oženil, ale také prožil velmi dramatické události spojené s koncem Pražského jara. Po svých protestních vystoupeních proti okupaci Československa spojeneckými vojsky Varšavské smlouvy byl východoněmeckými úřady

donucen NDR opustit. Odešel s celou rodinou do Prahy, kde získal místo ve skupině prof. R. Zahradníka v tehdejší Ústavu fyzikální chemie ČSAV, což znamenalo počátek jeho přeměny z organického na kvantového chemika. Po dvou letech pobytu v Praze se rozhodl se ženou a dvěma dcerami k odchodu do Spolkové republiky Německo. Později byl soudem v Praze 6 odsouzen k jednomu roku vězení a propadnutí veškerého majetku za ilegální opuštění republiky.

Prvním exilovým azylem P. Rosmuse byl Frankfurt nad Mohanem, kde se mu dostalo podpory od prof. H. Hartmanna na Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (JWGUF). Rok 1973 prožil jako post-doc na University of Sheffield u prof. R. McWeenyho. Významným milníkem pro jeho celou vědeckou kariéru se stal rok 1974, kdy přišel do skupiny prof. W. Meyera na Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Jako „research associate“ se zde začal věnovat svému nejvýraznějšímu oboru vědecké činnosti, a sice aplikaci pokročilých kvantově-chemických metod v oboru molekulové spektroskopie. V roce 1974 také zahájil teoretické studium a počítačové simulace fotoelektronových spekter molekul ve spolupráci s prof. Bockem z JWGUF a získal na této univerzitě nabídku „definitivy“. Nabídku přijal a v roce 1978 se navrátil do Frankfurtu. V roce 1982 se na JWGUF habilitoval v oboru teoretická chemie a získal stálou pozici profesora. Během následujících 15 let v této pozici působil na chemické fakultě JWGUF. V těsné spolupráci s prof. E. A. Reinschem a prof. H.-J. Wernerem (spoluautory jednoho z dnes nejpoužívanějších souborů kvantově-mechanických programů MOLPRO) otevřel nové možnosti teorie pro racionalizaci molekulových spekter v termínech vysoce přesných povrchů molekulových vlastností (potenciální energie, elektrické dipólové a přechodové momenty) a výrazně tak rozšířil poznávací potenciál experimentální molekulové spektroskopie. V roce 1993 byly zásluhy P. Rosmuse oceněny jmenováním nejprve do pozice Professeur de Première Classe a později do vysoce prestižní pozice Professeur de la Classe Exceptionnel na Université de Marne la Vallée ve Francii s pověřením zde vytvořit novou skupinu v oboru teoretické chemie. Tohoto úkolu se zhostil s naprostým úspěchem a společně s prof. G. Chambaudovou opublikoval řadu zásadních příspěvků umožňujících interpretaci vibronických spekter iontových molekul, komplexů iontů a neutrálních molekul, Rennerových-Tellerových systémů, monomolekulárních procesů a molekulových fotodisociací, tedy výsledků obecného fyzikálně-chemického a astrofyzikálního významu. Dosažené výsledky byly oceněny jak v laboratořích, tak i oficiálními prestižními poctami. V roce 2000 byl P. Rosmus nominován na Membre Senior Institut Universitaire de France, v roce 2007 na Gauss-Professor na Königliche Gesellschaft der Wissenschaften v Göttingen a, konečně, v roce 2008 ho francouzská vláda jmenovala Chevalier dans l'ordre des Palmes Académiques za zásluhy o francouzskou kulturu.

Díky hlubokému porozumění teorii i experimentu, schopnosti správně vidět a popsat nevyřešené problémy a neméně i schopnosti tvořivě spolupracovat, patřil

P. Rosmus mezi nejvyhledávanější partnery celé komunity teoretické chemie. Pro ilustraci: v roce 1984 spolupracoval jako Visiting Professor na Manne Siegbahnlaboratoriet ve Stockholmu s prof. Larssonem při studiu pravděpodobností zářivých přechodů v molekulách; v roce 1985, jako Visiting Fellow proslulého ústavu JILA v Coloradu, navázal dlouholetou a vysoce produktivní spolupráci s Dr. S. V. O'Neilem věnovanou Rosmusovu oblíbenému tématu pravděpodobností zářivých přechodů a také studiu negativních iontů a procesů spojených s přenosem náboje; v roce 1987, jako Overseas Fellow of Churchill College v anglické Cambridge, zahájil letitou spolupráci s prof. N. Handym směřovanou k teoretické interpretaci intenzit rotačně-vibračních přechodů v termínech povrchů elektrických dipólů; v letech 1997 a 2000 byl pozván do superpočítačového Conzorzio Interuniversitario CINECA v Bolo-

gni spolupracovat s prof. Palmieri na problematice spin-orbitálního spřažení a dob života molekulárních iontů; studium nabitých molekulárních útvarů bylo rovněž námětem i jeho dlouhodobé spolupráce s prof. J. P. Maierem z Universitát Basel.

Vedle intenzivní vlastní vědecké práce byl P. Rosmus velmi aktivní i v organizaci evropské mezinárodní spolupráce; účastnil se např. čtyř European research networks on Theoretical Chemistry a po pět let působil v této společnosti jako koordinátor. Uznávaná míra přínosu Pavla Rosmuse do světové vědecké literatury je přesvědčivě doložitelná citační analýzou jeho publikací (viz ICI Web of Knowledge): 238 stávajících vědeckých publikací dosud získalo 5149 citací a autorův *h*-index činí 38.

*Jiří Čížek, Rudolf Polák, Lubomír Skála
a Vladimír Špirko*

Výročí a jubilea

Jubilanti v 2. čtvrtletí 2010

90 let

Ing. Jiří Rovner, (17.5.), VÚMCH Brno

85 let

Prof. Ing. Jaroslav Králíček, DrSc., (17.5.), VŠCHT Praha

Prof. Ing. Václav Dědek, CSc., (4.6.), VŠCHT Praha

80 let

Prof. Ing. Jiří Matoušek, DrSc., (4.4.), RECETOX Brno

Ing. Milan Poděšř, CSc., (12.4.), ÚJV Řež

Ing. Jiří Radouch, (25.4.), Mikrotechna Praha

Prof. Ing. Karel Dušek, DrSc., (6.5.), ÚMCH AV ČR Praha

Ing. Karel Grigar, CSc., (11.6.), VÚ paliv a energetiky Praha

Ing. Jan Novosad, CSc., (12.6.), ČSCHI Praha

75 let

Ing. Dr. Bohumil Tesařík, (7.4.), Okresní úřad Plzeň

Doc. Ing. Milan Bárta, CSc., (1.5.), VŠCHT Praha

Prof. RNDr. Milan Kotouček, CSc., (2.5.), PřF UP Olomouc

Prof. Ing. Zdeněk Stránský, CSc., (8.6.), PřF UP Olomouc

Doc. RNDr. Milan Šolc, CSc., (12.6.), ÚACH Řež

70 let

Doc. Ing. Věra Křížová, DrSc., (21.4.), VŠCHT Praha

Ing. Jiří Oharek, (28.4.), Praha

MUDr. Růžena Šlechtová, (4.5.), VFN Praha

RNDr. Václav Macháček, DrSc., (28.6.), VÚ rostlinné výroby Praha

65 let

Ing. Eva Štěpánková, (3.4.), Ryor Kyšice u Unhoště
RNDr. Jarmila Havlová, CSc., (16.4.), Centrum staveb. inženýrství Praha

Prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc., (18.4.), ČZU Praha

RNDr. Jan Pajurek, (28.4.), Zdravotní ústav Brno

RNDr. Petr Koloros, (9.5.), Gymnázium Pierra de Coubertina Tábor

60 let

Prof. Ing. Pavel Lejček, DrSc., (4.4.), Fyzikální ústav AV ČR Praha

Ing. Anna Mittnerová, (5.4.), VŠCHT Praha

Ing. Karel Pospíšilík, CSc., (20.4.), Blansko

Ing. Jiří Žufniček, (29.4.), Moravské železárny Olomouc

Ing. Ladislav Středa, CSc., (1.5.), SÚJB Praha

Doc. Ing. Ivan Cibulka, CSc., (9.5.), VŠCHT Praha

Ing. Jan Sponar, Ph.D., (26.6.), Česká inspekce ŽP Brno

Ing. Bohumír Vospěl, (26.6.), Englobler Ivančice

RNDr. Miroslav Kobr, CSc., (28.6.), Praha

Blahopřejeme

Zemřelí členové Společnosti

Ing. František Plzák, SPŠ chemická Praha, zemřel 7. března 2009 ve věku nedožitých 96 let

Ing. Dr. Tech. Jan Dvořák, Polymer Institut Brno, zemřel 7. září 2009 ve věku 90 let.

Prof. Ing. Jan Hampl, CSc., VŠCHT Praha, zemřel 14. října ve věku 89 let.

Ing. Jaroslav Noll, SVÚSS Praha – Běchovice, zemřel 19. října 2009 ve věku 87 let.

RNDr. Jiří Sajvera, Střední odborné učiliště Praha, zemřel ve věku 81 let

Čest jejich památce



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



Thermo
SCIENTIFIC

Generálním sponzorem Spektroskopické společnosti Jana Marka Marci jsou Pragolab s.r.o.,
Thermo Fisher Scientific s.r.o. a Nicolet CZ s.r.o.



Spektroskopická společnost Jana Marka Marci

podporovaná generálním sponzorem Pragolab s.r.o., Thermo Fisher Scientific s.r.o. a Nicolet CZ s.r.o.

a

Slovenská spektroskopická spoločnosť

člen Zväzu slovenských vedecko-technických spoločností

pořádají v Litomyšli ve dnech 31.5.–3.6.2010

14. Česko-Slovenskou spektroskopickou konferenci

Místo konání: Evropské školicí centrum Litomyšl, www.esclitomysl.cz

Program konference:

Odborný program konference bude zahrnovat všechny spektroskopické techniky z oblasti atomové i molekulové spektroskopie včetně speciálních spektrálních technik a jejich využití v různých aplikačních oblastech, jako např. farmacie a medicína, ochrana kulturního dědictví, analýza povrchů, molekulová spektroskopie a struktura látek, molekulová spektroskopie plynné fáze, chirální optické metody, *in-situ* analýza, nano aplikace, atd. Kromě plenárních přednášek a krátkých přednášek bude důležitou částí konference i sekce posterových sdělení. Odborný program bude doplněn bohatým společenským programem s využitím hudební tradice města Litomyšl. Konferenční poplatek při včasné platbě pro členy Spektroskopické společnosti J.M.M., členy Slovenské spektroskopické společnosti a studenty bude 2900 Kč +DPH.

Potvrzené plenární přednášky:

A. Makarov (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) – Orbitrap – new type of mass analyzer

J.-M. Mermet (Spectroscopy Forever, Tramoyes, France) – Photon solid-state detectors: the revival of atomic spectrometry

G. Schlemmer (Německo) – Research in Analytical Spectroscopy: Are Revolutionary Developments still Possible?

Odborné kurzy předcházející konferenci:

Spektrální techniky v ochraně kulturního dědictví

Využití spektrálních technik v bezpečnostních technologiích

Organizační výbor:

M. Holčapek (předseda), B. Dočekal, R. Jirásko, V. Kanický, M. Koželouhová, M. Miglierini, M. Lísa, P. Matějka, V. Otruba, J. Sysalová, T. Vaculovič

Vědecký výbor:

V. Kanický (předseda), E. Beinrohr, K. Flórián, A. Gatial, J. Hála, M. Holčapek, J. Kubová, P. Matějka, M. Miglierini, V. Otruba, Š. Urban

Korespondenční adresa:

Spektroskopická společnost Jana Marka Marci

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno

e-mail: immss@spektroskopie.cz, <http://www.spektroskopie.cz>

Telefon: 549 491 436, fax: 549 492 494, mobil: 722 554 326, tajemnice společnosti Markéta Koželouhová

Spektroskopická společnost Jana Marka Marci

dále oznamuje, že ve spolupráci s dalšími institucemi pořádá

ve dnech 18.–22.1. 2010 a 25.–29.1. 2010 tradiční kurzy

MĚŘENÍ VIBRAČNÍCH SPEKTER a **INTERPRETACE VIBRAČNÍCH SPEKTER**,

ve dnech 3.–6.5. 2010 **2. kurz LASEROVÉ ABLACE** a

ve dnech 20.–24.9. 2010 již **11.ročník ŠKOLY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE** (<http://holcapek.upce.cz/conferences.htm>).

Aktuální informace k těmto kurzům je možné nalézt na <http://www.spektroskopie.cz>.

EuCheMS General Assembly in Interlaken

Luis Oro, EuCheMS President, chaired the 2009 EuCheMS General Assembly hosted by the Swiss Chemical Society in Interlaken on 15 to 16 October, bringing together the Presidents and other representatives of the EuCheMS member societies and delegates from the scientific Divisions. Representatives of the Federation of African Societies of Chemistry (Treasurer Yonas Chebude), IUPAC (President Elect Nicole Moreau), the American Chemical Society (President Tom Lane) and associated organisations of EuCheMS – CEFIC, ECTN, CERC3, COST Chemistry, FECCIA, the European Physical Society – also made valuable contributions to the debates. Particularly appreciated were the presentations by Nicole Moreau on the plans for the International Year of Chemistry (IYC) 2011, Tom Lane on the resurgence of science in the United States, Yonas Chebude on the Federation of African Societies of Chemistry (see page 3) and Georg Frater on chemistry in Switzerland.

The significant achievements of the European Young Chemists Network (EYCN) were presented by Sergej Toews, Chair of the EYCN, a key role of which is to develop relations between young chemists and industry.

Topical issues were debated during breakout discussions on *European Chemistry Research and Funding* led by Dave Garner and Peter Kündig, *Sustainable Chemistry Education* led by Ilka Parchmann and Richard Pike, *IYC 2011* led by Igor Tkatchenko and Wolfram Koch, and *Enhancing recognition of EuCheMS* led by Franco de Angelis and Sergio Facchetti.

To promote more effective governance, the EuCheMS constitution will be amended to provide a smaller Executive Board. Morten Bjerrum, Henryk Koroniak, Viktor Milata and Jay Siegel will serve as members of the Board, having been elected following nomination by their member societies, and Fran-



At the General Assembly: Georg Frater, Luis Oro, Nicole Moreau, Yonas Chebude, Evelyn McEwan and Tom Lane (from left).

co de Angelis will be Treasurer (see page 3).

At the conclusion of the General Assembly, Luis Oro recalled some of the significant EuCheMS achievements during the first year of his Presidency. He expressed his confidence in the increasing efforts of the Divisions, Working Parties and member societies in supporting EuCheMS in undertaking new effective actions. Whilst acknowledging that EuCheMS has come a long way in a short time as European association, he stressed the value of taking a strategic approach to future development. He highlighted progress in achieving key objectives aimed at

- strengthening the EuCheMS science base
- building a sustainable policy development activity
- encouraging professional development and networking
- promoting effective partnerships
- enhancing communication and recognition
- improving decision making in governance and finance.

Finally, Luis Oro thanked the Swiss Chemical Society for its generous hospitality.

Evelyn McEwan, McEwanE@rsc.org

Second global Helsinki Chemicals Forum

The second global Helsinki Chemicals Forum will be held on 20 to 21 May 2010. The Forum is inviting national and international authorities, companies and industry associations, international organisations, non-governmental bodies, human interest groups, and academia for an open dialogue to find and contribute to sustainable solutions for environmental problems and consumer concerns.

“The European Chemicals Agency (Echa) is delighted to be an active partner in the Helsinki Chemicals Forum,” says Geert Dancet, Executive Director of the Agency states. “The Reach and Classification, Labelling and Packaging (CLP) Regulations will ensure a high level of protection of human health and the environment from chemical substances across Europe – Echa and companies across Europe and beyond are working towards that right now. 2010 is a very important and busy year for us all as we prepare for two big deadlines – the registration of chemicals before 1 December 2010, and the notifications for classification and labelling one month later.” The Echa’s 4th Stakeholders’ Day will take place the day before.

In 2010 the Helsinki Chemicals Forum will focus on four new, challenging themes related to chemicals policy and chemistry as a science:

- chemical regulation – global challenges
- chemical policies – emerging economies
- competitiveness – financial constraints
- green chemistry – solution provider?

The keynote speakers of the event are President Martti Ahtisaari, the 2008 Winner of the Nobel Peace Prize, and Paul J. Crutzen, the 1995 Winner of the Nobel Prize for Chemistry.

The Helsinki Chemicals Forum is being organised by the Chemicals Forum Association in co-operation with the European Commission, the European Chemicals Agency, the Finnish Government and partners, including the City of Helsinki, Greater Helsinki Promotion, the Chemical Industry Federation of Finland, and the University of Helsinki.

www.helsinki-chemforum.eu



In memoriam Norman E. Borlaug

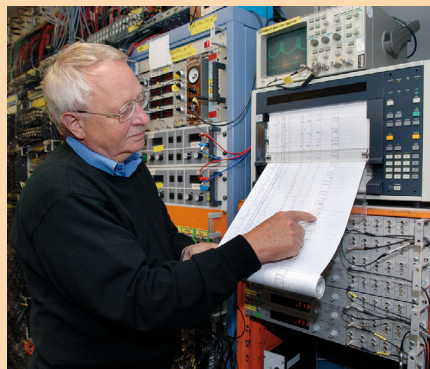
The plant scientist Norman Ernest Borlaug died on 10 September 2009, aged 95. He did more than anyone else in the 20th century to teach the world to feed itself. His work was credited with saving hundreds of millions of lives. He was widely described as the father of the broad agricultural movement called the Green Revolution. Borlaug's advances in plant breeding led to spectacular success in increasing food production in Latin America and Asia and brought him international acclaim. In 1970, he was awarded the Nobel Peace Prize.

LW

New element Copernicium

A joint IUPAC/IUPAP Working Party (JWP) has confirmed the discovery of the element with atomic number 112 and this by the collaboration of Sigurd Hofmann and his team from the GSI Center for Heavy Ion Research in Darmstadt, Germany. In accord with IUPAC procedures, the discoverers proposed a name, Copernicium, and symbol, Cn, for the element. This proposal lies within the long tradition of naming elements to honour famous men of science. The work of Nicolaus Copernicus (1473 to 1543) has been of exceptional influence on the philosophical and political thinking of mankind and on the rise of modern science based on experimental results. The Inorganic Chemistry Division recommended this proposal for acceptance.

<http://old.iupac.org>



Sigurd Hofmann from the GSI Center for Heavy Ion Research. (Photo: G. Otto, GSI)

Euroanalysis 2009 in Innsbruck

Euroanalysis has become one of the most important broad-spectrum analytical conferences covering all aspects of analytical sciences. It is held every two years in different European countries and is organised under the auspices of the EuCheMS Division of Analytical Chemistry (DAC). In September 2009 this conference was organised in Innsbruck by the Austrian Society of Analytical Chemistry (ASAC) with Wolfgang Buchberger and Wolfgang Lindner as chairmen.

The number of participants, about 700 analytical chemists from 53 countries, was as high as in previous conferences. Under the motto "The impact of Analytical Chemistry on Quality of Life", 130 lectures and 640 poster presentations resulted in a very attractive program which demonstrated the broad diversity of analytical sciences.

Euroanalysis 2009 was also selected as the perfect stage to honour scientists with ASAC's most prestigious awards. The Pregl Medal was awarded to Friedrich Lottspeich (Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany), and the Emich Plaque to Harald Fuchs (University Muenster, Germa-



Winners of the poster awards with the poster jury, chairpersons and sponsor.

ny). Furthermore, Wolfgang Lindner was presented with the Martin Gold Medal of the Chromatographic Society.

The Robert Kellner Lecture Award established by the EuCheMS Division of Analytical Chemistry and sponsored by Springer-Heidelberg in memory of the achievements of Robert Kellner was received by Boris Mizai-koff (University Ulm, Germany).

The preparations for Euroanalysis 2011 in Belgrade (Serbia) have already started in order to continue this successful series of conferences.

Jens E. T. Andersen
jeta@dac-euchems.org

Portrait: The Polish Chemical Society

The Polish Chemical Society was founded in 1919 after Poland regained independence. The first president was Leon Marchlewski, Professor of the Jagiellonian University in Cracow. From 1921 the journal *Roczniki Chemii* was the organ of the Society, but in 1978 changed to English, becoming the *Polish Journal of Chemistry*. The journal was published until 2009 with an interruption during the war years 1939 to 1945.

During World War II any activity of the Society was forbidden by the occupying forces. Polish chemists took part in underground actions, mainly in underground teaching at universities. After the war 13 new local Departments and 30 specialized Sections began their work. To date 52 General Meetings of Polish chemists have been organised (in-

cluding four prewar meetings). The Society publishes articles in a monthly *Chemical News* and bimonthly in *Orbital*, the organisation news. The Society is a co-editor of the journal *Chemia Analityczna – Chemical Analysis*. The Lodz Department edits an internet issue on www.ptchem.lodz.pl and an international bulletin sent to other Societies. The Society is a coowner of *Chemistry - A European Journal*, *Physical Chemistry*, *Chemical Physics* and *ChemBioChem*. In 2010 the Society will take part in the *European Journal of Inorganic Chemistry* and *European Journal of Organic Chemistry*. The Polish Chemical Society is a EuCheMS member and has 3 000 members.

Roman Mierzecki, Polish Chemical Society
mierzrom@wp.pl

New EuCheMS Executive members

The four newly elected members of the EuCheMS Executive and the new treasurer will take office in March.

Franco De Angelis, Past President of the Societa Chimica Italiana (SCI), will become EuCheMS Treasurer in March. He has represented the SCI at the EuCheMS General Assembly since 2005 and has served as a member of the EuCheMS Finance and Strategy Committee. Currently Professor at the University of L'Aquila, he is a member of the Professional Order of Chemists (Italy) and represents the SCI on the European Chemistry Thematic Network Association.



Morten Bjerrum is Past President of the Danish Chemical Society, during which time he represented the Society at meetings of the EuCheMS General Assembly. Currently Professor in Bioinorganic Chemistry at the University of Copenhagen, he has also been a delegate to the EuCheMS Division of Chemistry in Life Sciences and a member of the Danish National Committee for Chemistry.



Henryk Koroniak is a member of the Polish Chemical Society and of the Council of Sciences at the Ministry of Science and



Higher Education, having previously served as an elected member of the Polish State Committee for Scientific Research. He is also a member of the Committee of Chemistry, Polish Academy of Sciences. Currently Professor at Adam Mickiewicz University in Poznan, he is also President of the European Chemistry Thematic Network (ECTN).

Viktor Milata is a member and Past President of the Slovak Chemical Society and a member of the Czech Chemical Society. He has represented the Society at the EuCheMS General Assembly. Currently Professor at the Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, he is also a member of the EuCheMS Working Party on Green and Sustainable Chemistry.



Jay Siegel is a member of the Swiss Chemical Society and, as the Chair of the EuCheMS Division of Organic Chemistry, he is currently an *ex officio* member of the EuCheMS Executive. He is Professor and co-Director of the Organic Chemistry Institute, University of Zurich. He chairs the European Research Council PE5 Panel for Young Investigator Grants and is a member of the Swiss Academy of Sciences.



The Federation of African Societies of Chemistry

The Federation of African Societies of Chemistry (FASC) was established in 2006 with the aim of advancing the chemical sciences in Africa. It promotes networking among African chemical societies and with sister international and regional societies, as well as seeking involvement in international and regional initiatives that promote sustainable development in Africa.

FASC is pleased to have played a major role in securing the designation of 2011 as the International Year of Chemistry (IYC), putting the proclamation through the Unesco Executive Board and the UN General Assembly. FASC is now encouraging mem-

ber chemical societies across Africa to propose activities to celebrate IYC in their respective countries. The third FASC Congress will be held in January 2011 in Johannesburg, South Africa, with the aim of generating enthusiasm for the creative future of chemistry, key to Africa's future.

FASC also participated in launching the Pan African Chemistry Network (PACN), an RSC initiative launched in 2007 with the support of Syngenta and which currently has hubs in Nairobi and Addis Ababa. PACN has provided generous support for FASC.

Yonas Chebude, FASC Treasurer
 admin@faschem.org, www.faschem.org

2010 European Young Chemist Award

Under the patronage of EuCheMS, the chemical societies of Italy and Germany (SCI and GDCh) and the European Young Chemists Network (EYCN), the 2010 European Young Chemist Award is intended to showcase and recognize the excellent research being carried out by young scientists working in chemical sciences. The award will be presented at the 3rd EuCheMS Chemistry Congress in Nürnberg, Germany and is sponsored by the SCI. The procedure follows in the tradition of the 2006 and 2008 European Young Chemists Awards, held in Budapest and Torino during the European Chemistry Congresses.

A specific call for applying for consideration for this award will be presented soon on www.euchems-congress2010.org.

Bruno Pignataro, SCI, bruno.pignataro@unipa.it
 Sergej Toews, EYCN, toews@tc.upb.de

GDCh Foundation Prizes: Call for nominations

Applications are invited for the Manecke Scholarship of the Georg Manecke Foundation and the Grohe Prize of the Klaus Grohe Foundation, both administered by the Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh). In 2010 the Georg Manecke Foundation will award a Scholarship of 8000 Euro to a doctoral student or postdoctoral scientist, preferably from Central or Eastern Europe. Georg Manecke was one of the pioneers in polymer chemistry. His widow established the Georg Manecke Foundation to support younger scientists working in polymer science. Klaus Grohe developed highly effective antibiotics. He and his wife Eva established the Klaus Grohe Prize for Medicinal Chemistry to be awarded to outstanding young scientists in the field of medicinal chemistry and drug research. Proposals should consist of a letter of support of the nomination (self-nominations are welcome), a curriculum vitae, and a list of publications. Nominations must be submitted to Barbara Köhler (GDCh) by no later than 15 March.

Barbara Köhler, b.koehler@gdch.de
www.gdch.de/gdch/eps/ausschr/stiftungspreise_2009.htm



Conference on chemistry for life sciences in Germany

The 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences (ECCLS) under the umbrella of EuCheMS took place in Frankfurt from 2 to 5 September 2009. It was organised by the Division Biochemistry (Chairman Arne Skerra) of the GDCh. Around 280 participants from 25 countries attended the conference, covering ten topics ranging from chemical biology through bioinorganic chemistry to structural biology. The format included five plenaries, 48 invited lectures, and 138 posters of which 18 were selected for short presentations.

Discussion centred on the huge potential of chemistry for solving our future needs. The main focus was on health but also aspects of energy and food duly received attention in line with their rising importance. The topics were: chemical biology, molecular recognition and biocatalysis, medicinal chemistry and neurochemistry, analytical biochemistry and proteomics, industrial biochemistry, nucleic acid chemistry, proteins for diagnostics and therapy, bioinorganic chemistry, structural biology and glycochemistry.

An abstract book including the whole program is available as electronic PDF file. The posters were of high standard and the audience was enthusiastically present till the end of the conference at Saturday noon, having enjoyed the Frankfurt night on Friday, based on apples from drink to menu. On conclusion of this successful bio-chemical meeting Andras Perczel from Hungary announced that the 4th ECCLS will take place in Budapest from 31 August to 3 September 2011.

joachim.engels@chemie.uni-frankfurt.de

RSC-GDCh Lecture

Alois Fürstner, winner of the Alexander Todd-Hans Krebs Lectureship in chemical sciences 2009, gave his lecture on *Cheap and expensive ways to catalyse C-C bond formation* at a symposium on organometallic compounds and C-C bond formation held at the RSC Chemistry Centre in Burlington House, London, in November. Alois Fürstner is Director of the Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim. eme

Events

14 – 19 March 2010, Bamberg, Germany

EUCHEM 2010 Conference on Molten Salts and Ionic Liquids, <http://events.dechema.de/en/euchem2010>

23 – 25 March 2010, Munich, Germany

Analytica Conference 2010
www.gdch.de/analytica2010

19 – 23 April 2010, Barcelona, Spain

European Energy Conference, www.e2c-2010.org

6 – 10 June 2010, Belgrade, Serbia

Second Regional Symposium on Electrochemistry (South-East), <http://rse-see.net>

7 – 11 June 2010, Stockholm, Sweden

FORMULA VI
www.chemsoc.se/sidor/KK/formulaVI/index.htm

13 – 16 June 2010, Oviedo, Spain

7th International Congress of ANQUE, Integral Water Cycle: Present and Future, www.anque2010.org

20 – 24 June 2010, Budapest, Hungary

Pigments in Food: Chemical, Biological and Technological Aspects, www.foodpigments2010.mke.org.hu

28 June – 2 July 2010, Bologna, Italy

EUCHEM Conference on Organic Free Radicals
www.isof.cnr.it/biofreeradicals/Euchem.html

30 June – 3 July 2010, Ravenna, Italy

Chemistry for Cultural Heritage (CHEMCH)
rocco.mazzeo@unibo.it

4 – 9 July 2010, Crakow, Poland

10th European Conference on Research In Chemistry Education (ECRICE), <http://ecrice2010.ap.krakow.pl>

11 – 16 July 2010, Glasgow, Scotland

Macro2010: 43rd IUPAC World Polymer Congress
www.rsc.org/ConferencesAndEvents/RSCConferences/Macro2010/

11 – 15 July 2010, Perugia, Italy

International Symposium Perugia, Fluorine Days (PFD 2010), www.perugiafluorinedays.it

29 August – 2 September 2010, Nürnberg, Germany

3rd EuCheMS Chemistry Congress: Chemistry – the Creative Force, www.euchems-congress2010.org

Nürnberg: Call for Papers

More than 130 hours of lectures – that is what participants of the 3rd EuCheMS Chemistry Congress in Nürnberg 2010 can expect. While seven plenary and 132 invited speakers have already confirmed their participation, online submission for papers is now open. The organisers allow at least 220 oral and more than 1000 poster presentations. All contributions will result in a congress that will engage scientists, build on global partnerships. gk
www.euchems-congress2010.org/abstracts.htm

Sustainable Chemistry Award

Applications are invited for the first Award, a prize of 10 000 Euro. Individuals or teams of up to three persons who make significant contributions to sustainable development by applying green and sustainable chemistry are eligible. The Award is designed to recognise innovation that delivers clear improvements in the sustainable production and use of chemicals and chemical products. The deadline for online applications is 15 February 2010. eme
www.euchems.org/ESCA

EuCheMS Newsletter

Newsletter coordinator: Karin Schmitz

Please send all correspondence and manuscripts to k.schmitz@gdch.de

Editors: Wolfram Koch (responsible),

Uta Neubauer, Frankfurt am Main

Advisory board: Reto Battaglia (Switzerland),

Claudine Buess Herman (Belgium), Pavel Drasar (Czech Republic), Philippe Garrigues (France), Wolfram Koch (Germany), Minos Leontidis (Cyprus), Evelyn McEwan (EuCheMS Secretariat) and Giovanni Natile (Italy).

Layout: Jürgen Bugler, Frankfurt am Main

Production: *Nachrichten aus der Chemie*



Publisher: Gesellschaft Deutscher

Chemiker on behalf of EuCheMS
Postfach 900440, D-60444 Frankfurt am Main
euchems@gdch.de

EuCheMS General Secretary:

Evelyn McEwan, c/o RSC, Burlington House, Piccadilly, London W1J 0BA, UK
secretariat@euchems.org
www.euchems.org

EuCheMS is registered as "Association internationale sans but lucratif" (AISBL, international non-profit association)

AISBL-Registered office: Avenue E. Van Nieuwenhuysse 4, B-1160 Brussels

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	1	EDITORIAL	1
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Protilátky proti spermii	3	Antisperm Antibodies	3
T. Sedláčková, J. Zídková, A. Brázdová, M. Melčová, V. Škop, J. Cibulka a Z. Ulčová-Gallová		T. Sedláčková, J. Zídková, A. Brázdová, M. Melčová, V. Škop, J. Cibulka, and Z. Ulčová-Gallová	
Proteiny cytoplazmatickej membrány zahrnuté v rezistencii buniek kvasiniek voči chemoterapeutikám	7	Plasma Membrane Proteins Involved in Cell Resistance to Chemotherapeutics	7
K. Balková a Y. Gbelská		K. Balková and Y. Gbelská	
Prírodné látky rastlinného pôvodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení	12	Natural Compounds of Plant Origin and Their Application in Therapy of Oncological Diseases	12
P. Cibíková, M. Šturdíková a M. Maruna		P. Cibíková, M. Šturdíková, and M. Maruna	
Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací	21	Increasing Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs by Their Modification	21
L. Okáčová, D. Vetchý, A. Franc, M. Rabišková a B. Kratochvíl		L. Okáčová, D. Vetchý, A. Franc, M. Rabišková, and B. Kratochvíl	
Názvosloví léčiv se zřetelem na lékopisné názvy	27	Drug Nomenclature in View of Pharmacopoeial Names	27
J. Kolář, T. Ambrus a V. Špringer		J. Kolář, T. Ambrus, and V. Špringer	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy Experion a porovnání s metodou SDS-PAGE	33	Protein Analysis Using Automated Experion Chip Electrophoresis and Its Comparison with SDS-PAGE	33
J. Bárta, V. Bártová a V. Čurn		J. Bárta, V. Bártová, and V. Čurn	
Stanovení tloušťky obalu tablet blízko infračervenou spektroskopií	41	Determination of the Thickness of Tablet Coating by Near-Infrared Spectroscopy	41
J. Muselík, K. Krejčová, M. Rabišková, A. Bartošiková, M. Dračková a L. Vorlová		J. Muselík, K. Krejčová, M. Rabišková, A. Bartošiková, M. Dračková, and L. Vorlová	
Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů	46	Using the Ellman Method for In Vivo Testing of Cholinesterase Activity	46
J. Žďárová-Karasová, K. Kuča, D. Jun a J. Bajgar		J. Žďárová-Karasová, K. Kuča, D. Jun, and J. Bajgar	
Separace kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů z <i>Macleaya cordata</i>	51	Separation of Quaternary Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from <i>Macleaya cordata</i>	51
J. Vičar, M. Sural a J. Hlaváč		J. Vičar, M. Sural, and J. Hlaváč	
RECENZE	54	BOOK REVIEWS	54
LIBLICE 2009 - Dodatky	56	LIBLICE 2009 - Supplement	56

BULLETIN ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Lze něčím nahradit radioisotopy ^3H a ^{14}C v biomedicínském výzkumu? T. Elbert	63
Ze života chemických společností	64
Akce v ČR a v zahraničí	66
Členská oznámení a služby	67
Anglické okénko, horké novinky z chemie	68
Odborná setkání	71
Chemik na cestách	73
Osobní zprávy	74
Výročí a jubilea	77

BULLETIN OF THE CZECH CHEMICAL SOCIETIES

Can Radioisotopes ^3H and ^{14}C Be Replaced in Biomedical Research? T. Elbert	63
From the Chemical Societies	64
Meetings Calendar	66
Member Services and Announcements	67
English Column, Hot News from Chemistry	68
Meetings and Conferences	71
Chemist on a Business Trip	73
Personal News	74
Anniversaries and Jubilees	77

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 1 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • 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 Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • 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, fax +420 222 220 184, 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./fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plně předplatné 2009 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBÓN & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 5.1.2010.