

Financování vědecké práce

Mívám barvitě sny, jako filmy od Stanleyho Kubricka. V těch snech se široce zavřenýma očima analyzuji své snové iracionální okolí a nalézám, tak jako každý zaujatý pozorovatel, na prvý pohled nejen takové nesrovnalosti jako, že si někdo vezme na ples či koncert pouze omšelý odpolední oblek, ale vidím i to, že pánovi z límečku saka nobl smokingu vykukuje sponka zapínacího motýlku, či to, že si pán do fraku vzal košili s kapsičkami na prsou. Prostě a jednoduše tam vidím, že věci „nehrají dohromady“. Cítím však, že pokud potíží je v tom, že ten pán víc na sebe nemá a je chud, je to vidět.

Vo mnoho více hororoidních snech o financování a hodnocení vědy na našem českém pískovišti je to podobné. Nenajdete v mých snech spokojeného jedince. Ať již proto, že „ty zatracené grantovky“ chtějí prý jako výstup pouze publikaci v recenzovaném a impaktovaném časopise; anebo proto, že je bezudně financována činnost (pravděpodobně ve srovnání s úrovní toho pána v masce z benátského karnevalového reje, který pronáší výrok) podměrečná, nezasloužící si ani lidské ba ani finanční pozornosti, ubírající tak možnosti financovat „skutečnou a pravou vědu“. Jiným pak vadí maličkosti, jako, že museli hlídat na koruny každoroční bilanci několikaletého projektu i s tím, že se jako „v minulém století“ kupovaly koncem roku zbytečnosti, či to, že si někteří zvláště vypečení jedinci nadržávají navzájem finance přímo do ruky. Potíž cítím v tom, že „ten pán na víc nemá a je chud“, ale i v tom, že je to vidět.

Analyzuji sen dále a vidím, že ve světě naplněném pokrytectvím a pychou jsme okopirovali model, který ve velkých systémech téměř fungoval. Okopirovali jsme papírování, posudkování, hodnocení, učení komise, nadkomise, podkomise, a podpodkomise, formuláře o tisíce stranách, ve kterých forma vítězí nad obsahem, ale systém jsme naplnili zlomkem peněz, ve srovnání s úrovní toho modelu, který jsme kopirovali. Na malém hnojišti, kde je pět badavých kohoutů pak tito jmenovaní svedli nelítostný boj o financování čehosi, co každý považoval za vědecky vzrušující a neodkladné. Kohouti z této pětičky psali posudky tvrdě, přetvrdě, či posílali posoudit projekty lidem, o nichž bylo známo, že pro ně „jen to nejlepší je dost dobré“, neboť jenom tak bylo lze dosíci dalšího pokroku věd tu i onde (to jest, aby to, co z jejich pohledu nemá být financováno, poskytlo peníze do malutkého kadlubu, o kterém se právě rozhoduje). Aby se mezi sebou lépe utkali, vypustili jeden na druhého strašlivou hydru, ekonomicko-právnícko-úřednickou lobby, která uchopivše skvělou příležitost (neboť bez ní v budoucnu věda nebude vůbec možná) udělala si z toho kšeftiku vynikající živnost. Nakonec se do toho pustili i mafiáni a za pár „kapříků“ udělali ve všem pořádek po svém.

Sny mohou někdy být i optimističtější, neboť v tomto světě postupně peněz vložených do systému skutečně přibývalo, ale nezměnil se systém, ve kterém badající nebožák, který tyto peníze získal (namnoze z mnoha zdrojů) musí věnovat podstatnou část své bdělé existence na administraci svého portfolia a bádá, jak by řekl Werichův Císař, „o to méně“.

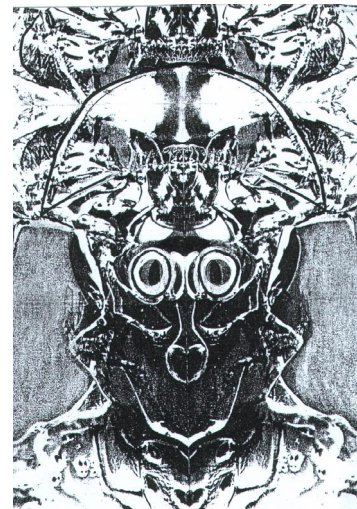
Budím se ze sna a začínám upřímný pocit, že nadešel čas dychtící po změně. Tu změnu si v polosnu představuji například tak, že (a zase je možno kopírovat systém, který se osvědčil) badatel, který úspěšně splnil několik projektů, má dostatečnou kvalifikaci odbornou, kapacitu lidské síly, ustojí bibliografickou analýzu své produkce, dostane na základě určitého řízení cosi,

čemu se například u školníků říkávalo „definitiva“ a bude bádát až do doby, kdy toho sám nechá, nebo do doby, kdy se na třetí vážné varování nevrátí zpět do skupiny se žádanými vlastnostmi (tudíž, není to „trafika“ nadosmrti). Říkám, že bude bádát a ne vyplňovat o své práci hlášení o obecně známých věcech, jako třeba o svých „publikacích“, neboť každý gramotný člověk ví, že je najde na „Web-of-Science“, pokud citace za něco stojí. To,

jestli děkuje tomu nebo onomu zdroji financí pak příčinnivý úředník snadno alokuje, protože badatel, o něž je postaráno, nemusí bádát na čtrnácti projektech, ale na jednom a pořádně. Svět se zjednoduší i tak, že napříště budou existovat jen tři účty „mzdy“, „provozní prostředky“ a „investice“. Poskytovatel peněz bude rád, když v poloze „mzdy“ bude hodně peněz, neboť se tak ve vědě a výzkumu vytvoří nová pracovní místa a na bruselské šlehnutí kouzelného proutku rostoucí počet odborně vzdělaných lidí najde i práci. To, že budou silně obsazeny i finance investiční způsobí, že dlouhodobý pokrok pak již ničím nepůjde zadržet. I o mládež bude postaráno. Každý bude moci soutěžit o finance na práci, například tak, jak je tomu v soutěži o granty Sigma-Aldrich, kde mladí vědci dostávají granty ne za to, co naslibují, ale za to, co již udělali a jak to dokáží „prodat“ (a jde to tak prý již 6 let !!).

V tom polospánku před sebou vidím i to, že bádající jsou sice přisně, leč lidsky hodnoceni (a hodnotitelé přepětlivě vybiráni a respektováni), aniž jsou však vyrušováni z plodných odborně-badatelských úvah a učených disputací bez důvodu, neboť jak již bylo řečeno, o skutečné vědecké práci je vše podstatné každoročně veřejně a přehledně publikováno a je mrhání penězi a lidskou silou, pokud to děláme podruhé (byť česky). Důvodem k vyrušení bude snad například dotaz po nenalezené odborné publikaci za poslední období, na který jaře badatel odpoví, že taková skutečně není, protože je přihlášen patent a na tento patent si již brousí zuby finančně silná skupina filantropicky šířící „dobrodružný“ (venture) kapitál a takovou publikaci by si řečený kapitalista nepřál, a doloží to „Letter of Intent“.

Polospánek se snad změní ve věštecké vytržení a já (možná i nad miskou dýmajícího koření) uvidím tým badatelů, který „má skvělý tah na branku“, není podvyživen a o nějž je společensky pečováno, nejen slovy. Nejedna filozof-samouk si sice myslí, že nejlépe se bádá v nouzi, leč takový výrok vyvolává u zasvěcenců úsměv, neboť my již víme, že „ten pán, který toho moc nemá a je chud“ toho taky moc nevybádá; a to bylo, je a bude snadno vidět.



Grafika J. Hanzlík

Pavel Drašar

ENDOKANABINOIDY

ZDENĚK FIŠAR

Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 11, 120 00 Praha 2
zfishar@lf1.cuni.cz

Došlo 6.4.05, přijato 12.11.05.

Klíčová slova: kanabinoidy, anandamid, membrány, arachidonová kyselina

Obsah

1. Úvod
2. Endogenní kanabinoidy
3. Mechanismy působení
4. Biosyntéza a inaktivace endokanabinoidů
5. Buněčné membrány a kanabinoidy
6. Vztah struktury a aktivity kanabinoidů
7. Závěry

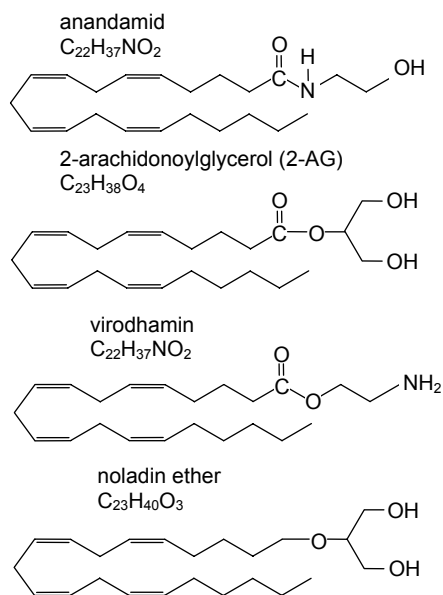
1. Úvod

Objev endogenních kanabinoidů a studium fyziologických funkcí kanabinoidního systému v mozku přinesl řadu důležitých poznatků o úloze membránových lipidů a mastných kyselin v přenosu nervového signálu. Specifické účinky kanabinoidů jsou zajištěny aktivací kanabinoidních receptorů, avšak díky lipofilnímu charakteru těchto látek může být řada jejich účinků zprostředkována i noreceptorovými mechanismy, např. přes změnu vlastností lipidových částí buněčných membrán. Úlohu lipidových dvojvrstev v aktivitě kanabinoidního systému dokládá i skutečnost, že *i)* zdrojem a zásobárnou endogenních kanabinoidů jsou membránové lipidy a *ii)* hlavní endogenní kanabinoidy jsou odvozeny od kyseliny arachidonové, která je významnou složkou membránových lipidů. Vztah struktury a funkce rostlinných, endogenních nebo syntetických kanabinoidů a dalších molekul ovlivňujících kanabinoidní systém v mozku (inhibitorů membránových kanabinoidních přenašečů nebo enzymů katabolizujících kanabinoidy) je intenzivně studován s cílem nalézt léčiva, která by měla terapeutické účinky připisované fytokanabinoidům, aniž by vykazovala jejich současné negativní účinky na kognitivní funkce uživatele.

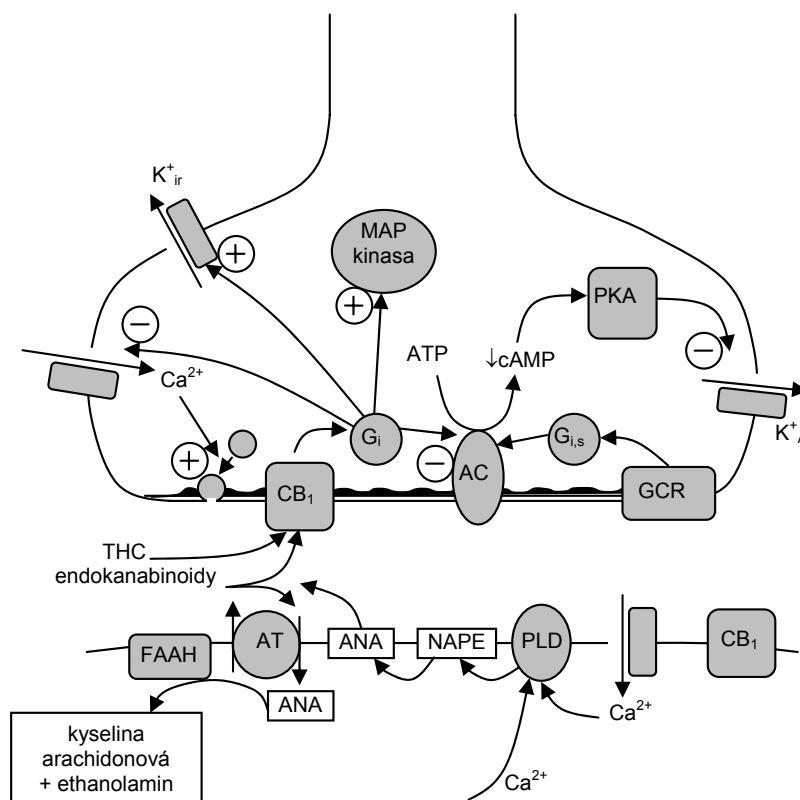
2. Endogenní kanabinoidy

Endogenními ligandy kanabinoidních receptorů (endokanabinoidy) jsou např. anandamid (*N*-arachidonylethanolamid), *sn*-2-arachidonoylglycerol (2-AG), noladin ether (2-arachidonoylglycerylether), virodhamin (*O*-arachidonylethanolamin), *N*-arachidonoyldopamin a snad i *N*-palmitoylethanolamid, oleamid a další^{1–7} (obr. 1). Endokanabinoidy jsou v mozku široce distribuovány a jsou syntetizovány a uvolňovány při stimulaci neuronů. Z mimobuněčného prostoru jsou odstraňovány selektivním saturovatelným systémem zpětného vycytávání a poté jsou nitrobuněčně hydrolyzovány (anandamid pravděpodobně na kyselinu arachidonovou a ethanolamin) hydrolasou amidu mastných kyselin (FAAH).

Anandamid vykazuje výrazně vyšší afinitu pro kanabinoidní receptor CB₁ (89 nmol l⁻¹) než pro receptor CB₂ (371 nmol l⁻¹)⁸. 2-AG má rovněž vyšší afinitu k CB₁ (472 nmol l⁻¹) než k CB₂ (1400 nmol l⁻¹) receptoru³. 2-AG soutěží s anandamidem o „uptake“ anandamidovým přenašečem. Enzym FAAH hydrolyzuje 2-AG čtyřikrát rychleji než anandamid. Identifikace palmitoylethanolamidu nebo oleamidu jako endogenních kanabinoidů je dosud sporná.



Obr. 1. Endogenní kanabinoidy

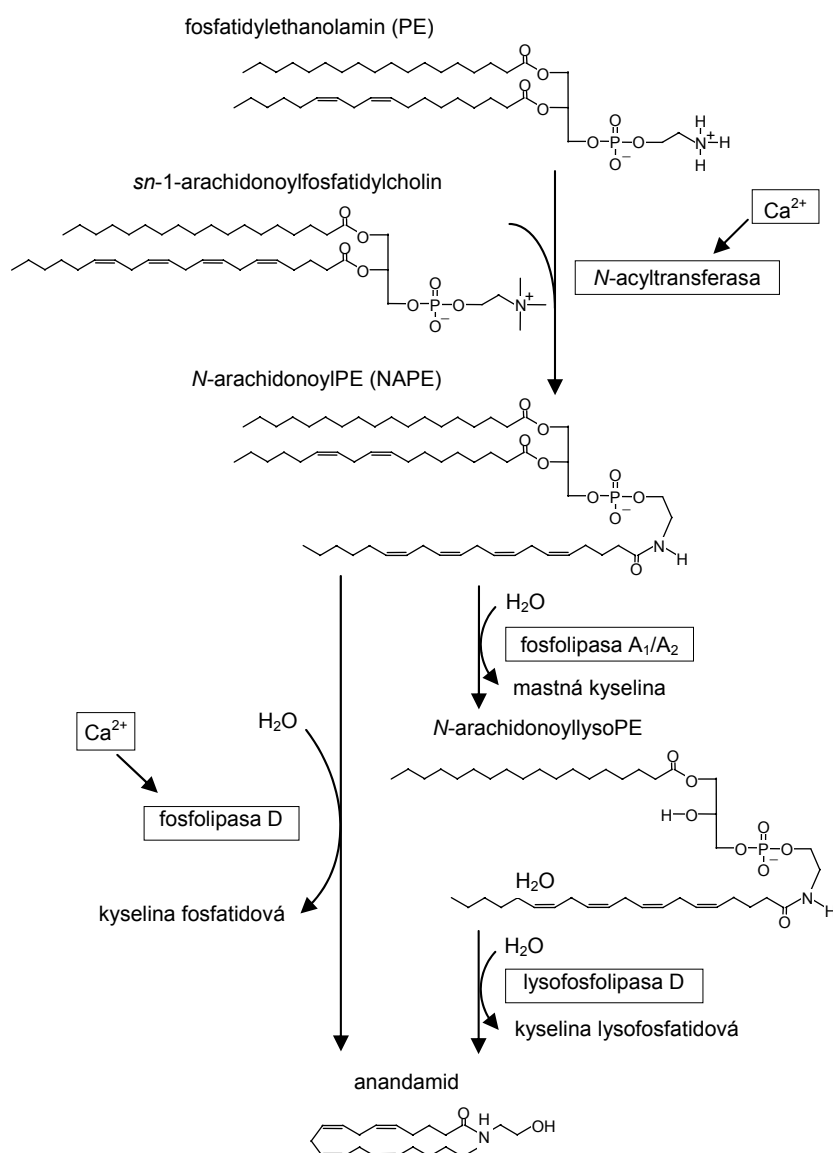


Obr. 2. **Mechanismy působení kanabinoidů**; pro syntézu endokanabinoidů je potřebné velké přechodné zvýšení nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} , kterého je dosaženo uvolněním Ca^{2+} z nitrobuňkových zásob (aktivací inositol-1,4,5-trifosfátového systému) nebo vstupem Ca^{2+} přes napětově řízené iontové kanály nebo přes interní iontové kanály aktivovaných receptorů. Může dojít ke stimulaci fosfolipasa, přičemž fosfolipasa D (PLD) katalyzuje hydrolyzu *N*-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (NAPE) a vzniká anandamid (ANA). Fosfolipasa C katalyzuje hydrolyzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerollipasa potom katalyzuje vznik 2-arachidonoylglycerolu (není zobrazeno). Nově vytvořené endogenní kanabinoidy nebo externě dodané tetrahydrokanabinoly (THC) aktivují kanabinoidní receptory CB_1 lokalizované v presynaptické nebo postsynaptické membráně. Anandamid je z mimobuňkového prostředí odstraňován specifickým membránovým přenašečem (AT) a poté je v buňce hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a ethanolamin pomocí membránového enzymu, hydrolasy amidu mastných kyselin (FAAH). AT může přenášet i 2-arachidonoylglycerol, který je potom pomocí lipasy hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a glycerol (není zobrazeno). Aktivace CB_1 receptoru v presynaptickém nervovém zakončení aktivuje G proteiny, které stimulují mitogenem aktivovanou proteinkinasu (MAP kinasu) a inhibují adanylátcyklasu (AC), čímž se snižuje tvorba cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Dále G proteiny aktivované CB_1 receptorem inhibují napětově řízené kalciové kanály a stimulují určité draslíkové kanály (GIRK). Inhibice vstupu kalcia do presynaptického zakončení vede ke sníženému uvolňování různých neurotransmiterů. Snížení koncentrace cAMP vede ke snížené aktivitě proteinkinasy typu A (PKA), což způsobuje mimo jiné i menší fosforylaci draslíkových kanálů typu A a tím další zvýšení výstupu draslíkových iontů. Aktivaci CB_1 receptoru může být ovlivněna funkce řady dalších presynaptických receptorů napojených na G proteiny (GCR) a aktivujících či inhibujících AC

3. Mechanismy působení

Endokanabinoidy jsou lipofilní signální molekuly syntetizované *de novo* z membránových fosfolipidů v odezvě na postsynaptickou depolarizaci nebo aktivaci metabotropních glutamátových receptorů. V posledních letech bylo potvrzeno, že endokanabinoidy zprostředkují zpětný signál od postsynaptických neuronů k presynaptickým (obr. 2), tj. indukované uvolňování řady neurotransmiterů v mozku může být inhibováno aktivací presy-

naptických CB_1 receptorů lokalizovaných na různých typech nervových zakončení v mozku^{4,9,10}. Inhibice endokanabinoidy trvá až desítky sekund¹¹, tedy mnohem déle než např. inhibice vyvolaná uvolněním GABA a mnohem kratší dobu než je potřebná pro změnu synaptické síly vyvolanou nějakou formou synaptické plasticity. Fyziologická funkce kanabinoidního systému je velmi komplexní a zahrnuje motorickou koordinaci, paměť, chuť k jídlu, modulaci bolesti a neuroprotekcí. Do těchto procesů jsou pravděpodobně zapojeny další podtypy kanabinoidních receptorů a kapsaicinové (vaniloidní) receptory.



Obr. 3. Biosyntéza anandamidu

Řadu farmakologických účinků kanabinoidů lze vysvětlit jejich interakcemi s neuromodulátory a neurotransmiterovými systémy; inhibice uvolňování neurotransmiterů agonisty CB₁ receptorů byla popsána pro acetylcholin, dopamin, kyselinu γ -aminomáselnou, histamin, serotonin, glutamát, noradrenalin, prostaglandiny a opioidní peptidy. Při interpretaci účinků kanabinoidů je však nutno mít na vědomí skutečnost, že inhibice uvolňování neurotransmiterů neznamena obecně snížení neuronální aktivity, neboť některé neurotransmitery aktivují i receptory inhibující přenos signálu. Za nejvýznamnější pro vznik efektu odměny, tolerance a fyzické závislosti na kanabinoidech jsou pravděpodobně odpovědné funkční interakce

kanabinoidního systému s dopaminergními a opioidními systémy¹². Většina účinků kanabinoidů je zprostředkována kanabinoidními receptory v CNS¹⁰, ale jsou známy i také jejich účinky, které jsou alespoň částečně nezávislé na receptorech, např. neuroprotektivní účinky při ischemii a hypoxii¹³. Předpokládá se proto, že některá působení endogenních kanabinoidů jsou zprostředkována jejich metabolity nebo přes nerekceptorové mechanismy¹⁴.

4. Biosyntéza a inaktivace endokanabinoidů

Anandamid, 2-AG a některé další endogenní kanabinoidy (obr. 1) jsou odvozeny od kyseliny arachidonové

(kyselina 5,8,11,14-ikosatetraenová, 20:4), která je jednou z nenasycených mastných kyselin obsažených ve fosfolipidech buněčných membrán. Kyselina arachidonová je nenasycená C₂₀ mastná kyselina se čtyřmi dvojnými vazbami (nekonjugovanými); dvojná vazba na uhlíku C₁₄ je vzdálena od koncového uhlíku o 6 uhlíkových atomů (jedná se o n-6 mastnou kyselinu). U lidí je kyselina arachidonová prekurzorem prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů a leukotrienů¹⁵. V mozku tvoří arachidonát až 10 % z celkových mastných kyselin. Arachidonát je v membránách ukládán a esterově vázán především ke glycerolovému uhlíku C₂ (*sn*-2) ve fosfolipidech a uvolňován je *i*) hydrolyzou těchto molekul fosfolipasou A₂, *ii*) kombinovaným postupným působením fosfolipasy C, diacylglycerolkinasy a fosfolipasy A₂, *iii*) hydrolyzou diacylglycerolipasou. Většina arachidonátu je inkorporována ve fosfatidylcholinu, fosfatidylinositolu a fosfatidylethanolaminu (PE).

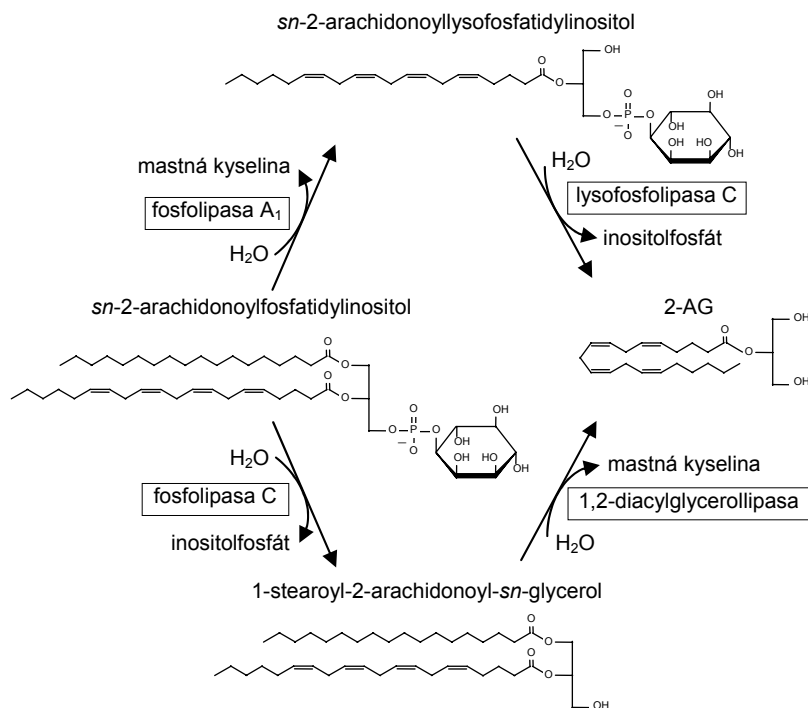
Anandamid i 2-AG nejsou zřejmě syntetizovány do zásoby, ale na požadavek, v odezvě na postsynaptickou depolarizaci nebo aktivaci receptorů^{11,16}. Jejich syntéza není dosud zcela známa, zdá se však, že anandamid může být v membránách uložen jako *N*-arachidonoylfosfatidylethanolamin (NAPE), tj. esterifikován na třetím uhlíku *sn*-glycerol-3-fosfátu¹⁷. Tento prekurzor anandamidu tvoří pouze asi 0,1 % ze všech *N*-acylethanolaminových fosfolipidů v neuronech¹⁸. Předpokládá se, že anandamid je z NAPE uvolňován přímo pomocí fosfolipasy D (PLD). Nově je studována i druhá možná cesta uvolňování anan-

damidu z NAPE (cit.¹⁹), a to jeho hydrolyzou fosfolipasou A₁ (PLA₁) nebo A₂ (PLA₂) na *N*-arachidonoyllysofosfatidylethanolamin s následným uvolněním anandamidu lysofosfolipasou D (obr. 3).

Obecně se předpokládá, že v mozku, stejně jako v jiných tkáních, je arachidonát esterifikován hlavně na *sn*-2 pozici fosfolipidů se zbytky nasyčených nebo mononenasycených mastných kyselin, jako je kyselina olejová (18:1), palmitová (16:0) nebo stearová (18:0), na pozici *sn*-1 (cit.²⁰). To je v určitém rozporu se substrátovou specificitou *N*-acyltransferasy, která v mozku katalyzuje biosyntézu NAPE přenosem arachidonátové skupiny z *sn*-1 uhlíku fosfolipidů na aminoskupinu PE (obr. 3). Bylo potvrzeno, že *sn*-1 arachidonoylfosfolipidy jsou v mozku skutečně přítomny^{17,21} a tvoří cca 0,5 % celkových fosfolipidů.

Jak tvorba anandamidu, tak syntéza NAPE mohou probíhat paralelně a jsou spouštěny zvýšením nitrobuňčného Ca²⁺. Při vysokých (nefyziologických) koncentracích arachidonátu a ethanolaminu je možná i přímá syntéza anandamidu katalyzovaná FAAH; tato syntéza zřejmě nemá význam ve fyziologické tvorbě anandamidu.

Rovněž biosyntéza 2-AG je v mozku vyvolána neuronální aktivitou provázenou zvýšením nitrobuňčných koncentrací Ca²⁺. Na rozdíl od anandamidu, je v syntéze 2-AG zahrnuta stejná kaskáda enzymů jako při tvorbě druhých posílů – inositol-1,3,5-trifosfátu a 1,2-diacylglycerolu. 2-AG může vznikat z diacylglycerolu po hydrolyze membránových lipidů obsahujících zbytky kyseliny arachidonové.



Obr. 4. Biosyntéza 2-arachidonoylglycerolu (2-AG)

Hlavními zdroji 2-AG jsou pravděpodobně inositolové fosfolipidy nebo kyseliny fosfatidové. Rovněž 2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-fosfát, který tvoří významnou část (5,4 %) lysofosfatidových kyselin vyskytujících se v mozku, může být specifickou fosfatasou²² defosforylován na 2-AG a obráceně 2-AG může být pomocí monoacylglycerolkinasy konvertován na 2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-fosfát (cit.²³). Předpokládá se proto, že biosyntéza 2-AG je možná dvěma hlavními cestami⁷ (obr. 4):

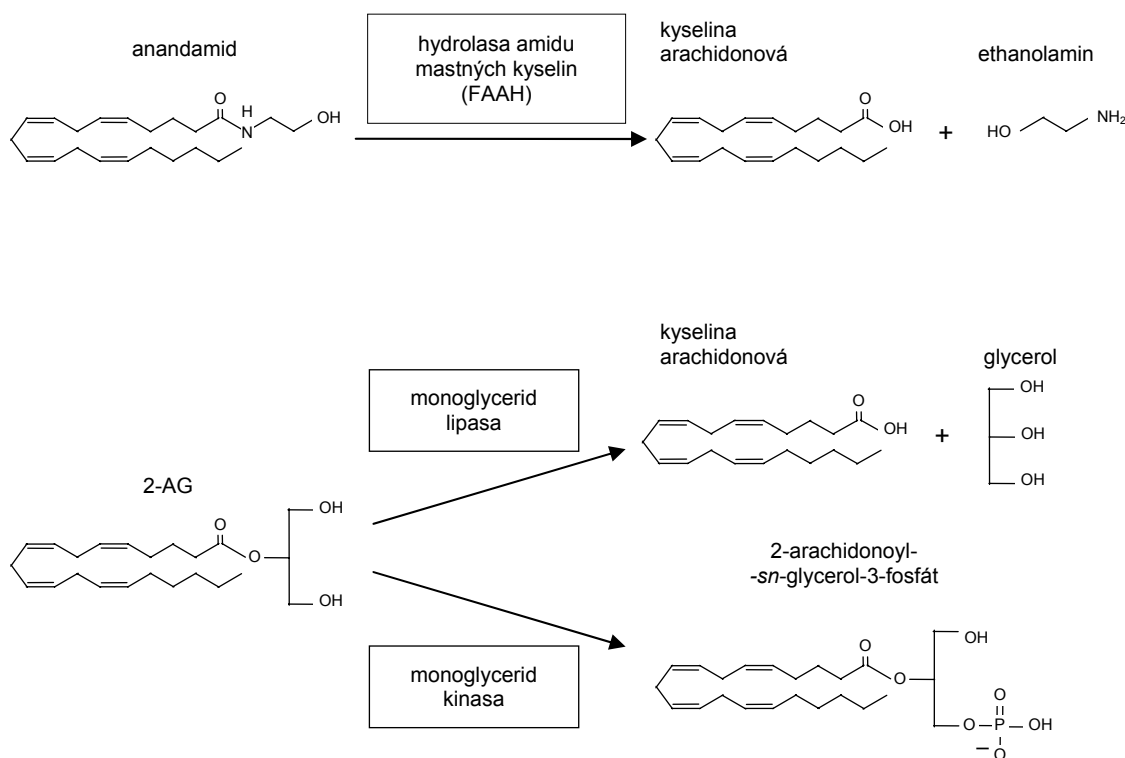
1. hydrolýzou membránových fosfolipidů pomocí aktivované fosfolipasy C (PLC) je produkovan diacylglycerol (obvykle 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol), který je poté konvertován na 2-AG pomocí 1,2-diacylglycerollipasy;
2. fosfolipasa A₁ (PLA₁) produkuje lysofosfolipid, který může být dále hydrolyzován:
 - a) na 2-AG pomocí lysofosfolipasy C,
 - b) na kyselinu lysofosfatidovou pomocí lysofosfolipasy D a poté defosforylován na 2-AG.

Podobně jako jiné neurotransmitery jsou endokanabinoidy po jejich tvorbě a uvolnění rychle inaktivovány (obr. 5). Anandamid je transportován zpět do neuronů a glií pomocí specifického přenašečového systému a poté je hydrolyzován na kyselinu arachidonovou a ethanolamin pomocí FAAH nebo jiných nitrobuněčných amidasových

enzymů. 2-AG je transportován do buněk podobným mechanismem jako anandamid. Předpoklad, že FAAH je odpovědný i za eliminaci 2-AG, vycházející ze skutečnosti, že FAAH katalyzuje hydrolýzu 2-AG *in vitro*, se nepotvrdil. Za hydrolýzu 2-AG v mozku je zřejmě odpovědná monoacylglycerollipasa, která konvertuje 2- a 1-monoacylidy na mastnou kyselinu a glycerol²⁴. Podobný mechanismus inaktivace je již dlouho znám pro monoaminové neurotransmitery, jako je serotonin, noradrenalin nebo dopamin, které jsou metabolizovány pomocí nitrobuněčné monoaminoxidas a dovnitř buňky jsou rovněž transportovány specifickými přenašeči. Je proto možné, že podobně jako jsou některá antidepresiva inhibitory monoaminoxidas nebo inhibitory zpětného vychytávání (reuptake) serotoninu nebo noradrenalinu, mohly by být i FAAH (cit.²⁵) nebo přenašeč pro kanabinoidy cílovými místy primárních účinků léků zasahujících do kanabinoidního systému v mozku.

5. Buněčné membrány a kanabinoidy

Kanabinoidy jsou látky, které se podobně jako řada dalších lipofilních molekul vážou (adsorbují) do lipidové dvojvrstvy²⁶. Není známo, zda jejich akumulace v lipidové



Obr. 5. Katabolismus endokanabinoidů

části biologických membrán je či není vztažena k některým vedlejším účinkům jejich užívání. Je však známo, že interakce protein-lipid-lipofilní molekula mohou ovlivnit funkci mnoha membránových systémů podílejících se na buněčných funkcích^{27,28}, včetně přenosu nervového signálu. I když membránové lipidy nejsou specifickými cílovými molekulami kanabinoidů, mohou hrát v mechanismech jejich účinků významnou roli a to nejen jako zdroje endogenních kanabinoidů, ale i jako molekuly vytvářející heterogenní prostředí určující farmakokinetiku kanabinoidů a umožňující či modulující interakce kanabinoidů se specifickými vazebnými místy. Lipofilní charakter agonistů a antagonistů kanabinoidních receptorů svědčí pro to, že specifické vazebné místo na jejich receptoru může být ukryto v hydrofobním vnitřku membrány.

Biologické membrány jsou komplexní systémy, které lze schematicky pojímat jako lipidové dvojvrstvy tvořící základ pro distribuci a funkci integrálních nebo periferních (adsorbovaných) proteinů, které uskutečňují řadu specifických membránových procesů. Umožňují udržování iontových a metabolických gradientů nezbytných pro většinu buněčných funkcí, včetně přenosu nervového signálu. Hlavními lipidovými složkami buněčných membrán jsou glycerofosfolipidy, jejichž základem je *sn*-glycerol-3-fosfát esterifikovaný na uhlících C₁ (*sn*-1) a C₂ (*sn*-2) mastnými kyselinami a na fosforylové skupině další skupinou. V mozku se hojně vyskytují i sfingolipidy, především sfingomyeliny a galaktocerebrosidy. Významnou složkou plasmatických membrán je také cholesterol. Membránové lipidy tvoří jen strukturální základ membrány, ale jsou také substráty fosfolipas a modulátory funkce řady membránových proteinů. Např. transportní mechanismy zahrnující receptory, iontové kanály, enzymy, přenašeče a pumpy jsou často regulovány membránovými lipidy a cholesterolem, samotnými i uspořádanými do lipidové dvojvrstvy^{29–33}. Celkově lze říci, že lipidové dvojvrstvy jsou heterogenní v horizontálním i vertikálním směru a úloha membránových lipidů a mastných kyselin v buněčných funkcích není zdaleka poznána. Rovněž existence a úloha hustotních fluktuací nebo oblastí s nenáhodným lipidovým složením (domény, rafty) je teprve studována^{34,35}.

Polární hlavičky membránových lipidů jsou obvykle tvořeny záporně nabitou fosfátovou skupinou s navázanými kladnými, zápornými, zwiterionickými nebo nenabítenými skupinami. Specifické ovlivnění funkcí membránových proteinů těmito polárními hlavičkami lze vysvětlit na základě elektrostatických interakcí, jejichž specifita je dána prostorovým rozložením náboje jak na povrchu proteinu, tak v polárních hlavičkách interagujících lipidů. Obtížnější je vysvětlení vysoké variability v délce a nasycenosti acylových řetězců, protože pro udržení struktury, uspořádanosti a určité fluidity lipidové dvojvrstvy není tato různorodost nezbytná. Pravděpodobným vysvětlením je možnost přizpůsobení se tvaru acylových řetězců hydrofobnímu povrchu membránových proteinů („hydrophobic matching“), což umožňuje specificky ovlivňovat vlastnosti proteinů³⁶. Proteiny vázající fosfolipidy jsou důležitou

složkou přenosu signálů, přenosu molekul a buněčného metabolismu³⁷. Uhlovodíkové řetězce lipidů vázajících se k proteinům jsou v oblasti proteinových vazebných míst dokonce více konformačně neuspořádané, než je tomu ve fluidní dvojvrstevné membráně³⁸.

Saturované a mononenasyčené mastné kyseliny mohou být syntetizovány v těle *de novo*, avšak esenciální polyneasyčené mastné kyseliny jsou syntetizovány z potravních prekurzorů, linolové kyseliny (18:2) pro n-6 skupinu a α -linolenové kyseliny (18:3) pro n-3 skupinu mastných kyselin. V neuronech se vyskytují především arachidonová kyselina (20:4, n-6) a dokosahexaenová kyselina (22:6, n-3) vázané v pozici *sn*-2 glycerolového základu fosfolipidů. Jak bylo uvedeno výše, je pro biosyntézu anandamidu důležitá vazba arachidonátu v pozici *sn*-1 fosfolipidů, která není častá, ale je postačující pro tvorbu tohoto endokanabinoidu.

Mimobuněčné, membránové i nitrobuněčné esenciální mastné kyseliny a jejich metabolity mohou ovlivňovat řadu dějů vztažených k transdukcí signálu, genové expresi, růstu či smrti buněk, motilitě a adhezi¹⁵. Z hlediska psychotropních účinků endogenních kanabinoidů (derivátů arachidonové kyseliny), je zajímavé, že úloha esenciálních nenasycených mastných kyselin je již dlouho diskutována v některých biochemických hypotézách afektivních poruch a schizofrenie. Tyto hypotézy vycházejí z předpokladu, že pro normální vývoj a funkci mozkových struktur je nezbytný normální neuronální fosfolipidový metabolismus. Ke vzniku příznaků schizofrenie potom může docházet např. v důsledku zvýšené rychlosti eliminace arachidonové a dokosahexaenové kyseliny z neuronů³⁹. Membránové hypotézy afektivních poruch zase předpokládají, že zvýšený poměr mezi příjmem n-6 a n-3 esenciálních mastných kyselin může vést ke zvýšené náchylnosti ke vzniku deprese⁴⁰.

6. Vztah struktury a aktivity kanabinoidů

Specifitu interakcí kanabinoid-protein zajišťují mnohonásobné nekovalentní vazby mezi polárními a hydrofobními skupinami těchto molekul vyžadující vhodné prostorové uspořádání proteinového vazebného místa a molekuly kanabinoidu. Na nesespecifické vazbě kanabinoidů do lipidové části buněčných membrán, tj. na interakcích kanabinoid-lipid, se podílí především hydrofobní efekt (při inkorporaci do membrány) a krátkodosahové van der Waalsovy síly (při interakcích se zbytky mastných kyselin v hydrofobním vnitřku dvojvrstvy).

Celkový tvar molekul endogenních kanabinoidů, podobně jako tvar molekul membránových lipidů, je určen hlavně konformací jejich uhlovodíkových řetězců. Změny prostorového uspořádání jsou přitom umožněny relativně volnými rotacemi kolem jednoduchých vazeb C–C. Dvojně vazby nenasycených mastných kyselin mají *cis* (Z) konfiguraci, což způsobuje rigidní ohyb o 30° v uhlovodíkovém řetězci. Větší zastoupení dvojných vazeb potom vede k velmi složitým tvarům molekul. Vztah

struktury a aktivity anandamidu i jiných kanabinoidů je v současné době intenzivně studován s cílem určit strukturální požadavky pro syntetické agonisty a antagonisty kanabinoidních receptorů a pro substráty či inhibitory FAAH a anandamidového přenašeče^{41,42}.

Významným rysem acylového řetězce arachidonové kyseliny je velká torzní pohyblivost umožněná skutečností, že *cis* dvojné vazby jsou odděleny jednou methylenovou skupinou, což dává těmto řetězcům větší flexibilitu ve srovnání s jinými nenasyčenými acylovými řetězci⁴³. Arachidonová kyselina se proto může vyskytovat v mnoha konformacích, z nichž čtyři se vyskytují nejčastěji: *i*) protažená, *ii*) U-tvar, *iii*) J-tvar a *iv*) spirálová. Ve vodě minimalizuje arachidonová kyselina expozici svých hydrofobních částí tím, že tvoří kompaktnější U-tvar⁴⁴. Podobně jako arachidonová kyselina, i anandamid se ve vodném prostředí vyskytuje v řadě různých konformací, přičemž převažují smíšené konformace protaženého tvaru a U-tvaru. Rovněž pro 2-AG ve vodném prostředí převažují struktury typu U-tvar. V nepolárním prostředí se vyskytuje protažený tvar i U-tvar. Protažený tvar a složený tvar (U-tvar) molekul anandamidu, 2-AG nebo arachidonátu jsou schematicky znázorněny na obr. 3, 4, 5.

Bylo potvrzeno, že pro vysokou afinitu vazby anandamidu k CB₁ receptoru je nezbytná přítomnost karbonylové skupiny v hlavičkové skupině anandamidu⁴⁵, oproti tomu hydroxylová skupina není pro receptorovou interakci významná. Vysokoafinní vazba dále vyžaduje vysokou flexibilitu acylového řetězce anandamidu, neboť pouze jeho analogy s třemi a více dvojnými vazbami vykazují vysokou afinitu k CB₁. Předpokládá se, že pro interakci anandamidu s CB₁ receptorem je potřebná jeho složená (zahnutá) konformace. Tuto hypotézu podporuje i porovnání možných tvarů molekuly anandamidu s tvarem molekuly Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC), kdy k dobrým překryvům molekulových objemů dochází pro složené konformace anandamidu (především U-tvar)^{46,47}. Lze tak vysvětlit skutečnost, že molekuly tak odlišné jako jsou endogenní kanabinoidy a Δ^9 -THC, aktivují stejné receptory. Podobně jako u anandamidu, rovněž ve struktuře Δ^9 -THC bylo identifikováno více skupin ovlivňujících aktivaci kanabinoidních receptorů, především fenolický hydroxyl, boční řetězec a methylové skupiny⁴⁸. Nezbytnou součástí kanabinoidního farmakoforu je také dostatečná délka saturovaného zbytku acylového řetězce. Dosavadní výsledky také ukazují, že CB₁ receptor, FAAH a anandamidový přenašeč mají poněkud odlišné požadavky pro vysokoafinní vazbu.

Předpokládá se, že *i*) některá onemocnění mohou být podmíněna nedostatečnou funkcí endokanabinoidního systému⁴⁹, *ii*) kanabinoidy mohou vykazovat terapeutické účinky v léčbě některých nemocí. Vztah struktury a funkce kanabinoidů a dalších molekul ovlivňujících kanabinoidní systém v mozku je proto intenzivně studován s cílem nalézt léčiva, která by měla terapeutické účinky připisované fytokanabinoidům^{50,51}, aniž by vykazovala současně negativní účinky na kognitivní funkce uživatele. Kromě agonistů a antagonistů CB₁ receptorů se jedná především o inhi-

bitory membránového anandamidového přenašeče nebo inhibitory enzymů katabolizujících kanabinoidy.

7. Závěry

Hlavní účinky kanabinoidů na centrální nervový systém jsou zprostředkovány kanabinoidními receptory CB₁. Endogenními agonisty těchto receptorů v mozku jsou především anandamid a 2-AG, které inhibují uvolňování různých neurotransmiterů z presynaptických zakončení. Vzhledem k lipofilním vlastnostem kanabinoidů dochází k jejich akumulaci v lipidové části buněčných membrán a k možnosti obsazovat vazebná místa lokalizovaná na hydrofobních částech integrálních proteinů. Je tak umožněno i nespecifické ovlivňování funkce nереceptorových membránových proteinů, které se však na přenosu signálu podílejí. Ovlivněna může být rovněž funkce lipidové části buněčných membrán a úloha esenciálních mastných kyselin. Spektrum možných změn v kanabinoidním systému po dlouhodobém užívání kanabinoidů je tedy velmi široké a dosud málo známé; jejich pochopení souvisí s pokroky v poznání normálních buněčných funkcí, především v oblasti účinků endogenních kanabinoidů.

Hlavní endogenní kanabinoidy jsou odvozeny od arachidonové kyseliny, která je jednou z nejvýznamnějších nenasyčených mastných kyselin v mozku. Variabilita tvaru arachidonátu a tedy i acylového řetězce anandamidu či 2-AG je nezbytná pro aktivaci kanabinoidního receptoru a umožňuje přijmout molekulám endogenních kanabinoidů podobný tvar, jako mají mnohem rigidnější tetrahydrokanabinoly. Lze tak vysvětlit skutečnost, že endokanabinoidy a Δ^9 -THC aktivují stejné receptory. Poznání vztahu struktury a funkce kanabinoidů může pomoci při hledání látek působících terapeuticky u řady onemocnění, včetně poruch vyvolaných klinickou nedostatečností endokanabinoidního systému.

Tato práce vznikla s podporou grantu IGA MZ ČR č. NR8408-3/2005.

LITERATURA

1. Devane W. A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.: *Science* 258, 1946 (1992).
2. Hanuš L., Gopher A., Almog S., Mechoulam R.: *J. Med. Chem.* 36, 3032 (1993).
3. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanuš L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., Pertwee R. G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z.: *Biochem. Pharmacol.* 50, 83 (1995).
4. Barg J., Frider E., Hanuš L., Levy R., Matus-Leibovitch N., Heldman E., Bayewitch M., Mechoulam R., Vogel Z.: *Eur. J. Pharmacol.* 287, 145 (1995).

5. Mechoulam R., Frider E., Hanuš L., Sheskin T., Bisogno T., Di Marzo V., Bayewitch M., Vogel Z.: *Nature* 389, 25 (1997).
6. Hanuš L., Abu-Lafi S., Frider E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I., Mechoulam R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3662 (2001).
7. Freund T. F., Katona I., Piomelli D.: *Physiol. Rev.* 83, 1017 (2003).
8. Showalter V. M., Compton D. R., Martin B. R., Abood M. E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 989 (1996).
9. Maejima T., Ohno-Shosaku T., Kano M.: *Neurosci. Res.* 40, 205 (2001).
10. Howlett A. C., Breivogel C. S., Childers S. R., Deadwyler S. A., Hampson R. E., Porrino L. J.: *Neuropharmacology* 47, 345 (2004).
11. Kreitzer A. C., Regehr W. G.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 324 (2002).
12. Tanda G., Goldberg S. R.: *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 115 (2003).
13. Hampson A., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 9. The Haworth Integrative Healing Press, New York 2002.
14. Adams I. B., Compton D. R., Martin B. R.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 1209 (1998).
15. Jiang W. G., Bryce R. P., Horrobin D. F.: *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 27, 179 (1998).
16. Varma N., Carlson G. C., Ledent C., Alger B. E.: *J. Neurosci.* 21:RC188, 1 (2001).
17. Cadas H., di Tomaso E., Piomelli D.: *J. Neurosci.* 17, 1226 (1997).
18. Hansen H. H., Hansen S. H., Schousboe A., Hansen H. S.: *J. Neurochem.* 75, 861 (2000).
19. Sun Y.-X., Tsuboi K., Okamoto Y., Tonai T., Murakami M., Kudo I., Ueda N.: *Biochem. J.* 380, 749 (2004).
20. Shetty H. U., Smith Q. R., Washizaki K., Rapoport S. I., Purdon A. D.: *J. Neurochem.* 67, 1702 (1996).
21. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y., Waku K.: *Eur. J. Biochem.* 240, 53 (1996).
22. Hiroyama M., Takenawa T.: *Biochem. J.* 336, 483 (1998).
23. Nakane S., Oka S., Arai S., Waku K., Ishima Y., Tokumura A., Sugiura, T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 402, 51 (2002).
24. Dinh T. P., Freund T. F., Piomelli D.: *Chem. Phys. Lipids* 121, 149 (2002).
25. Cravatt B. F., Lichtman A. H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 469 (2003).
26. Herbette L. G., Chester D. W., Rhodes D. G.: *Biophys. J.* 49, 91 (1986).
27. Mason R. P., Rhodes D. G., Herbette L. G.: *J. Med. Chem.* 34, 869 (1991).
28. Seydel J. K., Velasco M. A., Coats E. A., Cordes H. P., Kunz B., Wiese M.: *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 205 (1992).
29. Shinitzky M., v knize: *Membrane Fluidity* (Kates M., Manson L. A., ed.), str. 585. Plenum Publ. Corp., New York 1984.
30. Srivastava L. K., Kazmi S. M., Blume A. J., Mishra R. K.: *Biochim. Biophys. Acta* 900, 175 (1987).
31. Scanlon S. M., Williams D. C., Schloss P.: *Biochemistry* 40, 10507 (2001).
32. Cornelius F.: *Biochemistry* 40, 8842 (2001).
33. Lee A. G.: *Biochim. Biophys. Acta* 1612, 1 (2003).
34. Barenholz Y.: *Prog. Lipid Res.* 41, 1 (2002).
35. Fielding C. J., Fielding P. E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 219 (2003).
36. Dumas F., Lebrun M. C., Tocanne J.-F.: *FEBS Lett.* 458, 271 (1999).
37. Hurley J. H., Tsujishita Y., Pearson M. A.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 737 (2000).
38. Marsh D.: *Protein Sci.* 12, 2109 (2003).
39. Horrobin D. F.: *Schizophr. Res.* 30, 193 (1998).
40. Hibbeln J. R., Salem N. Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1 (1995).
41. Sheskin T., Hanuš L., Slager J., Vogel Z., Mechoulam R.: *J. Med. Chem.* 40, 659 (1997).
42. Reggio P. H., Traore H.: *Chem. Phys. Lipids* 108, 15 (2000).
43. Rabinovich A. L., Ripatti P. O.: *Biochim. Biophys. Acta* 1085, 53 (1991).
44. Barnett-Norris J., Guarnieri F., Hurst D. P., Reggio P. H.: *J. Med. Chem.* 41, 4861 (1998).
45. Berglund B. A., Boring D. L., Wilken G. H., Makriyannis A., Howlett A. C., Lin S.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 59, 111 (1998).
46. Thomas B. F., Adams I. B., Mascarella S. W., Martin B. R., Razdan R. K.: *J. Med. Chem.* 39, 471 (1996).
47. Tong W., Collantes E. R., Welsh W. J., Berglund B. A., Howlett A. C.: *J. Med. Chem.* 41, 4207 (1998).
48. Iversen L. L., v knize: *The Science of Marijuana*, str. 42. Oxford Univ. Press, New York 2000.
49. Russo E. B.: *Neuro Endocrinol. Lett.* 25, 31 (2004).
50. Mechoulam R., Hanu L.: *Pain Res. Manag.* 6, 67 (2001).
51. Grotenhermen F., v knize: *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Grotenhermen F., Russo E., ed.), kap. 11. The Haworth Integrative Healing Press, New York 2002.

Z. Fišar (*1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Endocannabinoids**

The mechanisms of action, biosynthesis, inactivation and structure – activity relationships of endocannabinoids are reviewed. The discovery of endogenous cannabinoid system was an important step in understanding the psychotropic action of cannabis. The activation of cannabinoid receptor CB₁ is responsible for psychotropic effects of cannabinoids; however, some effects of these drugs may be also mediated by nonreceptor mechanisms, e.g., due to changes in the lipid part of biological membranes. The role

of the lipid bilayer in the cannabinoid system activity is indicated by the fact that membrane lipids are the source and pantry of endocannabinoids and main endocannabinoids are derived from arachidonic acid, which is an important part of membrane lipids. The structure – activity

relationship of cannabinoids (plant, endogenous, synthetic) and other substances affecting the cannabinoid system is intensively studied. The purpose of the studies is the discovery of drugs with therapeutic actions similar to cannabis, but without its psychoactivity.

**Česká společnost chemická
a
Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha**

pořádají

**konferenci „Polysacharidy II: Struktura a biologické účinky polysacharidů
a jejich derivátů“**

10.11.2006, 8,30 až 16,00 h na Novotného lávce 5, Praha 1

Program

1. Zahájení: Jana Čopíková
2. Hlavní přednášky:
 - Zdenka Hromádková: Biologicky aktivne polysacharidy z léčivých bylin a iných rastlín
 - Miroslav Novák: β -Glukan, historie a současnost
 - Grigorij Kogan: Antioxidačné, antimutagénne a antigenotoxické vlastnosti polysacharidov bunkových stien kvasiniek
 - Andriy Synytsya: Využití spektroskopických metod při určování struktury polysacharidů
3. Po hlavních přednáškách budou následovat krátká sdělení a posterová sekce.

Konferenční poplatek 500 Kč pro členy ČSCH a 600 Kč pro nečleny zahrnuje CD s plnými texty přednášek, občerstvení a organizační náklady. Abstrakta budou publikována v Chemických listech č. 9/2006. Je možné zajistit ubytování na kolejičkách na Jižním městě. Předpokládá se i zájem pasivních účastníků bez odborného příspěvku.

Uzávěrka přihlášek a zaslání abstraktů příspěvků je 30. června 2006.

Bližší informace na adrese <http://www.csch.cz> .

Kontaktní adresa: Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1,
tel.: 221 082 370, tel/fax: 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz, chem.spol@csvts.cz

ARSEN A JEHO PŘÍJEM ROSTLINAMI

PETR SOUDEK^a, LUCIE VÍCHOVÁ^{a,b}, ŠÁRKA VALENOVÁ^{a,b}, RADKA PODLIPNÁ^a, JANA MALÁ^c a TOMÁŠ VANĚK^a

^a Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^b Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Jilovské – Strnady 136, 156 04 Praha 5 – Zbraslav
vanek@uochb.cas.cz

Došlo 29.6.05, přepracováno 31.10.05, přijato 10.11.05.

Klíčová slova: arsen, rostliny, akumulace, hyperakumulátory, fytoremediace, fytochelatin, kořenové exudáty, mykorhiza, fosfor

Obsah

1. Úvod
2. Arsen v rostlině
3. Příjem arsenu rostlinou
4. Hyperakumulátory arsenu
 - 4.1. *Pteris vittata*
 - 4.2. *Pityrogramma calomelanos*
5. Interakce As-P
6. Kořenové exudáty
7. Mykorhiza
8. Model chování As v systému půda-rhizosféra-rostlina
9. Závěr

1. Úvod

Arsen je toxický polokov široce rozšířený v prostředí a organismech. Vyskytuje se v zemské kůře, vyvělé horniny obsahují arsen v koncentraci 1,5 mg kg⁻¹, usazeniny až 13 mg kg⁻¹ (cit.¹). Přírodně je arsen součástí sulfidických minerálů: arsenopyrit (FeAsS), löllingit (FeAs), realgar (As₄S₄) a auripigment (As₂S₃). Za přírodního pozadí v podzemních vodách se považuje koncentrace asi 5 µg l⁻¹ (cit.^{2,3}). V půdě se arsen přírodně vyskytuje v koncentraci 0,009 až 1,5 mg kg⁻¹ a teprve nad koncentrací 1,5 mg kg⁻¹ bývá půda považována za kontaminovanou arsenem².

Arsen se může do vody a půdy dostávat jak přirozenou cestou, tak antropogenní činností. Přírodní cesty zahrnují zvětrávání, biologickou aktivitu a vulkanickou aktivitu. Primární antropogenní vstup se odvíjí od spalování pevného odpadu, fosilních paliv, uvolnění z těžby a při

zpracování kovů a přímým použitím fungicidů, insekticidů a herbicidů obsahující arsen. Značné množství arsenu je obsaženo ve výluzích z elektrárenských popílků a v některých důlních vodách. Oxid arsenitý se používá také ve sklářském průmyslu. Protože arsen doprovází fosfor, je obsažen v odpadních vodách z praní prádla³.

2. Arsen v rostlině

V biologických vzorcích bylo identifikováno okolo 25 různých sloučenin arsenu, většinou v mořském ekosystému. K methylaci arseničnanu v rostlinách dochází pouze v prostředí s nedostatečným množstvím fosfátu⁴. V několika málo případech byl naměřen nízký obsah sloučenin trimethylarsenoxidu a arsenobetainu.

Toxicita a příjem arsenu je spojený s jeho oxidačním stavem a druhem sloučeniny. Proto je pouhé zjištění celkového množství arsenu ve vzorku nedostatečné pro odhad rizikovosti pro prostředí. Určení druhu sloučeniny arsenu v rostlině může poskytnout důležitou informaci, která může napomoci pochopit mechanismus akumulace, translokace, transformace a detoxifikace. Bylo zjištěno, že velké množství arsenu v mořských organismech je přítomno jako součást organických sloučenin, např. v arsenových analogiích cukrů v řásách a v arsenobetainu a arsenocholinu v rybách a korýších. Arsenobetain a arsenocholin jsou považovány za netoxické a arsenová analoga cukrů za prakticky neškodná^{5,6}. Málo je známo o druhu sloučenin arsenu v sladkovodních a suchozemských rostlinách. Na základě limitovaného množství informací se zdá, že na rozdíl od mořských organismů, ve sladkovodních a suchozemských rostlinách je arsen přítomen v anorganické formě⁷⁻⁹.

Bylo zjištěno, že v rostlině *Pteris vittata* jsou v naprosté převaze přítomny anorganické formy arsenu⁶. Toto zjištění však nepopírá možnost přítomnosti nějakých komplexů arsen-biomolekula, které by se při extrakci rozložily. Komplexace je pro udržení tak vysoké koncentrace kontaminantu nutná. Např. v některých rostlinách byly indikovány při pěstování v prostředí arsenu fytochelatin, což jsou peptidy s obecnou strukturou (γ-GluCys)_n-Gly, kde n = 2–11 (cit.¹⁰⁻¹⁴). Fytochelatin jsou syntetizovány z glutathionu za přítomnosti enzymu fytochelatinsynthasy. Detoxifikace arsenu indukovanými fytochelatin byla potvrzena různými technikami¹², avšak mnoho experimentálních týmů ztroskotalo na pokusu dokázat tvorbu komplexu arsen-fytochelatin, takže role fytochelatinů při akumulaci a detoxifikaci je stále nejasná¹¹. Stejně tak je nejasná role organických kyselin a aminokyselin⁶.

Důkaz funkce fytochelatinů při detoxifikaci arsenu byl proveden modifikací rostliny *A. thaliana*. Mutant *cad1-3* neprodukoval fytochelatin a byl citlivější k arse-

ničnanu než původní rostlina. Dále byla demonstrována přímá souvislost fytochelatinů s rezistencí *H. lanatus* k arseničnanu, protože rezistentní fenotyp produkoval větší množství fytochelatinů a jeho rezistence se ztratila v přítomnosti inhibitoru glutamylcysteinsynthasy, enzymu syntézy glutathionu. Přímá identifikace komplexu je problematická. Pokud jsou fytochelatin extrahovány médiem při $\text{pH} > 7$, mohou komplex disociovat na volný fytochelatin a arseničnan (redukci fytochelatinů a oxidaci arsenitanu). Pokud je tedy v extraktu z rostliny detegován arseničnan, může pocházet z komplexu arsenitan-fytochelatin¹⁵.

V *Pteris vittata* bylo v listech zjištěno nejvíce trojmocného arsenu. Rostlina přijímá arsen primárně v pětimocné formě a rostliny následně konvergují pětimocný arsen na arsen trojmocný. Suchozemské rostliny obecně nemají systém schopný methylace arsenu jako třeba řasy, což může být důvod, proč se arsen v suchozemských rostlinách vyskytuje převážně v anorganické formě. Zdá se, že redukce arsenu je v rostlině součástí detoxifikačního procesu, přestože se trojmocný arsen ukazuje jako toxicitější⁶.

3. Příjem arsenu rostlinou

Neexistuje důkaz, že by arsen byl pro rostliny esenciálním prvkem, přestože v nízkých koncentracích stimuluje růst rostliny. Z hydroponických experimentů, ve kterých byl testován příjem arsenu rostlinou, je známo, že chemická forma je důležitější než celkové množství arsenu v roztoku. Z hydroponických experimentů na dvou kultivarech rýže bylo zjištěno, že přístupnost arsenu pro rostlinu záležela na jeho formě v pořadí $\text{DMA}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{V}} < \text{MMA}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{III}}$ (cit. 16). Jiní autoři získali pořadí $\text{DMA}^{\text{V}} < \text{MMA}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{V}} < \text{As}^{\text{III}}$ při experimentu na dvou typických mokřadních druzích (*Spartina alterniflora* a *Holcus lanatus*)¹⁷. Oba experimenty se shodují v tom, že anorganické formy a MMA^{V} (monomethylarsonová kyselina) byly nejvíce akumulovány v kořenech. Naopak DMA^{V} (dimethylarsonová kyselina) byla transportována do nadzemní části, což vedlo k poměru koncentrací As v nadzemní/kořenové části rostliny větší než jedna. V experimentu v kultivačních nádobách s ředkvičkou pěstovanou v půdě s As^{III} , As^{V} a DMA^{V} došlo k oxidaci As^{III} na As^{V} . Vodný výluh ukázal, že DMA^{V} byla mnohem méně adsorbovaná než As^{V} (cit. 18). V půdě jsou obvykle přítomny vedle anorganických forem, pouze mono- nebo dimethylované kyslíkaté sloučeniny arsenu. Půda v rýžových polích obsahuje většinou vyšší zastoupení extrahovatelných mono/di methylovaných kyslíkatých sloučenin arsenu. Nabízí se vysvětlení, že methylované sloučeniny arsenu vznikají v redukčních podmínkách⁶.

Tolerance k arsenu záleží na druhu rostliny a může vyplývat ze dvou strategií: nepřijetí arsenu (excluder) nebo akumulace arsenu (akumulátor). Strategie nepřijetí arsenu zahrnuje zabránění příjmu arsenu nebo omezení transportu arsenu do nadzemních částí rostliny. Tuto strategii uplatňuje např. *Typha latifolia* hojně rostoucí na půdě kontaminované arsenem. Akumulační strategie předpokládá silnou

akumulaci arsenu v rostlině. Toto je strategie několika suchozemských rostlin rostoucích na haldách po těžbě nerostů, které obsahující hodně arsenu, např. *Agrostis tenuis*. Přestože je rostlina schopna akumulovat velké množství arsenu, na to aby mohla být označena za hyperakumulátor, je nutné splnit ještě druhou podmínku. Biokoncentrační faktor musí být větší než 1, tedy koncentrace kovu v rostlině musí být větší než koncentrace kovu v půdě¹⁹.

Rostliny akumulující arsen ho mohou uložit v kořenech nebo ho přemístit do nadzemní části⁶. Zdá se, že dvouděložné rostliny přemísťují do nadzemní části více arsenu než jednoděložné rostliny⁴. Rozdílnost v místě uložení arsenu naznačuje rozdílné mechanismy uchování i transportu arsenu v rostlinách. Arsen akumulující se v buňkách kořenů tak, jak to můžeme např. pozorovat v kořenovém systému rajčat^{20,21}, může být součástí strategie nepřijetí arsenu. Pokud je velká koncentrace arsenu v nadzemní části, ale ne v kořenech, může být právě transport kořeny-nadzemní část důležitý pro toleranci, tak je tomu např. u *Pteris vittata*⁶. U této rostliny byla nalezena ve starších listech větší koncentrace arsenu než v mladších, což lze vysvětlit tak, že xylém, kterým je arsen transportován, vede právě přes starší listy po celou dobu vegetace. Transport arsenu z kořenů do stárnoucích listů byl považován za detoxifikační proces, protože rostlina se může arsenu zbavit opadem listů. To, že bylo u volně rostoucí *Pteris vittata* nalezeno více arsenu v živých listech než v mrtvých, se připisuje vymytí arsenu z mrtvých listů vodou nebo přenosu arsenu společně s živinami před opadnutím listů do živých listů.

Prvními objevenými hyperakumulátory arsenu jsou *P. vittata* a *P. calomelanos*. Obě kapradiny produkují velká množství biomasy, takže jsou vhodnými kandidáty pro účely fytoextrakce. Produkce biomasy *P. vittata* se dokonce po aplikaci As zvýšila. Koeficient biologické absorpce je definovaný jako poměr koncentrace prvku v nadzemní části rostliny a koncentrace prvku v půdě. Faktor akumulace je definovaný jako poměr koncentrace prvku v nadzemní části rostliny a koncentrace prvku v kořenech. Tolerantní rostliny mají tendenci omezit přenos půdarostlina a kořen-nadzemní část, hyperakumulátory aktivně arsen přijímají a transportují do nadzemních částí. Pro extrakci nejsou vhodné rostliny s akumulacním faktorem a částečně i koeficientem biologické absorpce menším jedné. Podle konceptu „akumulátor-excluder“²² by se rostliny tolerantní k arsenu měly při akumulacním faktoru $\ll 1$ řadit k excluderům i přes zvýšenou koncentraci kontaminantu v nadzemní části.

Hyperakumulace arsenu bude zřejmě vlastností nezávislou na vnějších podmínkách, než získanou přizpůsobením se prostředí, protože i populace z nekontaminovaných míst jsou schopny hyperakumulovat arsen. O procesech indukovaných kořeny v rhizosféře se předpokládá, že usnadňují příjem arsenu hyperakumulátorem.

Odlíšené genotypy rostlin, rezistentní vůči arsenu, pokud se týká příjmu a metabolismu, umožňují nalézt zemědělské kultivary vhodnější pro půdy kontaminované

arsenem. Především jde o kultivary akumulující méně arsenu nebo neukládající arsen do semen či plodů¹⁵. Rezistence k arsenu je pod kontrolou jediného genu²³. Je to ojedinělý jev v rezistenci ke kovům mezi rostlinami. Minimálně *H. lanatus* vykazuje polymorfismus – v jedné populaci jsou přítomny rostliny rezistentní i nerezistentní v takové frekvenci, že tento jev nelze vysvětlit pouze mutací – ve všech dosud zkoumaných populacích z nekontaminovaných míst²⁴. Polymorfismus lze vysvětlit tak, že cena rezistence je nízká, nebo že nerezistence působí jako výhoda. Rostliny rezistentní k arsenu se od nerezistentních fenotypově liší v reprodukčním chování. Rezistentní rostliny kvetou dříve a investují více do reprodukční biomasy. Mají také větší obsah fosforu v nadzemní části rostliny, přestože jejich příjem fosfátu je potlačen. Předpokládá se, že potlačený příjem je odezvou na vysoký obsah fosforu v nadzemní části. Nabízí se tedy vysvětlení, že *H. lanatus* se vyskytuje jak na půdách, které jsou bohaté na fosfor, tak na půdách na fosfor chudých, protože tyto dva fenotypy dohromady umožňují rostlině kolonizovat mnohem širší spektrum nik⁶.

Studie toxicity arsenu ukázaly, že rostliny nerezistentní k arsenu trpí po vystavení arsenu stresem. Symptomem byl snížený růst kořenů vedoucí až k úhynu rostliny^{25–28}. Existuje důkaz, že působení anorganického arsenu vede k produkci ROS (reactive oxygen species)²⁹. To se děje pravděpodobně konverzí As^V na As^{III} , procesem, který snadno probíhá v rostlinách a vede k syntéze enzymatických antioxidantů, jako je peroxid dismutasa, katalasa a glutathion-*S*-transferasa a neenzymatických antioxidantů, např. glutathion a askorbát. Spolu s rolí glutathionu jako antioxidantu je glutathion také prekurzorem fytochelatinů. Syntéza fytochelatinů tak může způsobit vyčerpání zásob glutathionu a zredukovat tak množství antioxidantu pro zhašení ROS.

4. Hyperakumulátory arsenu

Tento termín poprvé použil Brooks³⁰ pro rostliny, které akumulují více než 1000 mg kovu na kilogram sušiny. Existují další definice hyperakumulátoru³¹. Bylo popsáno několik hyperakumulujících rostlin pro arsen, které byly nalezeny na těžebních haldách ve Velké Británii, odpadech z hutí v severovýchodním Portugalsku, vedle dolu na měď v severním Peru, na místě kontaminovaném směsí solí As, Cu a Cr na Floridě a v jižním Thajsku na odpadech po těžbě cínu³².

Některé rostliny z rodu *Agrostis* jsou schopny akumulovat a tolerovat velké koncentrace As: až 6640 mg kg⁻¹ ve starých listech *A. canina* a *A. tenuis*, 1350 mg kg⁻¹ v *Agrostis stolonifera*, 1900 mg kg⁻¹ v *Agrostis castellana* a 1800 mg kg⁻¹ v *Agrostis delicatula*³⁴. *Pseudosuga taxifolia*, *Pityrogramma calomelanos* a *Pteris vittata* jsou schopny na mineralizované nebo kontaminované půdě akumulovat As v koncentracích dosahujících 8200, 8350 resp. 7526 mg kg⁻¹ sušiny⁶. *Jasione montana*, *Calluna vulgaris* a *Paspalum ra-*

ceosum akumulovaly ze silně kontaminované půdy 6640, 4130 resp. 5280 mg As na 1 kg sušiny^{33,34}.

Ještě lepších výsledků v akumulaci arsenu dosahují řasy *Ceratophyllum demersum*, *Lagarosiphon major* a *Egeria densa*. Tyto druhy se vyskytují v říčních vodách, kde koncentrace arsenu dosahuje 0,03–0,08 mg kg⁻¹ jako důsledek geotermální aktivity. Jsou schopny akumulovat 500–1500 mg As na 1 kg sušiny, což představuje bioakumulační faktor 10 000 a více^{35–37}. Taktéž mořské řasy obvykle obsahují 10 000krát větší koncentraci arsenu než jaká je v jejich prostředí³⁸.

4.1. *Pteris vittata*

Kapradina *Pteris vittata*, hyperakumulátor arsenu, byla objevena v centrální části Floridy. Tato kapradina je mezofytická a je pěstována a zdomácněla na mnoha místech s mírným podnebím (ve Spojených Státech roste v jižní a jihovýchodní Kalifornii). Je přizpůsobivá a mrazuvzdorná a preferuje slunečné a zásadité prostředí. Má značný nárůst biomasy a je to vytrvalá rostlina³⁹.

Tato kapradina toleruje koncentraci arsenu v půdě až do 1500 mg kg⁻¹, což představuje biokoncentrační faktor 193. Koncentrace arsenu v rostlině může dosáhnout až 2,3 % suché váhy⁹. Na distribuci arsenu v *Pteris vittata* je zajímavé, že nejnižší obsah arsenu byl naměřen v kořenech, nejvyšší v listech kapradiny, přičemž více arsenu bylo v listech starších než mladších. Odhadem více než 95 % přijatého arsenu bylo uloženo v nadzemní části rostliny⁶. Kapradina byla schopna akumulovat As z půd obsahující různé koncentrace As, a dokonce i z půd, kde byl As přítomen v různých sloučeninách. Ačkoli jsou sloučeniny $FeAsO_4$ a $AlAsO_4$ málo rozpustné, kapradina byla schopna akumulovat v listech As z těchto sloučenin v koncentraci 3–6 krát větší než jaká byla jeho koncentrace v půdě³⁹. Nárůst biomasy kapradiny se po přidání arsenu, který rostlina aktivně akumulovala, zvýšil⁴⁰.

4.2. *Pityrogramma calomelanos*

Tato kapradina je dalším hyperakumulátorem arsenu. Roste na půdě kontaminované arsenem v distriktu Ron Phibun v jižním Thajsku. Jde o jedlou rostlinu. Na půdě kontaminované arsenem prosperuje lépe než *Pteris vittata*. Arsen akumuluje převážně v listech (až 8350 mg As na 1 kg sušiny), mezi jednotlivými kategoriemi listů (staré, mladé, beze spor) nebyl pozorován významný rozdíl, pouze v jediném vzorku odumírající list obsahoval významně méně (10×) arsenu než zdravé listy té samé rostliny⁴⁰. Na rostlině *Agrostis tenuis* byl pozorován vzrůstající obsah arsenu se stářím listů, a proto se soudilo, že by to mohl být způsob detoxifikace – odstranit arsen z rostliny přes odumírající listy. U této kapradiny tento proces nebyl prokázán. Spíše se zdá, že kapradina si aktivně uchovává arsen jeho přemísťováním z odumírajících listů. Arsen v listech byl snadno extrahovatelný vodou (86–93 %) a vyskytoval se převážně jako arsenitan (60–72 %), zbylý

arsen byl přítomen jako arseničnan. Methylarsonát a dimethylarsinát byl detegován jako stopová složka pouze ve dvou vzorcích. Vyšší obsah arseničnanu v odumírajících listech (98 %) podporuje teorii, že rostliny se brání přerušení oxidativní fosforylace tím, že arseničnan redukuje a ukládají v listech jako arsenitan. Arseničnan může být v odumírajících listech oxidován na termodynamicky stájejší arseničnan kvůli ztrátě enzymové aktivity⁴⁰.

Jedním z požadavků na rostlinu vhodnou k remediaci je velký nárůst biomasy a schopnost akumulovat kontaminant. Z tohoto pohledu je tato kapradina pro remediaci velmi vhodná. Při předpokládané hustotě půdy okolo 2 g cm^{-3} , obsahu As 500 mg kg^{-1} , akumulaci As 5000 mg kg^{-1} sušiny, kořenovém systému hlubokém 25 cm, hmotnosti suchých listů rostliny okolo 25 g a 16 rostlinách na m^2 se odhad remediačního potenciálu pohybuje okolo 2 % odstraněného arsenu z půdy ročně⁴⁰.

5. Interakce As-P

Podobně jako karboxylové kyseliny uvolňované kořeny rostlin mohou i jiné organické a anorganické aniony soutěžit s arsenem o sorpční místa. Fosfátový iont má výsadní postavení v interakci anion-As vzhledem k podobnosti s arsenem. Dokonce se předpokládá, že As^{V} je přijímán přes fosfátový systém a může následně interagovat s fosfátovou výživou. I přes mnoho studií týkajících se interakcí As-P nebyly výsledky dosud systematicky vyhodnoceny a zatím nebyly aplikovány na rhizosféru. Obecně je nutno rozlišit hydroponické experimenty, experimenty v kultivačních nádobách a polní experimenty. Hydroponické experimenty nadhodnocují význam kinetiky příjmu a takové procesy ve vztahu rostlina-půda, jako je tok vody do rostliny, tok živin/polutantů ke kořenům, difuze, adsorpce/desorpce a výměna iontů nejsou vůbec uvažovány. Přídavek fosforu do roztoku snižuje příjem arsenu a následně tedy zmírňuje projevy fytoxicity.

Experimenty s hydroponickými kulturami prokázaly, že tolerantní populace *Agrostis capillaris* a *H. lanatus* přijímá méně arsenu než netolerantní populace. Bylo potvrzeno, že příjem As^{V} v hydroponickém roztoku tolerantní populací *H. lanatus* byl umožněn potlačením vysoce afinitního systému příjmu fosforu. To následně vedlo k nižšímu příjmu a akumulaci arsenu v tolerantních populacích. Podobný mechanismus tolerance k As^{V} byl pozorován pro arsen-tolerantní populaci *Deschampsia cespitosa* a v menším rozsahu u *A. capillaris*. Poslední experimenty ukazují, že tolerance *H. lanatus* k As^{V} vyžaduje jak potlačení vysoce afinitního systému příjmu fosfátu, tak produkci fytochelatinů¹⁵.

Výsledky z hydroponických experimentů ukazují, že populace, které mají potlačen vysoce afinitní systém příjmu fosforu/arsenu, jsou méně úspěšné v příjmu fosforu a tím i v produkci biomasy. Byl porovnáván příjem fosforu u tolerantních a netolerantních populací *H. lanatus* v hydroponickém roztoku a v kultivačních nádobách se

sterilním kompostem. Při nízkých koncentracích fosforu ($0,5$ a $5 \text{ }\mu\text{M}$) tolerantní klony obsahovaly méně fosforu a produkovaly méně biomasy nadzemní části rostliny, zato více biomasy kořenů. Tyto rozdíly nebyly nalezeny při vysoké koncentraci fosforu v roztoku ($50 \text{ }\mu\text{M}$). Tolerantní rostliny v kultivačních nádobách měly menší nárůst, zato obsahovaly vyšší koncentraci fosforu. Jak bylo diskutováno autory tohoto experimentu, v hydroponickém uspořádání bývá důležitost kinetiky příjmu přeceňována. Hlavním limitujícím faktorem se zdá být spíše příjem fosforu než jeho difuze, morfologie kořenů či parametry půdy¹⁵. Při experimentu provedeném s rostlinou *Silene vulgaris* bylo potvrzeno, že arsen je pro rostlinu toxicitější při nižší koncentraci fosfátu v prostředí⁴.

Shrnutí laboratorních, polních experimentů a experimentů v kultivačních nádobách vede k různým závěrům. V laboratorních podmínkách přidání fosforu zvyšuje uvolňování As, zvyšuje extrahovatelnost As a redukuje sorpci As^{V} a As^{III} v půdě⁵⁰. Příjem As se zvýšil po aplikaci fosforu v experimentech prováděných v kultivačních nádobách ve skleníku a nebo v polních podmínkách. Na rozdíl od rostlin kultivovaných v hydroponických roztocích, u rostlin rostoucích v půdním substrátu přítomnost fosforu způsobuje soupeření As-P o sorpční místa vedoucí k větší přístupnosti As a tím i větší koncentraci As v rostlinách. Studie vztahu As-P v rhizosféře ukázala, že přítomnost fosforu zvýšila koncentraci As v nadzemní části a kořenech u tolerantních i netolerantních klonů *Holcus lanatus*^{26,41–43}. Akumulace As v kukuřici byla srovnávána u rostlin pěstovaných na uměle kontaminovaných půdách (20 a 80 mg kg^{-1}). Větší obsah arsenu byl nalezen v rostlinách pěstovaných na písčitéch půdách než na spraších. Zvýšení hladiny fosforu mělo malý efekt na příjem As rostlinami na spraších, zatímco zvýšilo příjem rostlin na písčité půdě, která obsahovala arsen v koncentraci 80 mg kg^{-1} (cit.¹⁵).

U hyperakumulátorů je velmi nepravděpodobné, že by přidání fosforu mohlo mít vliv na projevy fytoxicity. *P. vittata* je schopna akumulovat až $22\,630 \text{ mg As}$ na 1 kg sušiny z půdy kontaminované 1500 mg As na 1 kg (cit.³⁹). Přidání fosforu může za prvé výrazně podpořit růst rostliny (neboť fosfor je významný makronutrient) a za druhé mobilizovat vyměnitelný As, což může vést ke zvýšení jeho příjmu rostlinou.

Většina studií na interakce As-P byla provedena na uměle kontaminovaných půdách. Předpokládá se, že významně odlišná bude koncentrace nestabilního As a P v půdách, které postupně přijímaly As během dlouhé doby skrze antropogenní procesy. Bylo dokázáno, že As se rychle v půdě mění na nepřístupný, což vede ke snížení toxicitě¹⁵.

Velká část z celkového fosforu může být v půdě přítomna jako fytáty, stejně tak až 70 % rozpuštěného P v půdním roztoku je přítomno v organické formě. Očekává se, že kyselina fytová soupeří, vzhledem k její anionické formě, s arsenem o sorpční místa. Interakce mezi As a organickým P dosud studovány nebyly¹⁵.

6. Kořenové exudáty

Bylo publikováno, že rostliny s nedostatkem fosforu vykazovaly zvýšenou exudaci karboxylových kyselin, např. citrónové a jablečné kyseliny. Tato změna se interpretuje jako cílené zvýšení pH, proto aby se fosfor uvolnil ze sorpčních míst, chelatace kationtů kovů, které mohou fosfor imobilizovat a vytvoření rozpustných komplexů kov-chelát s fosforem. Celkově jde o zvýšení přístupu fosforu. Svazky kořenů rostlinných druhů s nedostatkem fosforu jako třeba *Lupinus albus* a nebo rostliny čeledi *Protaceae* vyměšují především silné organické kyseliny a fenolické látky. Arsen a fosfor náleží do stejné chemické skupiny a mají srovnatelné disociační konstanty svých kyselin a rozpustnost jejich solí, což vede k podobnému geochemickému chování arsenu a fosforu v půdě. Z toho lze předpokládat, že vyměšování karboxylových kyselin může hrát roli také v mobilizaci arsenu v rhizosféře a tím i zvyšování jeho příjmu rostlinou¹⁵.

Vyměšování látek může probíhat také za účelem získání jiných prvků: Lze rozlišit dvě základní strategie pro získání železa vyššími rostlinami.

Strategii č. I používají jednoděložné rostliny s výjimkou čeledi *Graminaceae* (trávy) a dvouděložné rostliny. Zahnuje tři procesy: *i*) Zvýšené uvolňování vodíkových iontů, *ii*) produkci plasmatické membránově vázané reduktasy v přítomnosti substrátu a *iii*) zvýšené uvolňování redukčních a chelatačních látek.

Strategie č. II využívaná travami je charakteristická uvolněním phytosiderophorů a vysoce afinitivním systémem pro příjem železa. Oxidy/hydroxidy železa dominují v sorpci arsenu v půdě. Laboratorní studie adsorpce As^{III} a As^V na povrchu oxidů železa indikují, že obě formy jsou vázané jako jednovazné nebo dvouvalné ligandy povrchových komplexů. Vyloučení protonů a/nebo vyloučení redukčních a chelatačních činidel strategií č. I mohou rostliny také způsobit uvolnění arsenu z oxidů/hydroxidů železa, a tím zpřístupnit arsen pro rostlinu¹⁵.

V podstatě nic není známo o nutričních aspektech železa a příbuzných aspektech procesů rhizosféry kapradin. Nevyužívají ani jedné z výše popsaných strategií, přestože kapradiny jako hyperakumulátor arsenu *P. vittata* a *P. calomelanos* železo jistě získávají. Je známo, že výměšky kořenů (kyselina šťavelová a citrónová) kalcifilních rostlin efektivně uvolňují fosfor a železo z vápence^{44,45}. Také byla zjištěna významná korelace mezi arsenem a železem v mnoha k arsenu tolerantních rostlinách na různých místech těžby ve Velké Británii. Nebyla nalezena žádná korelace mezi arsenem a jinými prvky (Pb, Cu, Zn), ani pro fosfor³⁴.

Celkově lze říci, že příjem fosforu, železa a arsenu u hyperakumulátorů arsenu může být na sobě závislý. Reduktivní rozpuštění minerálů Fe^{III} vede nevyhnutelně k uvolnění vazby železa a arsenu, stejně tak exudáty kořenů zvyšující mobilizaci fosforu mají také tendenci desorbovat arsen. Vedle rhizosférických procesů má hyperakumulátor arsenu většinou zvláštní mechanismus příjmu arsenu. Potlačení vysoce afinitivního systému fosfátového příjmu přispívá k adaptivní toleranci rostlin k arsenu.

7. Mykorrhiza

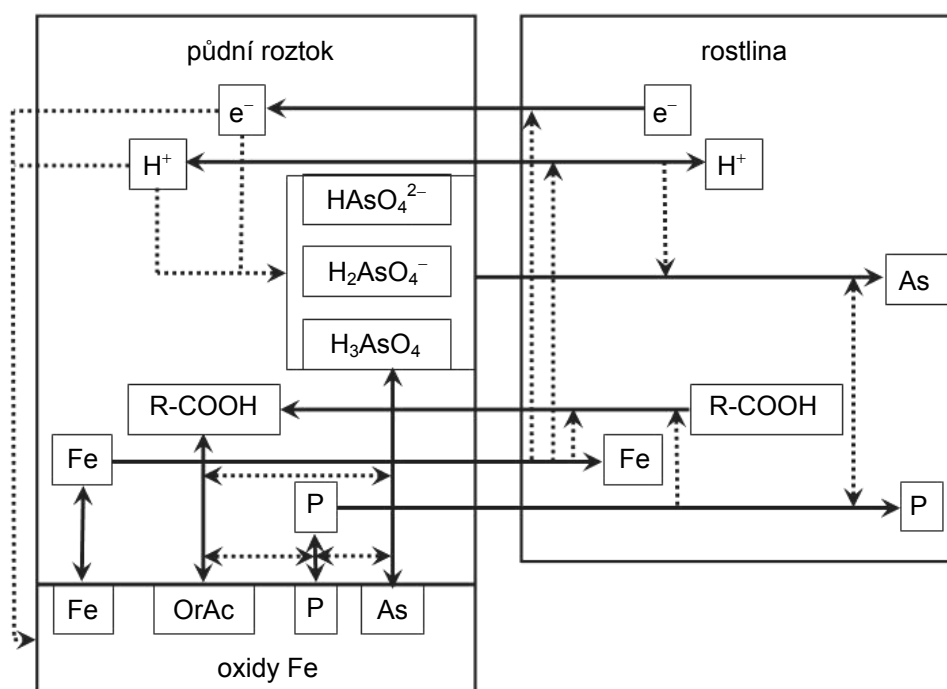
Mykorrhiza je nejrozšířenějším mutualistickým symbiotickým spojením mezi mikroorganismy a vyššími rostlinami a může mít velký význam pro minerální výživu hostitelské rostliny. Vedle těchto dobře známých prospěšných efektů na výživu rostlin může mít mykorrhizální spojení pro hostitelskou rostlinu rostoucí na kontaminované půdě ještě další funkce. Mykorrhizální houby mohou zmírnit toxicitu kovu, protože představují bariéru pro příjem kovu. V nedávné době byla srovnána krátkodobá kinetika příjmu mykorrhizální houby *Hymenoscyphus ericae* z dolu kontaminovaného As/Cu (As-rezistentní populace) a z nekontaminovaného vřesoviště (As nerezistentní populace) při kultivaci v roztoku. Kinetika příjmu As^V a As^{III} a fosfátu se nelišila pro rezistentní a nerezistentní populace. Příjem arsenu houbou je pasivní¹⁵. Houby z dolu vylučovaly o 90 % více As ve formě As^{III} . Dvacetičtyř hodinový příjem As^V hydroponicky pěstovaného mykorrhizního a nemykorrhizního hostitele *C. vulgaris* se nelišil od důlních rostlin. Na druhou stranu, naočkovaný vřesovištní *C. vulgaris* akumuloval o 100 % více As než nenačkovaný jedinec. Autoři předpokládají, že důlní houby hrají roli filtru arsenu a udržují tak nízkou koncentraci arsenu v rostlině. Mykorrhizní houby tak mohou být důležité pro revegetaci/fytostabilizaci půdy znečištěné arsenem.

Většina kapradin vykazuje mykorrhizu. Role mykorrhizy u hyperakumulátorů arsenu dosud není známa. Většina dobře prostudovaných hyperakumulátorů různých kovů patří k čeledi *Brassicaceae*, které obecně netvoří mykorrhizní spojení. Ze současných informací můžeme shrnout, že ve většině případů mykorrhizní houby mají tendenci omezit přenos polutantu k rostlině a zároveň zlepšovat rostlinnou výživu. Další výzkum by se měl zaměřit na mykorrhizální hyperakumulátory.

8. Model chování As v systému půda-rhizosféra-rostlina

Podle dostupné literatury a teoretických úvah byl navržen konceptuální model chování arsenu v systému půda-rhizosféra-rostlina zahrnující příjem arsenu, chemickou speciaci v půdním roztoku a interakci s půdní pevnou fází a rostlinnou výživu železem a fosforem (obr. 1). Individuální procesy znázorněné v modelu jako proudy/transformace (plná čára) a vlivy/interakce (tečkovaná čára) jsou dobře známé, ale dosud nebyly pro popis arsenu v systému půda-rhizosféra-rostlina aplikovány. Tento model zdrazňuje klíčové procesy a jejich interakce a může být nápomocen v dalším studiu chování arsenu v rhizosféře suchozemských rostlin.

Arsen je v půdě asociován s oxidy-hydroxidy železa. Hodnota pH v rhizosféře se může lišit od pH v okolní půdě až o dvě jednotky. Za aerobních podmínek je arsen přítomen v půdním roztoku jako As^V a desorbuje se ze sorpčních míst za zvýšení pH. Uvolnění arsenu a fosforu do

Obr. 1. Model chování As v systému půda-rhizosféra-rostlina¹⁵

půdního roztoku může nastat rozpuštěním oxidů-hydroxidů železa jak při zmenšení redukčního potenciálu indukovaného rostlinou, tak při drastickém poklesu pH v rhizosféře. Redukce As^{V} na As^{III} vede k jeho zvýšené přístupnosti pro organismy a k toxicitě pro rostliny. Příjem železa a arsenu mohou interagovat, protože mobilizační procesy indukované kořeny, mající za účel zvýšit rozpustnost železa z jeho oxidů/hydroxidů, nevyhnutelně vedou k uvolnění železem vázaného arsenu. Byly popsány dva odlišné typy reakce kořenů, jmenovitě strategie I a II, jako mechanismus pro získání železa. Především uvolnění redukčních a chelatačních sloučenin, mechanismů strategie I, zvyšuje přístupnost arsenu pro organismy v rhizosféře.

Karboxylové kyseliny uvolněné rostlinami s nedostatkem fosforu se podílí na mobilizaci anorganického fosforu v rhizosféře. Takové procesy také ovlivňují přístupnost arsenu pro rostliny vzhledem k známé podobnosti arseničnanu a fosforečnanu^{46–49}.

9. Závěr

Arsen se v životním prostředí vyskytuje v ovzduší, půdě i ve vodách. Sloučeniny arsenu jsou silně toxické s vysokou kumulativní schopností v organismech. Rostliny jsou často prvním z článků řetězce vedoucího až k člověku, a proto je nutno znát jak způsob, jakým se arsen dostává do rostlinných pletiv, znát možnosti ovlivnění jeho

vstupu a také i možnosti případného využití tohoto jevu pro metody fytoremediací, které by mohly pomoci problém arsenu řešit levně a efektivně.

Tato práce byla podporována projektem GA ČR 526/04/0135 a projektem COST 859.10.

LITERATURA

1. Kafka Z., Punčochářová J.: Chem. Listy 96, 611 (2002).
2. Baroni F., Boscagli A., Di Lella L. A., Protano G., Ricobono F.: J. Geochem. Explor. 81, 1 (2004).
3. Pitter P.: *Hydrochemie*. VŠCHT, Praha 1999.
4. Sneller F. E. C., Van Heerwaarden L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., Ten Bookum W. M., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C.: New Phytol. 144, 223 (1999).
5. Ebdon L., Fitzpatrick S., Foulkes M.E.: Chem. Analytic 47, 179 (2002).
6. Zhang W., Cai Y., Tu C., Ma L. Q.: Sci. Total Environ. 300, 167 (2002).
7. Helgesen H., Larsen E. H.: Analyst 13, 791 (1998).
8. Koch I., Feldmann J., Wang L., Andrewes P., Reimer K. J., Cullen W. R.: Can. Sci. Total Environ. 236, 101 (1999).
9. Koch I., Wang L., Ollson C., Cullen W. R., Reimer K. J.: Can. Environ. Sci. Technol. 34, 22 (2000).

10. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *84*, 439 (1987).
11. Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T.: Plant Physiol. *110*, 1145 (1996).
12. Schmoger M. E. V., Oven M., Grill E.: Plant Physiol. *122*, 793 (2000).
13. Sneller F. E. C., Van Heerwaarden L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C.: J. Agric. Food Chem. *48*, 4014 (2000).
14. Sneller F. E. C., Van Heerwaarden L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., Ten Bookum W. M., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C.: New Phytol. *144*, 223 (1999).
15. Fitz W. J., Wenzel W. W.: J. Biotechnol. *99*, 259 (2002).
16. Marin A. R., Masschenlyn P. H., Patrick W. H. Jr: Plant Soil *139*, 175 (1992).
17. Carbonell A. K., Aarabi M. A., DeLaune R. D., Gambrell R. P., Patrick W. H.: J. Environ. Sci. Health, Part A *33*, 45 (1998).
18. Tlustoš P., Goessler W., Száková J., Balík J.: Appl. Organometal. Chem. *16*, 216 (2002).
19. Brooks R. R.: *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. University Press, Cambridge 1998.
20. Carbonell-Barrachina A. A., Burlo F., Burgos-Hernandez A., Lopez E., Mataix J.: Sci. Hortic. *71*, 167 (1997).
21. Dahmani-Muller H., van Oort F., Gelie B., Balabane M.: Environ. Pollut. *109*, 231 (2000).
22. Baker A. J. M.: J. Plant Nutr. *3*, 643 (1981).
23. Meharg A. A., Cumbes Q. J., Macnair M. R.: Heredity *69*, 325 (1992).
24. Meharg A. A., Cumbes Q. J., Macnair M. R.: Evolution *47*, 313 (1993).
25. Barrachina A. C., Carbonell F. B., Beneyto J. M.: J. Plant Nutr. *18*, 1237 (1995).
26. Macnair M. R., Cumbes Q.: New Phytol. *107*, 387 (1987).
27. Meharg A. A., Macnair M. R.: New Phytol. *119*, 291 (1991).
28. Paliouris G., Hutchinson T. C.: New Phytol. *117*, 449 (1991).
29. Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Meharg A. A.: Plant, Cell Environ. *24*, 713 (2001).
30. Brooks R. R., Lee J., Reeves R. D., Jaffré T.: J. Geochem. Explor. *7*, 49 (1977).
31. Jaffré T.: *Étude Écologique du Peuplement Végétal des Sols Dérivés de Roches Ultrabasiqes en Nouvelle Calédonie*. ORSTOM, Paris 1980.
32. Visoottiviseth P., Francesconi K., Sridokchan W.: Environ. Pollut. *118*, 453 (2002).
33. Bech J., Poschenrieder C., Llugany M., Barcelo J., Tume P., Toloias F. J.: Sci. Total Environ. *203*, 83 (1997).
34. Porter E. K., Peterson P. J.: Sci. Total Environ. *4*, 365 (1975).
35. Aggett J., Aspell A. C.: N. Z. J. Sci. *23*, 77 (1980).
36. Lancaster R. J., Coup M. R., Hughes J. W.: N. Z. Vet. J. *19*, 141 (1971).
37. Reeves R. D., Liddle, J. R.: *Trace Elements in the Eighties. N.Z. Trace Elements Group*. Palmerson North, New Zealand 1986.
38. Francesconi K. A., Edmonds J. S.: Adv. Inorg. Chem. *44*, 147 (1997).
39. Ma L. Q., Komart M. K., Tu C., Zhang W., Cait Y., Kenneley E. D.: Nature *409*, 579 (2001).
40. Francesconi K., Visoottiviseth P., Sridokchan W., Goessler W.: Sci. Total Environ. *284*, 27 (2002).
41. Meharg A. A., Macnair M. R.: New Phytol. *116*, 29 (1990).
42. Meharg A. A., Macnair M. R.: New Phytol. *117*, 225 (1991).
43. Meharg A. A., Hartley-Whitaker J.: New Phytol. *154*, 29 (2002).
44. Jones D. L.: *Encyclopedia of Ferns*. British Museum (Natural History), London 1987.
45. Ström L., Olsson T., Tyler G.: Plant Soil *167*, 239 (1994).
46. Dinkelaker B., Hengeler C., Marschner H.: Bot. Acta *108*, 183 (1995).
47. Hoffland E.: Plant Soil *140*, 279 (1992).
48. Kirk G. J. D., Santos E. E., Findenegg G. R.: Plant Soil *211*, 11 (1999).
49. Neumann G., Römheld V.: Plant Soil *211*, 121 (1999).
50. Fitz W. J., Wenzel W. W.: J. Biotechnol. *99*, 259 (2002).

P. Soudek^a, L. Vichová^{a,b}, Š. Valenová^{a,b}, R. Podlipná^a, J. Malá^c, and T. Vaněk^a (^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic ^b Institute of Chemical Technology, Prague, ^c The Forestry and Game Management Research Institute, Prague): **Arsenic and Its Uptake by Plants**

Contamination of soil with arsenic is one of the major causes of the presence of arsenic in drinking water. To understand and manage the risk posed by soil arsenic it is essential to know how arsenic is taken up by roots and metabolized in plants. Some plant species exhibit phenotypic variation in response to arsenic species, which helps to understand the toxicity of arsenic and the way in which plants have evolved arsenic resistance. A number of plants have been identified as hyperaccumulators in the phytoextraction of a variety of metals, and some have been used in field applications. This paper reviews major processes that can affect the fate of arsenic in the soil – rhizosphere – plant system.

KONŠTRUKCIE AMPÉROMETRICKÝCH BIOSENZOROV PRE RÝCHLE A JEDNODUCHÉ STANOVENIE ETANOLU

MILAN VALACH a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Fakulty chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
milan_valach@stuba.sk

Došlo 17.8.04, prepracované 6.3.05, prijaté 30.6.05.

Kľúčové slová: biosenzor, etanol, alkoholdehydrogenáza, alkoholoxidáza, ampérometrický prevodník, mediátor

Obsah

1. Úvod
2. Biologická časť
 - 2.1. Alkoholoxidáza
 - 2.2. Alkoholdehydrogenáza
 - 2.3. Mikroorganizmy
3. Elektrochemický prevod signálu
 - 3.1. Ampérometrický prevodník
 - 3.2. Mediátory
4. Sledovanie etanolu pomocou biosenzorov
5. Záver

1. Úvod

Kontinuálne, súbežné a selektívne monitorovanie obsahu etanolu v prítomnosti ostatných zložiek tvoriacich fermentačné prostredie je veľmi žiaduce najmä v priemyselnej oblasti. Zvyčajne využívané metódy založené na chromatografickom stanovení^{1,2} sú náročné nielen na čas analýz, ale aj na drahé technické vybavenie. V tejto súvislosti sa hľadajú lacnejšie alternatívy. Jednou z nich sa javí stanovenie pomocou biosenzorov.

Biosenzory ako analytické detektory predstavujú príkladné spojenie interdisciplinárnych poznatkov biológie, biochémie, fyzikálnej a analytickej chémie. Spoločnou črtou princípu práce biosenzorov je interakcia biologického komponenta so stanovovaným substrátom, ktorá je zdrojom impulzu spracovateľného prevodníkom na elektronický signál úmerný koncentrácii stanovovaného analytu³. Výhody týchto zariadení sú rýchlosť, špecifickosť a mobilita stanovenia s minimálnou resp. žiadnou predúpravou analyzovaných vzoriek. Včasným zásahom do bioprocesu na základe získaných informácií možno vo veľkovýrobnej praxi predísť značným ekonomickým stra-

tám. Zhotovenie takéhoto senzora si vyžaduje selekciu optimálneho biologického komponenta, ktorý bude adekvátne komunikovať s vhodne zvoleným prevodníkom. Dôraz sa pritom kladie na reprodukovateľnosť procesu prípravy biosenzorov.

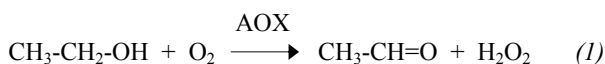
2. Biologická časť

Biologickou zložkou môže byť akýkoľvek upravovaný, alebo pôvodný materiál biologickej povahy, ktorý zahŕňa celé funkčné časti biologických štruktúr, ktoré prevádzajú svoju prirodzenú funkciu. Esenciálnou časťou senzorov je ich reakčná vrstva. Vytvorenie tejto vrstvy si vyžaduje imobilizáciu rozlišovacích elementov, teda biomolekúl nevyhnutných pre detekciu analytu⁴. Pri výbere kľúčového biologického systému vhodného pre monitorovanie etanolu pripadajú do úvahy čisté – purifikované enzýmy, z ktorých najpoužívanejšie sú alkoholoxidáza (AOX) a alkoholdehydrogenáza (ADH). Okrem čistých enzýmov boli tiež úspešne aplikované aj rôzne typy buniek, z ktorých vykazuje výborné vlastnosti hlavne *Gluconobacter oxydans*.

2.1. Alkoholoxidáza

Molekula AOX – EC 1.1.3.13 (zdroj *Pichia pastoris*) je oktamér veľkosti 675 kDa zložený z podjednotiek veľkých 80 kDa, pričom každá subjednotka obsahuje jednu molekulu kofaktora flavinadeninukleotidu (FAD). AOX katalyzuje oxidáciu primárnych alkoholov na aldehydy. Kosubstrátom je kyslík, ktorý plní funkciu akceptora elektrónov. Enzým pracuje v rozsahu pH 6,5–8,3; pričom optimum je pri pH 7,5. Optimálna teplota je v okolí 37°C (cit.²³). Porovnanie afinity AOX k rôznym alkoholom je prehľadne uvedené v tabuľke I.

Stanovenie etanolu s využitím AOX je založené na reakcii (1). Keďže H₂O₂ je inhibítorom oxidácie etanolu, treba ho z prostredia odstraňovať, aby sa nehromadil. Na detekciu enzýmovej reakcie sa používa ampérometrický prevodník (kapitola 3.1.), pomocou ktorého sa sleduje množstvo vzniknutého peroxidu. Ten sa priamo elektrochemicky oxiduje pri vysokom polarizačnom potenciáli (650 mV vs. SCE), čo značne ovplyvňuje selektivitu stanovenia vzhľadom na interferenciu s inými redoxne aktívnymi látkami. Preto sa uplatňuje prídavok mediátorov elektrónového transportu (MET, kapitola 3.2), ktorých účinok prehľadne opísal Gorton a spol.⁶



Nanjo a Guilbault v roku 1975 ako prví imobilizovali AOX na platinovú elektródu a ampérometricky sledovali

Tabuľka I
Porovnanie afinity alkoholoxidázy (zdroj *Pichia pastoris*)
k rôznym substrátom⁵

Substrát	Rýchlosť reakcie v porovnaní s metanolom ^a [%]
Etanol	82
Propan-1-ol	43
Propan-2-ol	2
Butan-1-ol	20
2-Methylpropan-1-ol	1,2

^a Rýchlosť reakcie s metanolom predstavuje 100 %

úbytok spotrebovaného kyslíka⁷. Odvtedy už vývoj pokročil natoľko, že dnes senzor na báze AOX + kyslíková elektróda je bežne komerčne dostupný a dá sa objednať cez internet za 700 USD (cit.⁸). Úspešne bola tiež otestovaná príprava bienzýmového senzora, v ktorom biologickú časť tvorí AOX + peroxidáza⁹⁻¹¹. Pri použití bienzýmového usporiadania v uhlíkovej pastovej elektróde so stabilizátorom polyetylénimínom možno polarizačný potenciál znížiť až na –50 mV vs. Ag/AgCl (cit.¹²).

Najväčšou aplikačnou nevýhodou AOX je jej nízka stabilita. Preto Gibson a spol. zvyšovali životnosť senzorov pomocou prídavku stabilizátorov laktitolu a DEAE-dextránu¹³. Liu a Wang riešili problém tepelnej stability AOX imobilizáciou enzýmov do hydrofóbných polotuhých matric¹⁴. Iný spôsob práce s citlivými enzýmami predstavuje zhotovenie mini-kolóniek s obsahom vysokého množstva enzýmu (akýsi rezervoár) a ich inkorporáciu do prietokových FIA systémov¹⁵. Kvôli zvýšeniu špecificity online sledovania komplexného fermentačného média sa v takomto usporiadaní zvykne tiež zaradiť chromatografická predseparačná kolónka¹⁶. Mitsubayashi a spol. dokonca pripravili senzor pracujúci na báze AOX-elektrody schopný merať koncentráciu etanolu v plynnej fáze, pričom skonštruovali unikátnu plyn-kvapalinovú celu s využitím princípu difúzie cez špeciálne poly(tetrafluoroetylénové) membrány¹⁷.

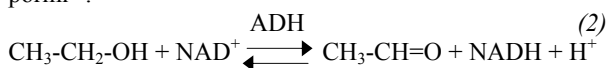
2.2. Alkoholdehydrogenáza

Dehydrogenázy predstavujú najväčšiu skupinu redoxných enzýmov. V súčasnosti je známych asi 300 druhov. Veľké množstvo týchto enzýmov predstavuje širokú výberovú paletu pre mnoho analytov monitorovateľných pomocou biosenzorov napr. alkohol^{18,19}, glukóza^{20,21}, kyselina glutámová²², atď.

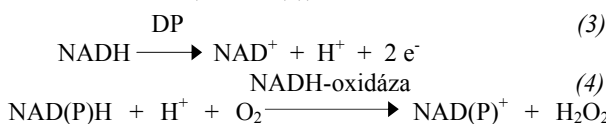
NAD-dependantná ADH – EC 1.1.1.1 (zdroj *Saccharomyces cerevisiae*) obsahuje pevne naviazané štyri atómy zinku na jednu molekulu veľkosti 141 kDa zloženú zo štyroch podjednotiek po 35 kDa. Optimálne pH pre oxidáciu etanolu je 8,6–9,0; nad pH 9,0 enzým rýchlo stráca stabilitu. Pre redukciu acetaldehydu je optimálne pH okolo 7,0. Izoelektrický bod sa nachádza pri pH 5,4. Reakcia so

sekundárnymi a rozvetvenými alkoholmi je veľmi obmedzená²³. ADH reaguje prakticky len s primárnymi alkoholmi, reakčná rýchlosť rapídne klesá s veľkosťou molekuly, pričom enzým je špecifickejší ako AOX (cit.²⁴).

Hlavný problém pri použití dehydrogenázového systému je potreba prítomnosti molekuly nebielkovinovej povahy – kofaktora nikotínamidnukleotidu (NAD) (reakcia (2)), čím sa celý senzor značne komplikuje hlavne z hľadiska jeho prípravy. Keďže koenzým možno od bielkovinovej molekuly enzýmu jednoducho oddeliť dialýzou, je potrebné zabrániť jeho vymývaniu do okolia. Tomuto javu sa predchádza prípravou koenzýmu so zvýšenou molekulovou hmotnosťou, ťažšie vyplaviteľného z pripravenej enzýmovej elektródy (NAD-dextrán). Tiež sa môže využiť umelá väzba koenzýmu na molekulu enzýmu t.j. vytvorenie „umelej prostetickej skupiny“²⁵. Otestované bolo aj použitie membrán so špecificky pripravenými pórmí²⁶.



Pri využití NAD-ADH senzorov na stanovenie etanolu treba uvažovať aj o vratnosti enzymatickej reakcie (2), keďže rovnováha je posunutá skôr v smere tvorby etanolu ako jeho spotreby²⁷. Významné posunutie rovnováhy tejto reakcie želaným smerom však docielime odčerpaním jedného z produktov. Vzhľadom na ampérometrickú detekciu prebiehajúceho procesu sa využije reoxidácia NADH na povrchu enzýmovej elektródy, ktorá sa uskutoční buď len pomocou MET (cit.²⁸) alebo tiež v kombinácii s ďalším enzýmom diaforázou – DP (cit.²⁹) (reakcia (3)); resp. NADH-oxidázou (reakcia (4)).



Diaforáza alebo tiež lipoamiddehydrogenáza (zdroj *Clostridium kluyveri*) predstavuje enzým s NADH oxidačnou aktivitou (reakcia (3)). Enzým tvorí jedna molekula veľkosti 24 kDa. Optimálne pH pre enzým je 8,5. Ako stabilizátory pôsobia NADH, nikotínamidnukleotidfosfát (NADPH), či flavinmononukleotid (FMN)²³. Redoxne aktívne centrá enzýmu sú obalené proteínovou štruktúrou, ktorá vytvára priestorovú bariéru spomaľujúcu transport elektrónov. Často sa pritom z praktických dôvodov využívajú umelé akceptory elektrónov ako kosubstráty. Diaforáza vykazuje tiež nízky stupeň substrátovej špecificity vzhľadom na akceptor elektrónov čiže možno využiť širokú paletu MET (kosubstráty). Najčastejšie používané MET v kombinácii s diaforázou sú ferrikyanid³⁰ a analógy ferocénu. Metylviologén sa v kombinácii s diaforázou používa na regeneráciu NADH pri biosyntézach, nie však pri konštrukcii biosenzorov (potrebný vysoký pracovný potenciál)³¹.

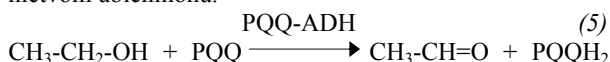
V prípade využitia NADH-oxidázy na enzymatickú reoxidáciu NADH (reakcia (4)), sa na elektróde potom deteguje vzniknuté H₂O₂.

2.3. Mikroorganizmy

Použitie mikrobiálnych buniek na prípravu biosenzorov je perspektívne nielen z cenového hľadiska, ale aj z dôvodu relatívne vyššej stability senzora (v porovnaní s využitím čistých enzýmov), keďže potrebné enzýmy sa nachádzajú v prirodzenom prostredí bunky, kde sú viac chránené proti inaktivácii. Kmeň *Gluconobacter oxydans* bol už úspešne použitý na prípravu viacerých biosenzorov^{32,33} kvôli jeho schopnosti rýchlej a neúplnej oxidácie substrátov^{34,35}, pretože jeho dehydrogenázový systém je viazaný v periplazmatickom priestore, t.j. oxidačný proces nie je limitovaný transportnými javmi cytoplazmatickej membrány.

Viacero gramnegatívnych aeróbných baktérií obsahuje periplazmatické enzýmy, ktoré katalyzujú oxidáciu alkoholov a cukrov nezávisle od prítomnosti pyridínových nukleotidov a obsahujú nekovalentne viazaný pyrolchínolín (PQQ) ako svoj redoxný kofaktor³⁶. Tieto chinoproteíny zvyčajne uskutočňujú pingpongový mechanizmus prenosu elektrónov, pri ktorom sa prenáša pár elektrónov zo substrátu na PQQ, pričom vzniká redukovaný intermediát kofaktora (rovnica (5)). Potom nasleduje reoxidácia PQQH₂ prostredníctvom poskytnutia redukčných ekvivalentov reťazovou reakciou na terminálnu oxidázu v cytoplazmatickej membráne. Tieto oxidázy sa vyskytujú buď ako voľné, alebo membránovo asociované formy. V prípade voľných foriem sa prísun elektrónov uskutočňuje prostredníctvom malých elektrónových transportujúcich proteínov ako sú cytochrómy, zatiaľ čo transport elektrónov

k membránovo viazaným formám sa uskutočňuje prostredníctvom ubichinónu.



Membránovo viazaná PQQ-dependentná ADH oxiduje etanol nevratne a zároveň nie je schopná oxidovať metanol³⁷, čo je jej veľkou výhodou v porovnaní s AOX a tiež NAD-ADH. Ďalšou výhodou použitia PQQ-dehydrogenáz z hľadiska jednoduchosti konštrukcie senzora je, že kofaktor majú priamo viazaný vo svojom katalytickom centre, t.j. je súčasťou enzýmu.

Nevýhodou mikrobiálnych senzorov je vo všeobecnosti ich nižšia selektivita, pretože použité bunky obsahujú viaceré enzýmy, ktoré poskytujú reakcie s rôznymi zložkami prítomnými v komplexných vzorkách. Z tohto dôvodu boli vyvinuté viaceré metódy zvyšujúce selektivitu týchto senzorov, ktoré sú založené na aktivácii potrebných transportných resp. metabolických mechanizmov, inhibícií nežiaducich transportov a dráh³⁸. Ďalej boli opísané aj pokusy s použitím permeabilizovaných buniek³⁹ a v neposlednom rade majú tiež patričný vplyv aj pH podmienky pri meraní. Veľmi perspektívne sa javí tiež použitie permselektívnych membrán s definovanými vlastnosťami⁴⁰. Dokonca pri použití acetátcelulózovej membrány v kombinácii s kmeňom *G. oxydans* bolo dosiahnuté potlačenie interferencie glukózy a glycerolu pri stanovení etanolu až na úroveň šumu merania^{41,42}. Sľubným sa zdá byť postup na vytvorenie biosenzora pre detekciu etanolu založeného na schopnosti metylotrofných kvasiniek rastú-

Tabuľka II

Prehľad niektorých publikovaných etanolových senzorov so základnými parametrami

Biologická zložka	Charakteristika	Citlivosť [$\mu\text{A mmol}^{-1} \text{dm}^{-3}$]	Čas odzvy [s]	Detekčný limit [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]	Lit.
AOX	detekcia H ₂ O ₂	0,89	–	0,3	55
NAD-ADH	NADH-oxidáza, ferrikyanid	2,00	20	0,3	56
NAD-ADH	poly(<i>o</i> -fenyldiamín)	1,50	20	0,02	57
NAD-ADH	NADH-oxidáza, detekcia H ₂ O ₂	–	10	0,05	58
NAD-ADH	ferrikyanid	1,30	16	2	59
NAD-ADH	NAD, Meldolova modrá	2,33	0,6	8,0	64
PQQ-ADH (zdroj <i>Gluconobacter oxydans</i>)	priamy transport elektrónov	0,48	3	–	63
PQQ-ADH (zdroj <i>Acetobacter aceti</i>)	2-metyl-5,6-dimetoxybenzochinón	7,00	40	–	62
PQQ-ADH (zdroj <i>Gluconobacter oxydans</i>)	ferrikyanid	3,40	60	–	40
<i>Gluconobacter oxydans</i>	ferrikyanid	3,5	13	0,85	41
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	O ₂ elektróda	–	300	6,0	60
<i>Gluconobacter oxydans</i> (membrána)	ferrikyanid	3,70	300	50	61
<i>Hansenula polymorpha</i>	O ₂ elektróda	0,50	50	100	39

cih na etanole vylučovať protóny do média. Týmto spôsobom boli vytvorené biosenzory s buniek *Hansenula polymorpha* a *Pichia methanolica*. Etanol a metanol bolo pritom možné stanoviť v rozmedzí koncentrácií 0,5 až 100 mmol dm⁻³ (cit.⁴³).

V tabuľke II je uvedený prehľad niektorých doteraz pripravených a publikovaných senzorov pre sledovanie etanolu spolu so základnými charakteristikami.

3. Elektrochemický prevod signálu

Po selektívnom rozoznaní analytu biologickým komponentom dochádza k prevodu vzniknutej biologicko-chemickej odpovede na elektronický signál. Na tento účel sa používajú fyzikálno-chemické prevodníky. Dôležité je pritom, aby bol biologický komponent v čo najdokonalejšom fyzickom kontakte s prevodníkom, čím sa znižuje nebezpečenstvo rozptylu prenášanej informácie.

3.1. Ampérometrický prevodník

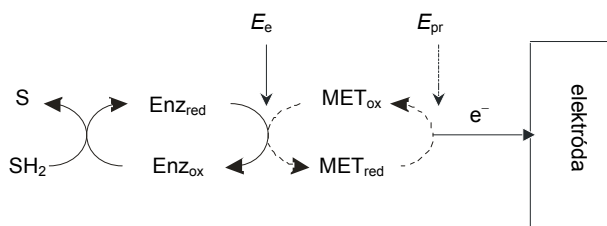
Najfrekvencovanejším prevodníkom v spojení s monitorovaním oxidačno-redukčných procesov je ampérometrický prevodník. Na tento prevodník (pracovná elektróda) je vkladán určitý polarizačný potenciál (vzťahujúci sa voči referenčnej elektróde), veľkosť prúdu tečúceho medzi elektródami je pritom lineárnou funkciou koncentrácie analytu.

Bioreceptor pri oxidácii substrátu odovzdáva elektróny pracovnej elektróde (nielen priamo ale aj prostredníctvom iných molekúl, ktorými môžu byť kosubstrát, kofaktor alebo MET, pozri obr. 1), na ktorej povrchu dochádza k elektrochemickej regenerácii celej transportnej kaskády a tým sa redoxný kolobeh uzavrie. Základným predpokladom tohto tvrdenia je skutočnosť, že elektródová reakcia prebieha oveľa rýchlejšie ako transport analytu k elektróde. Rýchlosť určujúcim stupňom je potom transport elektroaktívnej látky k elektróde, pričom rýchlosť tohto transportu sa s rastúcou hrúbkou difúznej vrstvy spomaľuje podľa druhého Fickovho zákona.

Ak počas merania zabezpečíme konštantnú hrúbku difúznej vrstvy (pomocou dokonalého miešania) budeme zaznamenávať limitný difúzny prúd i_d (rovnica (6), v ktorej c – koncentrácia analytu v stanovovanom roztoku, c_0 – koncentrácia analytu na povrchu pracovnej elektródy, d – hrúbka difúznej vrstvy).

$$(i_d)_t = nFAD \frac{(c - c_0)}{\delta} \quad (6)$$

Práve táto metóda detekcie umožňuje za optimálnych podmienok sledovať koncentrácie analytov 10⁻⁸ až 10⁻⁹ mol dm⁻³ a dynamický rozsah stanovenia môže dosahovať až tri poriadky⁴⁴. Vhodným materiálom na konštrukciu ampérometrických prevodníkov sú zlato, platina a najmä uhlík (aj ako uhlíkový prášok, ktorý je zložkou kompozitných elektród⁴⁵).



Obr. 1. Princíp pôsobenia mediátora pri enzymatickej oxidácii substrátu s ampérometrickou detekciou; E_e predstavuje pracovný potenciál vkladáný na elektródu pri priamej komunikácii enzýmu s elektródou, avšak pri použití mediátora elektrónového transportu – MET sa zefektívni prenos elektrónov t.j. hodnota pracovného potenciálu sa znižuje na E_{pr}

3.2. Mediátory

Efektívna komunikácia medzi biologickým komponentom a prevodníkom tvorí základ odzvy ampérometrických biosenzorov. MET predstavuje redoxne aktívnu látku urýchľujúcu heterogénny transport elektrónov z aktívneho centra enzýmu na povrch elektródy, pretože priamu komunikáciu biologického komponenta a prevodníka často znemožňujú a spomaľujú sterické bariéry. Látka použitá ako MET by mala spĺňať nasledovné kritériá: mala by rýchlo reagovať s enzýmom, heterogénna kinetika elektrónového transportu by mala byť reverzibilná, ďalej potenciál potrebný na regeneráciu mediátora by mal byť čo najnižší a nezávislý od pH. Redukovaná aj oxidovaná forma mediátora by mala byť stabilná, pričom redukovaná forma mediátora by nemala reagovať s kyslíkom. Keďže sa pracuje v spojení s biologickým systémom, tak by použitá látka nemala byť toxická⁴⁴.

Princíp pôsobenia MET možno opísať nasledovne: Vkladáný pracovný potenciál E_{pr} predstavuje hnaciu silu elektródovej reakcie, preto reakcia medzi mediátorom a elektródou musí prebiehať rýchlejšie ako reakcia medzi enzýmom a mediátorom aby nedochádzalo k hromadeniu produktov enzymovej reakcie ale k ich odčerpávaniu (pozri obr. 1), čím sa dosiahne posunutie termodynamickej rovnováhy. Z toho vyplýva, že pri použití MET nie je potrebné pracovať pri takom vysokom polarizačnom potenciáli (E_{pr}) ako pri priamej komunikácii enzýmu s povrchom elektródy (E_e), t.j. $E_{pr} < E_e$. Znížením hodnoty pracovného potenciálu sa aj výrazne znižuje interferenčný vplyv iných redoxne aktívnych látok prítomných vo vzorke.

Najjednoduchším mediátorom anorganického pôvodu je ferrikyanid draselný $K_3[Fe(CN)_6]$. Mediátorom na báze ferrikyanidu je Berlínska modrá $Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$, ktorá umožňuje stanovenie peroxidu vodíka. Táto je elektrochemicky redukovaná na $K_4Fe^{II}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$, ktorá je pri nízkych potenciáloch (-50 mV vs. Ag/AgCl) schopná katalyzovať redukciiu peroxidu vodíka tak ako to robia peroxidázy, preto sa jej tiež hovorí „umelá peroxidáza“^{46,47}. Ďalej sú v praxi často používané jednoduchšie organické mole-

kuly napr. 2,6-dichlórphenolindofenol, ferocény, chinóny, koordinačné zlúčeniny prechodných prvkov, tiež farbivá a špecifické polyméry.

4. Sledovanie etanolu pomocou biosenzorov

Nielen použitie biologického komponenta, ale hlavne celá architektúra konštrukcie biosenzora, rozhoduje o jeho úžitkových vlastnostiach. Problém stability odozvy biosenzorov postavených na báze NAD-ADH spôsobený vyplavovaním kofaktora NAD zo senzora do prostredia riešili Švorc a Katrlík imobilizáciou enzýmov s kofaktorom a uhlíkovým práškom (elektricky vodivý komponent) do tuhých matric (pri laboratórnej teplote) s nízkym bodom topenia a rôznym stupňom hydrofobicity⁴⁸. V prípade poklesu odozvy sa deaktivovaný povrch senzora dal pritom jednoducho obnoviť zbrúsením opotrebovanej vrstvičky a meranie mohlo pokračovať. Tento koncept sa stal základom komerčne vyrábaného analyzátora na vzorky vína²⁹. Santos a spol. zas pripravili senzor na báze NAD-ADH kovalentným zosietením enzýmu, NAD a hovädzieho sérového albumínu pomocou glutaraldehydu na uhlíkovom prášku. Modifikovaný uhlík bol potom zmiešaný s upraveným silikagélom, na ktorom bola naadsorbovaná Meldola blue⁴⁹ (funkcia MET), a minerálnym olejom. Pomocou tejto uhlíkovej pastovej elektródy bolo možné pracovať pri polarizačnom potenciáli 0 mV vs. SCE, čím boli maximálne odstránené prípadné interferencie iných elektroaktívnych látok prítomných v reálnych vzorkách. Takýto senzor sa vyznačoval excelentnou operačnou aj skladovacou stabilitou a extrémne krátkou dobou odozvy (0,6 s) ďaleko prekonávajúcou všetky doteraz používané metodiky stanovenia⁶⁴.

Iný spôsob prípravy predstavuje zabudovanie PQQ-ADH do filmov na báze polypyrol-osmiového polyméru (funkcia MET), kde sa podarilo dosiahnuť neobyvkle rozšírenie lineárneho rozsahu dosahujúceho koncentráciu etanolu 100 mmol dm⁻³, kým senzory s PQQ-ADH adsorbovanou na grafitových elektródach alebo senzory využívajúce voľne difundujúce redoxné mediátory dosahovali lineárny rozsah len okolo pár mmol dm⁻³. Biosenzor postavený na tejto báze autori zabudovali do prietokového sekvenčného analyzátora umožňujúceho plne automatické a reprodukovateľné riedenia vzoriek a štandardov. Celý monitorovací systém bol potom veľmi prakticky prepojený na fermentor pomocou kombinácie uzavretej slučky so vstavaným „cross-flow“ filtračným zariadením a jednoduchej odbublinkovávacej komory (odstraňovanie CO₂ vzniknutého počas fermentácie). Životaschopnosť tohto zariadenia bola otestovaná pri on-line monitorovaní vinneho kvasenia vo vinárskych závodoch v maďarskej tokajskej oblasti (celkový objem fermentora 45 hl)⁵⁰.

Keďže etanol vykazuje fyziologický účinok na ľudský organizmus približne od koncentrácie 10 mmol dm⁻³ v krvi a letálne účinky sa prejavujú pri koncentrácií asi 10 krát vyššej⁵¹, pochopiteľne boli vyvíjané aj senzory aplikovateľné na medicínske účely.

Tak komplexná matrica ako je krv obsahuje veľké množstvo zložiek, ktoré by mohli skresľovať stanovenie etanolu pomocou ampérometrických biosenzorov. Preto bola do pokusného prietokového monitorovacieho systému zaradená chromatografická kolóna deliaca jednotlivé zložky. Bienzýmový senzor využívajúci kombináciu AOX a peroxidázy zabudovaných do uhlíkovej pastovej elektródy bol v tejto zostave zaradený tesne za kolónu a plnil funkciu detektora. Kvôli zlepšeniu stability odozvy bola na aktívny povrch senzora aplikovaná membrána pomocou elektropolymerizácie *o*-fenyléndiamínu. Tento systém bol overovaný na sledovanie obsahu metanolu a etanolu v krvnej plazme a moči. Celá analýza pritom trvala menej ako päť minút, no zmenou rozmerov kolóny sa dá doba analýzy znížiť aj na dve minúty⁹.

Zaujímavým usporiadaním vyživajúcim „screen-printing“ technológiu Park a spol. pripravili biosenzor schopný merať koncentráciu etanolu v plynnej fáze⁵². Pretože v mnohých krajinách sa považuje za akceptovateľnú hranicu pre riadenie vozidiel koncentrácia 0,5 ‰ etanolu v krvi, čo predstavuje 130 ppm etanolu v ľudskom dychu⁵³, bol pripravený senzor vďaka svojmu dynamickému rozsahu 20–800 ppm využiteľný aj na tieto účely. Podstatou senzora bolo meranie rozdielu signálov z dvoch pracovných uhlíkových pastových elektród, pričom v jednej bola primiešaná NAD-ADH spolu s kofaktorom NAD a v druhej bol enzým nahradený hovädzím sérovým albumínom. Obe aktívne vrstvičky pracovných elektród boli spolu aj vrstvičkou referenčnej elektródy nanosené na polyesterovej fólii hrúbky 0,25 mm a pokryté vrstvičkou hydroxyetylcelulózovej membrány. Kvôli absencii MET v pracovných elektródach bolo nutné, aby meranie prebiehalo pri vysokom polarizačnom potenciáli (470 mV vs. Ag/AgCl), čo však vôbec neprekážalo, lebo prípadné interferencie boli odčítavané práve pomocou druhej pracovnej elektródy. Samotné meranie mohlo začať až po jednoduchom ovlhčení povrchu elektród ponorením do tlmivého roztoku s prídavkom KCl na dobu päť sekúnd.

Dlhodobá stabilita imobilizovaného biokomponenta má mnoho spoločného aj so stabilitou konformácie imobilizačnej matrice alebo s jej denaturáciou počas prevádzky a skladovania, hoci vplyv môžu mať aj iné slabšie interakcie. Z tohto dôvodu je zaujímavou výzvou nájsť pri vytváraní imobilizačnej matrice vhodné aditíva, ktoré by obmedzili proces zmenšovania pórov. Jedným s takýchto aditív je napríklad (hydroxyetyl)(karboxymetyl)celulózový polymér používaný pri vytváraní hybridného organicko-anorganického silikátového gélu⁵⁴.

5. Záver

Príkladné spojenie špecifického biologického člena selektívne rozoznávajúceho hľadaný analyt (etanol) vo vzorke s jednoduchým spôsobom ampérometrickej detekcie prebiehajúceho oxidoredukčného deja a v neposlednom rade jednoduchá obsluha predurčuje biosenzory k masovému využitiu v širokom meradle. Špecifická sa-

motného merania reálnych vzoriek je závislá hlavne od použitej biologickej časti, ale tiež na ňu môže podstatne vplývať aj postup prípravy senzora (imobilizácia biologického materiálu) a samozrejme podmienky merania. Pri ampérometrickom spôsobe detekcie hrá podstatnú úlohu polarizačný potenciál vkladajú na pracovnú elektródu, ktorý je zodpovedný za nešpecifické interakcie s mnohými elektrochemicky aktívnymi látkami prítomnými vo vzorkách. Preto sa vyvíja snaha znižovať E_{pr} na čo možno najnižšiu možnú hodnotu (použitie MET), resp. sa tiež uplatnili aj rôzne kompenzačné spôsoby merania založené na vyhodnocovaní rozdielu signálov z viacerých pracovných elektród. Z hľadiska automatizácie merania a vytvárania ucelených monitorovacích systémov použiteľných pre analýzu veľkých kvánt vzoriek popri prípade on-line sledovania fermentačných procesov predstavuje zabudovanie biosenzorov do prietokových analyzátorov výhodnú alternatívu často niekoľkonásobne prekonávajúcu klasické analytické metódy. Doposiaľ sa podarilo vyvinúť niektoré súpravy s obdivuhodnými úžitkovými vlastnosťami: krátky čas odozvy (rádovo niekoľko sekúnd až minút), mobilita stanovenia (príprava vreckových aparátov napájaných na batérie), široká variabilita zariadenia (vymeniteľné nástavce pre rôzne analyty). Všeobecne však možno povedať, že najväčšou prekážkou súčasných biosenzorov je stabilita ich odozvy, preto mnoho autorov rieši tento problém prípravou extrémne lacných jednorázových senzorov vyrábaných „screen-printed“ technológiou.

Z o z n a m s y m b o l o v

ADH	alkoholdehydrogenáza
Ag/AgCl	argentochloridová elektróda
AOX	alkoholoxidáza
DP	diaforáza
E^0	štandardný redoxný potenciál
E_c	potenciál aplikovaný pri priamej komunikácii enzýmu s povrchom elektródy
E_{pr}	pracovný potenciál
Enz	enzým
MET	mediátor elektrónového transportu
NAD/NADH	nikotínamidnukleotid oxidovaná/ redukovaná forma
ox	oxidovaná forma
PQQ	pyrolochinolínchinón
red	redukovaná forma
SCE	nasýtená kalomelová elektróda

LITERATÚRA

1. Calbreath D. F.: *Clinical Chemistry: A Fundamental Text-Book*. WB Saunders Company, Philadelphia 1992.
2. Kitagawa Y., Kitabatake K., Suda M., Muramatsu H., Ataka T., Mori A., Tamiya E., Karube I.: *Anal. Chem.* **63**, 2391 (1991).
3. Mulchandani A., Bassi A. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**, 105 (1995).
4. Sharma S. K., Sehgaland N., Kumar A.: *Curr. Appl. Physics* **3**, 307 (2003).
5. Couderc R., Baratti J.: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2279 (1980).
6. Gorton L., Csöregi E., Domínguez E., Emnéus J., Jönsson-Pettersson G., Marko-Varga G., Persson B.: *Anal. Chim. Acta* **250**, 203 (1991).
7. Nanjo M., Guilbault G. G.: *Anal. Chim. Acta* **75**, 169 (1975).
8. http://intel.ucc.ie/sensors/universal/P_alcohol.htm, vyhľadané 9. januára 2004.
9. Lidén H., Vijayakumar A. R., Gorton L., Marko-Varga G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1111 (1998).
10. Kulys J. J., Schmid R. D.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* **24**, 305 (1990).
11. Gorton L., Jönsson-Pettersson G., Csijregi E., Johansson K., Dominguez E., Marko-Varga G.: *Analyst* **117**, 1235 (1992).
12. Vijayakumara A. R., Csöregi E., Heller A., Gorton L.: *Anal. Chim. Acta* **327**, 223 (1996).
13. Gibson T. D., Hulbert J. N., Parkar S. M., Woodward J. R., Higgins I. J.: *Biosens. Bioelectron.* **7**, 701 (1992).
14. Liu J., Wang J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 177 (1999).
15. Burfeind J., Weigel B., Kretzmer G., Schügerl K., Huwig A., Giffhorn F.: *Anal. Chim. Acta* **322**, 131 (1996).
16. Lidén H., Buttler T., Jeppsson H., Marko-Varga G., Volc J., Gorton L.: *Chromatographia* **47**, 501 (1998).
17. Mitsubayashi K., Yokoyama K., Takeuchi T., Karube I.: *Anal. Chem.* **66**, 297 (1994).
18. Razumiene J. Meškys R., Gurevičiene V., Laurinavičius V., Reshetova M. D., Ryabov A. D.: *Electrochem. Commun.* **2**, 307 (2000).
19. Várady M., Adányi N.: *Analyst* **119**, 1843 (1994).
20. Polasek M., Gorton L., Appelqvist R., Marko-Varga G., Johansson G.: *Anal. Chim. Acta* **246**, 283 (1991).
21. Yokohama K., Nakajima K., Uchiyama S., Suzuki S., Suzuki M., Takauchi T., Karube I.: *Electroanalysis* **4**, 859 (1992).
22. Wang A.-J., Arnold, M. A.: *Anal. Chim. Acta* **64**, 1051 (1992).
23. *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation, Lakewood 1993.
24. Barman T. E.: *Enzyme Handbook*, diel 1. Springer-Verlag, New York 1969.
25. Eguchi T., Ikuza T., Kagotani T., Lee J. L., Urabe I., Okada H.: *Eur. J. Biochem.* **155**, 415 (1986).
26. Miyamoto S., Murakami T., Saito A., Kimura J.: *Biosens. Bioelectron.* **6**, 563 (1991).
27. Boujřita M., Chapleau M., El Murr N.: *Anal. Chim. Acta* **319**, 91 (1996).
28. Wu Q., Maskus M., Pariente F., Tobalina F., Fernández V. M., Lorenzo E., Abruna H. D.: *Anal. Chem.*

- 68, 3688 (1996).
29. Katrlík J., Švorc J., Stred'anský M., Miertuš S.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 181 (1998).
 30. Gros P., Durliat H., Comtat M.: *Electrochim. Acta* 46, 643 (2000).
 31. Kamen I. V., Sobolov S. B., Leonida M. D., Fry A. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 681 (1995).
 32. Tkáč J., Gemeiner P., Švitel J., Benikovsky T., Šturdík E., Vala V., Petruš L., Hrabárová E.: *Anal. Chim. Acta* 420, 1 (2000).
 33. Tkáč J., Švitel J., Novák R., Šturdík E.: *Anal. Lett.* 33, 2441 (2000).
 34. Gupta A., Singh V. K., Qazi G. N., Kumar A.: *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 3, 445 (2001).
 35. Matsushita K., Toyama H., Yamada M., Adachi O.: *Appl. Microb. Biotechnol.* 58, 13 (2002).
 36. Matsushita K., Adachi O., v kniže: *Principles and Applications of Quinoproteins*, (Davidson V.L., ed.). Marcel Decker, New York 1993.
 37. Jongejan A., Machado S. S., Jongejan J. A.: *J. Mol. Catal., B: Enzym.* 8, 121 (2000).
 38. Riedel K.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25, 19 (1991).
 39. Gonchar M. V., Maidan M. M., Moroz O. M., Woodward J. R., Sibirny A. A.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 945 (1998).
 40. Hikuma M., Takeda M., Matsuoka H., Karube I.: *Anal. Chim. Acta* 306, 209 (1995).
 41. Tkáč J., Voštiar I., Gorton L., Gemeiner P., Šturdík E.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 1125 (2003).
 42. Guži R.: *Diplomová práca*. FCHPT STU, Bratislava 2003.
 43. Korpan Y., Soldatkin A., Starodub N., El'skaya A.: *Anal. Chim. Acta* 271, 203 (1993).
 44. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors, Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
 45. Gründig B., Wittstock G., Rüdell U., Strehly B.: *J. Electroanal. Chem.* 395, 143 (1995).
 46. Karyakin A. A.: *Electroanalysis* 13, 813 (2001).
 47. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L.: *Anal. Chem.* 72, 1720 (2000).
 48. Švorc J., Miertuš S., Katrlík J., Stred'anský M.: *Anal. Chem.* 69, 2086 (1997).
 49. Santos A. S., Gorton L., Kubota L. T.: *Electroanalysis* 14, 805 (2002).
 50. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerenyi Z., Csöregi E., Schuhmann W.: *Anal. Chim. Acta* 463, 39 (2002).
 51. Rang H. P., Dale M. M., v kniže: *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1987.
 52. Park J.-K., Yee H.-J., Lee K. S., Lee W.-Y., Shin M.-C., Kim T.-H., Kim S.-R.: *Anal. Chim. Acta* 390, 83 (1999).
 53. Jones A.W.: *Clin. Chim. Acta* 146, 175 (1985).
 54. Xiao W. J., Choi M. M. F.: *Anal. Chim. Acta* 514, 219 (2004).
 55. Rütger P., Bilitewski U., Schmid R. D.: *Sens. Actuators, B* 4, 67 (1991).
 56. Leca B., Marty J. L.: *Anal. Chim. Acta* 340, 143 (1997).
 57. Lobo Castañón M. J., Miranda Ordieres A. J., Tuñón Blanco P.: *Biosens. Bioelectron.* 12, 511 (1997).
 58. Mizutani F., Sato Y., Hirata Y., Sawaguchi T., Yabuki S.: *Sens. Actuators, B* 65, 46 (2000).
 59. Kubiak W. W., Wang J.: *Anal. Chim. Acta* 221, 43 (1989).
 60. Rotariu L., Bala C.: *Anal. Lett.* 36, 2459 (2003).
 61. Kitagawa Y., Kitabatake K., Kubo I., Tamiya E., Karube I.: *Anal. Chim. Acta* 218, 61 (1989).
 62. Biran I., Rissin D. M., Ron E. Z., Walt D. R.: *Anal. Biochem.* 315, 106 (2003).
 63. Ikeda T., Kobayashi D., Matsushita F., Sagara T., Niki K.: *J. Electroanal. Chem.* 361, 221 (1993).
 64. Santos A. S., Freire R. S., Kubota L. T.: *J. Electroanal. Chem.* 547, 135 (2003).

M. Valach and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Constructions of Amperometric Biosensors for Rapid and Simple Monitoring of Ethanol**

The review is focused on construction of biosensors for monitoring of ethanol. The use of various biological components (considering their specificity), methods of preparation and practical properties of biosensors are discussed. Principles of the amperometric transducer, which is most frequently employed in detection of redox processes, are summarized. The operation mechanism of electron transfer mediators used to improve application properties of biosensors is also explained. Finally, some examples of ethanol biosensors designed for biotechnological and medical purposes are presented.

KINETIKA CHEMICKÉHO ROZPÚŠŤANIA OXIDOV: Porovnanie teórie a experimentu

ALENA FEDOROČKOVÁ^a a PAVEL RASCHMAN^b

^aKatedra chémie, ^bKatedra keramiky, Hutnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Letná 9, 042 00 Košice, Slovenská republika
Alena.Fedorockova@tuke.sk

Došlo 28.4.05, prijaté 5.8.05.

Kľúčové slová: kinetika, rozpúšťanie, oxidy, model, rýchlosť určujúci dej

Obsah

1. Úvod
2. Kinetika chemického rozpúšťania oxidov
 - 2.1. Rozpúšťanie riadené difúziou
 - 2.1.1. Všeobecná charakteristika
 - 2.1.2. Kinetické teórie pre rozpúšťanie riadené difúziou
 - 2.1.2.1. Nernstova teória
 - 2.1.2.2. Jaenickeova teória
 - 2.2. Rozpúšťanie riadené povrchovou reakciou
 - 2.2.1. Všeobecná charakteristika
 - 2.2.2. Kinetické teórie pre rozpúšťanie riadené povrchovou reakciou
 - 2.2.2.1. Engellov model
 - 2.2.2.2. Vermilyeov model
 - 2.2.2.3. Diggleov model
 - 2.2.2.4. Gorichevov model
 - 2.2.2.5. Prigogineov nerovnovážno-termodynamický model
 - 2.2.2.6. Stummov povrchovo-komplexačný model
3. Diskusia
4. Záver

1. Úvod

Teoretický a praktický význam štúdia chemického rozpúšťania kovových oxidov je podmienený skutočnosťou, že reaktivita oxidov v roztokoch zohráva dôležitú úlohu v hydrometalurgických procesoch, korózii oxidických materiálov, geochemii, katalýze, ochrane životného prostredia, výrobe liečiv a pod.

Teoretickému štúdiu mechanizmu chemického rozpúšťania kovových oxidov je v literatúre venovaná pomerne veľká pozornosť^{1–7}. Autori v ňom analyzujú rozpúšťanie z hľadiska troch všeobecných prístupov. Klasické

kinetické teórie Engella^{1–3}, Vermilyea⁴, Digglea⁵ ako aj teórie Goricheva³ a Prigoginea² reprezentujú elektrochemický prístup. Proces rozpúšťania je v nich rozpracovaný z hľadiska vplyvu potenciálov, prenosu náboja, rozloženia náboja v dvojvrstve a oxidačno-redukčných podmienok. Koloidný prístup, v ktorom sa kladie dôraz na adsorpciu a vlastnosti dvojvrstvy zo strany roztoku, zastupujú komplexačné modely Blesu¹, Warrena⁶ a Stumma⁷. Novší prístup, vychádzajúci z vlastností povrchu tuhej fázy, kde dominuje atómová štruktúra povrchu, definícia reaktívnych miest a elektrónové vlastnosti povrchových vrstiev, prináša Segall².

Aj napriek intenzívnemu vedeckému úsiliu vynaloženému počas posledných tridsiatich rokov nie sú dostatočne známe všeobecné zákonitosti, ktorými sa kinetika rozpúšťania oxidov riadi. Hlavným problémom pri pokuse odvodiť všeobecný mechanizmus lúhovania oxidov je, že žiaden oxid nebol extenzívne študovaný a oblasť reakčných podmienok pri štúdiu jednotlivých oxidov sa mení od jedného autora k druhému. Navyše, niekedy nie je možné na základe experimentálnych výsledkov jednoznačne priradiť riadiaci dej alebo experimentálne získané hodnoty kinetických parametrov poukazujú na úplne odlišné mechanizmy riadenia^{3–5}. Voľný priestor tu zostáva aj pre interpretáciu režimov, ktoré jestvujúce kinetické teórie nevysvetľujú^{3,8,9}.

Cieľom tejto práce je poukázať na teoretické aspekty rozpúšťania z hľadiska povahy oxidu (tj. stupňa iónovosti väzieb), uviesť prehľad kinetických teórií a oxidov v spojitosti s týmito teóriami, poukázať na najvýznamnejšie príklady súladu/nesúladu teórií vo vzťahu k experimentom, ako aj upozorniť na niektoré miesta vyžadujúce ďalšie/hlbšie skúmanie.

2. Kinetika chemického rozpúšťania oxidov

Procesy chemického rozpúšťania kovových oxidov sú heterogénne chemické reakcie, ktorých priebeh na fázovom rozhraní tuhá látka-kvapalina pozostáva vo všeobecnosti z troch sériových krokov – sú to¹⁰:

- a) difúzia hydratovaných kationových a aniónových komplexov reaktantov cez kvapalnú film k tuhému povrchu oxidu,
- b) povrchové chemické reakcie na fázovom rozhraní kvapalina – tuhá látka za vzniku povrchových zlúčenín,
- c) uvoľňovanie reakčných produktov z fázového rozhrania a ich difúzia do hlavného prúdu kvapaliny.

Výsledná rýchlosť procesu závisí od pomeru rýchlosti vlastných (povrchových) chemických reakcií reprezentovaných krokom b) a transportných dejov a) a c). V najjednoduchších prípadoch, ak je rýchlosť chemickej reakcie a transportných dejov výrazne odlišná, je celková rýchlosť rozpúšťania určená najpomalším dejom¹⁰.

Tabuľka I

Rýchlosti rozpúšťania niektorých kovových oxidov v kyslých roztokoch pri pH 1 a teplote 30 °C (* resp. 60 °C)

Oxid	Typ	Rýchlosť [mol m ⁻² s ⁻¹]	Lit.
CaO	iónový	1,2 · 10 ⁻³	2
MgO	iónový	1,2 · 10 ⁻⁴	11
ZnO	polovodiivý (n-typ)	2,4 · 10 ⁻⁵	13
MnO	polovodiivý (p-typ)	8,0 · 10 ⁻⁵	2
CoO	polovodiivý (p-typ)	1,0 · 10 ⁻⁶	14
Mn ₃ O ₄	polovodiivý (p-typ)	2,2 · 10 ⁻⁷	2
Mn ₂ O ₃	polovodiivý (n-typ)	3,4 · 10 ⁻⁸	2
NiO	polovodiivý (p-typ)	2,0 · 10 ⁻¹⁰	15
α-Fe ₂ O ₃	polovodiivý (p-typ)	1,2 · 10 ^{-11*}	2
α-Al ₂ O ₃	kovalentný	9,3 · 10 ^{-12*}	2

Existuje skupina oxidov, ktorú charakterizuje prívlastok „nerozpustný“ aj napriek tomu, že sú vysoko rozpustné, avšak sa rozpúšťajú veľmi pomaly. Toto označenie nie je prekvapujúce v prípade NiO, ktorého rýchlosť rozpúšťania pri pH 1 a 60 °C zodpovedá odstráneniu jednej atómovej vrstvy za mesiac². Opakom je však MgO, ktorého rozpúšťanie v koncentrovaných roztokoch kyselín (pH < 1) prebieha rýchlosťou (5 · 10⁻⁴ mol m⁻² s⁻¹), zodpovedajúcou odstráneniu viac ako 25 atómových vrstiev za sekundu^{11,12}. Rozdiely v rýchlosti rozpúšťania niektorých oxidov kovov dokumentuje tabuľka I.

Z tabuľky I vyplýva, že rýchlosti rozpúšťania rôznych kovových oxidov sa za rovnakých podmienok (30 °C, pH 1) pohybujú v rozsahu niekoľkých poriadkov (od 10⁻³ do 10⁻¹¹ mol m⁻² s⁻¹). Veľmi rýchly režim (s rýchlosťami od 10⁻³ do 10⁻⁴ mol m⁻² s⁻¹) je charakteristický pre rozpúšťanie iónových oxidov (napr. CaO, MgO). Veľmi pomalý režim, s rýchlosťami nižšími ako 10⁻¹¹ mol m⁻² s⁻¹, je naopak typický pre kovalentné oxidy (napr. Al₂O₃, TiO₂, SiO₂). Prechodnú skupinu medzi veľmi rýchlym a veľmi pomalým režimom tvoria polovodiivé oxidy (s čiastočnou iónovosťou na povrchu) s rýchlosťami od 10⁻⁵ do 10⁻¹¹ mol m⁻² s⁻¹. Kinetika rozpúšťania polovodiivých oxidov s vyššími rýchlosťami (napr. CoO, ZnO, CdO) je veľmi podobná iónovým oxidom.

Rozdielna rýchlosť rozpúšťania poukazuje na skutočnosť, že je nepravdepodobné, aby bolo rozpúšťanie rôznych typov oxidov riadené rovnakým riadiacim dejom (RDS) prípadne aby sa v rámci jednej skupiny oxidov s rozdielnou rýchlosťou uplatnil rovnaký mechanizmus riadenia.

2.1. Rozpúšťanie riadené difúziou

2.1.1. Všeobecná charakteristika

Rozpúšťanie oxidov je riadené difúziou v nasledujúcich prípadoch:

- a) Pri rozpúšťaní kovových oxidov za takmer rovnovážnych podmienok (blízky nasýteniu)^{1,2}. K iónovej výmene dochádza v dôsledku toku katiónov a aniónov v oboch smeroch, pričom v roztoku je splnená podmienka elektroneutrality (I) (cit.¹):

$$\sum z_i j_i = 0 \quad (1)$$

z_i – mocnosť iónov i a j_i – intenzita toku iónov i . Difúzia katiónov ($M_{(aq)}^{z+}$) do objemu musí byť v rovnováhe kompenzovaná difúziou iónov (napr. H⁺) k povrchu oxidu v dôsledku čoho nie je možné jednoznačne určiť, či je rozpúšťanie riadené difúziou reaktantov alebo produktov. Takéto prípady sú najzaujímavejšou skupinou reakcií riadených difúziou.

- b) V extrémnych prípadoch, kedy sú rýchlosti rozpúšťania buď veľmi vysoké alebo koncentrácia reaktantu veľmi nízka^{1,2}.

Prvý prípad je typický pre veľmi rýchle rozpúšťanie iónových oxidov v silne kyslých roztokoch, riadené difúziou rozpustených zložiek ($M_{(aq)}^{z+}$) z fázového rozhrania do roztoku. Druhý prípad nastáva pri pomalom rozpúšťaní vysoko reaktívnych kovových oxidov vo veľmi zriedených roztokoch agresívnych reagentov. V tomto prípade je oblasť fázového rozhrania extrémne zriedená, v dôsledku čoho je rýchlosť riadená difúziou protónov k povrchu oxidu.

Odlíšiť difúzne riadenie od riadenia povrchovou reakciou umožňuje vypočítaná hodnota zdanlivej aktivačnej energie E . V procesoch riadených difúziou sa pohybuje v rozsahu 15 až 20 kJ mol⁻¹ (cit.^{1,3}).

2.1.2. Kinetické teórie pre rozpúšťanie riadené difúziou

Rozpúšťanie riadené difúziou iónov v elektrickej dvojvrstve opisujú dve teórie.

2.1.2.1. Nemstova teória

Nemstova teória sa aplikuje pri rozpúšťaní iónových a rýchlorozpustných polovodiivých oxidov v (rovnovážnych) podmienkach takmer nasýtených roztokov². Rýchlosť rozpúšťania je v tomto prípade riadená difúziou iónov v elektrickej dvojvrstve a dá sa vyjadriť vztáhom (2) (cit.^{1,2}):

$$j_D = \frac{D}{\delta} (c_{\text{nas}} - c)^n \quad (2)$$

c , c_{nas} označujú koncentráciu roztoku počas rozpúšťania resp. v stave nasýtenia, D je koeficient difúzie, δ je hrúbka difúznej vrstvy, n je exponent ($n = 1$).

2.1.2.2. Jaenickeova teória

Teória vychádza z predpokladu, že riadiacim dejom je súčasná difúzia katiónov (j_+) a aniónov (j_-) uvoľnených z tuhého povrchu cez kvapalnú vrstvu elektrickej dvojvrstvy (hrúbky δ) (cit.²). K matematickému popisu využíva 1. Fickov zákon v tvare (3):

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} = D \frac{c_S}{\delta} \quad (3)$$

v ktorom j – intenzita toku iónov, c_S – koncentrácia solvovaných iónov, uvoľnených z povrchu tuhej látky (v závislosti od toho, ktorý prenos je pomalší) vo vnútornej Helmholtzovej rovine. Prenos katiónov je zvyčajne pomalší ako prenos aniónov.

Špecifické prípady tejto formy riadenia boli zistené pri rýchlom, neoxidačnom rozpúšťaní oxidov (napr. MgO, ZnO) v podmienkach, keď sú koncentrácie reaktantu veľmi nízke ($c_{H^+}, c_{OH^-} < 10^{-5}$ mol dm⁻³) a rýchlosť je riadená difúziou reaktantu k povrchu oxidu^{12,16}.

2.2. Rozpúšťanie riadené povrchovou reakciou

2.2.1. Všeobecná charakteristika

Rozpúšťanie oxidu v dôsledku povrchovej chemickej reakcie sa v literatúre najčastejšie opisuje ako proces, pri ktorom sa po ataku rozpúšťadla a/alebo rozpustených iónov vytvára na povrchu oxidu podľa rovnice (4) povrchový komplex¹, ktorý je viazaný k povrchu cez oxoväzby (schematicky označené v nasledujúcom texte ako $\equiv M \cdots$):



Reakciou povrchového komplexu s rozpúšťadlom a/alebo rozpustenými zložkami dochádza k pretrhnutiu M-O-M väzieb a uvoľneniu kovového iónu z povrchu oxidu do roztoku podľa rovnice (5):

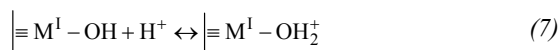


Procesy, ktoré môžu prebiehať na fázovom rozhraní za vzniku povrchových komplexov sú^{1,2}:

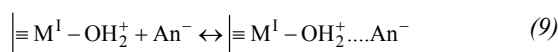
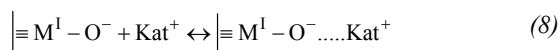
- a) Adsorpcia vody za vzniku hydratovanej povrchovej vrstvy oxidu (napr. pre oxid typu M_2O^{-II}):



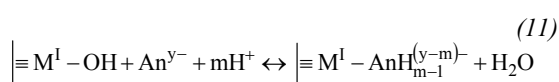
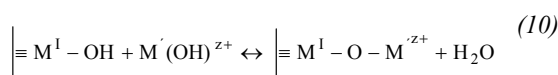
- b) Protolytické reakcie povrchových OH⁻ skupín:



- c) Adsorpcia katiónov a aniónov v dôsledku elektrostatických interakcií s nabitými povrchovými skupinami:



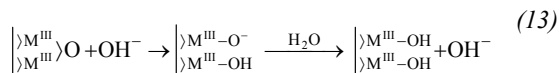
- d) Chemisorpcia katiónov a aniónov:



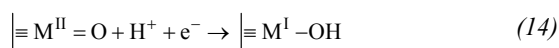
- e) Elektrofilný (napr. H⁺) a/alebo nukleofilný (napr. An^{y-}, OH⁻) atak vedúci k pretrhnutiu M-O-M väzieb:



alebo tzv. bázická katalyzovaná hydrolyza (napr. pre Al₂O₃):



- f) Reakcie spojené s prenosom náboja (napr. pre oxid typu M^{II}O^{-II}):



- g) Reakcie, pri ktorých dochádza k výmene vody medzi povrchom oxidu a roztokom (kvapalným filmom).
h) Hydratačné a dehydratačné reakcie, ktoré sú vo všeobecnosti veľmi rýchle, preto úlohu riadiaceho deja preberajú iba vo výnimočných prípadoch.
i) Poslednou skupinou sú rekonštrukčné reakcie, ktorými sa v dôsledku povrchovej mobility iónov rušia resp. tvoria M-O väzby.

Hodnoty zdanlivej aktivačnej energie rozpúšťania oxidov riadeného povrchovou reakciou sa pohybujú v rozsahu 40–100 kJ mol⁻¹ (cit.^{2,3}).

2.2.2. Kinetické teórie pre rozpúšťanie riadené povrchovou reakciou

Podľa kinetických teórií, ktoré sa najčastejšie používajú na vysvetlenie priebehu rozpúšťania oxidov v kinetickej oblasti, riadiacim dejom môže byť:

- a) prenos iónov cez elektrickú dvojvrstvu vyvolaný zmenou potenciálu (Engell¹⁻³, Vermilyea⁴, Diggle⁵),
b) oxidačno-redukčný dej sprevádzaný prenosom náboja (Gorichev³),
c) dej spôsobujúci zmenu elektrochemického potenciálu (Prigogine²),
d) tvorba povrchových komplexov (Stumm⁷).

Tri modely (Engellov, Vermilyeov, Diggleov) analyzujú rozpúšťanie v podmienkach, kde riadiacim dejom je prenos iónov cez elektrickú dvojvrstvu, vyvolaný zmenou potenciálového rozdielu $\Delta\phi$ ($\Delta\phi = \phi_S - \phi_H$) medzi povrchom (ϕ_S) a vonkajšou Helmholtzovou rovinou (ϕ_H). Vzhľadom na rozmanitosť faktorov, ktoré môžu ovplyvniť ϕ_S (protónácia, povrchová rekonštrukcia, protónová penetrácia oxidu) a ϕ_H (pH, iónová sila roztoku, chemický potenciál jednotlivých iónových zložiek, špecifická adsorpcia iónov z roztoku) je zrejmé, že rýchlosť rozpúšťania, odvodená na základe týchto teórií, môže byť vyjadrená ako funkcia uvedených faktorov.

2.2.2.1. Engellov model

Engell pri odvodení svojho modelu predpokladá, že:

- transport kationov a aniónov ($M_{(s)}^{z+} \rightarrow M_{(aq)}^{z+}$, $An_{(s)}^{y-} \rightarrow An_{(aq)}^{y-}$) uvoľnených z povrchu tuhej látky je nezávislý,
- súčet chemických potenciálov iónov na povrchu aj v roztoku je konštantný ($\mu_+ + \mu_- = \mu_{\pm}$),
- rozpúšťanie prebieha za podmienok vzdialených od rovnováhy,
- toky iónov cez elektrickú dvojvrstvu (vyjadrené v chemických ekvivalentoch) sú rovnaké,
- rýchlosť rozpúšťania závisí od potenciálu v Helmholtzovej vrstve v súlade s Volmerovou rovnicou,
- povrchové koncentrácie iónov sú dané Boltzmanovou závislosťou na chemickom potenciáli¹⁻³.

Závislosť rýchlosti rozpúšťania, vyjadrená intenzitou toku kationov kovu cez elektrickú dvojvrstvu na zmene potenciálu, je podľa autora daná vzťahom (15):

$$j = k_E(T, \mu_+, \mu_-) \exp \left[\frac{(\alpha_+ |z_+| - \alpha_- |z_-|) F \Delta \phi}{RT} \right] \quad (15)$$

j – intenzita toku iónov, k_E – rýchlostná konštanta, α_+, α_- – podiel, ktorý charakterizuje mieru vplyvu potenciál určujúcich iónov ($0 < \alpha < 1$), F – Faradayova konštanta, R – plynová konštanta, T – termodynamická teplota.

Z rýchlostného vzťahu (15) vyplýva, že intenzitu toku j ovplyvňujú dva faktory:

- hodnota rozdielu $\alpha_+ |z_+| - \alpha_- |z_-|$
- zmena potenciálu $\Delta \phi = \phi_S - \phi_H$

Ak $\alpha_+ |z_+| > \alpha_- |z_-|$, smernica závislosti $\ln(j) = f(\Delta \phi)$ má kladnú hodnotu, t.j. rýchlosť rozpúšťania rastie lineárne s nárastom $\Delta \phi$.

Takýto priebeh je charakteristický pre počiatkové štádium rozpúšťania iónových a rýchlorozpusťných polovodivých oxidov^{8,17-20}. Zmena $\Delta \phi$ by mohla byť spôsobená:

- buď protonačným mechanizmom, kde k nárastu potenciálu ϕ_S dochádza v dôsledku povrchovej protonácie, ktorá by uľahčila rekonštrukcia povrchu oxidu v roztoku,
- alebo pomalšou podpovrchovou penetráciou protónov (riadenou difúziou).

Nárast funkcie $\ln(j)$ by pokračoval dovtedy, kým by sa buď neustálil ϕ_S alebo pokiaľ by sa nestal riadiacim (najpomalším) dejom prenos protónov cez elektrickú dvojvrstvu.

Ak $\alpha_+ |z_+| < \alpha_- |z_-|$, smernica závislosti $\ln j = f(\Delta \phi)$ má zápornú hodnotu, t.j. rýchlosť rozpúšťania rastie lineárne s poklesom $\Delta \phi$. Takýto priebeh je charakteristický pre rozpúšťanie riadené prenosom iónov z povrchu oxidu do roztoku³.

Nedostatkem Engellovej teórie je, že platí iba pre stechiometrické oxidy, nakoľko $\Delta \phi$ sa vzťahuje iba k Helmholtzovej rovine a nezohľadňuje defektnú štruktúru tuhej látky. Navyše teória sa nedá aplikovať na rozpúšťanie iónových oxidov typu MO ($\alpha_+ = \alpha_-$), kedy predpokladá malú alebo takmer žiadnu závislosť rýchlosti na $\Delta \phi$, čo je

v rozpore s nameranými závislosťami rýchlosti od pH v pokročilých štádiách rozpúšťania iónových a polovodivých oxidov².

2.2.2.2. Vermilyeov model

Vermilyea ako prvý objasnil závislosť rýchlosti rozpúšťania oxidov od aktivity vodíkových iónov (alebo pH)⁴. Riadiacu úlohu opäť zohráva prenos iónov cez elektrickú dvojvrstvu, vyvolaný zmenou potenciálu ($\Delta \phi = \phi_S - \phi_H$). Keďže z praktického hľadiska má väčší význam rozpúšťanie v podmienkach vzdialených od rovnováhy, vychádza autor z nasledujúcich predpokladov²⁻⁴:

- proces rozpúšťania je nevratný;
- rýchlosti odstraňovania kationov a aniónov (vyjadrené pomocou chemických ekvivalentov) sú rovnaké,
- súčet koncentrácií iónov na povrchu je konštantný (uvažuje s možnou nestechiometriou oxidu),
- v elektrickej dvojvrstve nie je výrazná difúzna vrstva ($\phi_H = \phi_{\text{objem roztoku}}$),
- potenciálový rozdiel na fázovom rozhraní spôsobuje výmena kationov (kovové kationy oxidu alebo protóny) a aniónov (O^{2-} anióny oxidu alebo OH^- ióny).

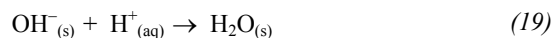
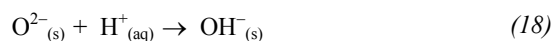
Ak rozpúšťanie oxidu prebieha ako nevratná reakcia, sú rýchlosti odstraňovania iónov vyjadrené rovnicami (16) a (17):

$$j_+ = n_+ k_+ \exp \left[\frac{\alpha_+ z_+ F \Delta \phi}{RT} \right] \quad (16)$$

$$j_- = n_- k_- \exp \left[\frac{\alpha_- z_- F \Delta \phi}{RT} \right] \quad (17)$$

n_+, n_- vyjadruje počet kationov a aniónov prislúchajúcich na jednotku povrchovej plochy fázového rozhrania, k_+, k_- sú rýchlostné parametre.

V súvislosti s rozpúšťaním kovových oxidov v kyslých roztokoch uvažoval Vermilyea s tromi možnými povrchovými reakciami:



a modifikoval vzťah (17), zohľadňujúc atak H^+ iónov na povrchové anióny, do tvaru (21):

$$j_- = n_- k'_- (a_{H^+})^p \exp \left[\frac{\alpha_- z_- F \Delta \phi}{RT} \right] \quad (21)$$

kde k'_- je rýchlostná „konštanta“, a_{H^+} – aktivita vodíkových iónov, p – počet protónov prenášaných v rámci rýchlosti určujúceho kroku (18), (19) alebo (20).

Za predpokladu, že rýchlosti odstraňovania katiónov a aniónov sú rovnaké, z rovníc (21) a (16) sa dá zmena potenciálu $\Delta\phi$ vyjadriť vzťahom (22):

$$\Delta\phi = \frac{RT}{(\alpha_+z_+ - \alpha_-z_-)F} \ln \left[\frac{n_-k_-}{n_+k_+} (a_{H^+})^p \right] \quad (22)$$

Dosadením z (22) do (16) sa získa vzťah (23) pre výpočet intenzity toku katiónov kovu j_+ :

$$\ln(j_+) = \text{konšt} + \frac{p\alpha_+z_+}{\alpha_+z_+ - \alpha_-z_-} \ln(a_{H^+}) \quad (23)$$

Zo vzťahu (23) vyplýva, že rýchlosť rozpúšťania oxidu je funkciou aktivity H^+ iónov a_{H^+} (resp. pH) a parametra n , definovaného rovnicou (24):

$$n = \frac{d(\ln j_+)}{d(\ln a_{H^+})} = -\frac{d(\log j_+)}{d(\text{pH})} = \frac{p\alpha_+z_+}{\alpha_+z_+ - \alpha_-z_-} \quad (24)$$

Hodnota parametra n vo vzťahu (24) závisí od typu oxidu a od toho, ktorá z povrchových protonačných reakcií (18) až (20) riadi celkovú rýchlosť rozpúšťania – príklady sú uvedené v tabuľke II.

Prínosom Vermilyeovej teórie je, že umožňuje porovnaním smerníc nameraných závislostí $\log j = f(\text{pH})$ s hodnotami parametra n , uvedenými v tabuľke II, identifikovať riadiaci dej^{2,4,21}. Napr. pri rozpúšťaní dvojmocných oxidov (ako napr. MgO, ZnO a NiO) poukazuje smernica závislosti $\log j = f(\text{pH})$ s číselnou hodnotou $-1/2$ na riadenie povrchovou protonáciou ($O^{2-}_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow OH^-_{(s)}$).

Ak je protonačná reakcia $O^{2-}_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow OH^-_{(s)}$ tak rýchla, že dochádza k penetrácii protónov do podpovrchových oblastí oxidu a $\Delta\phi$ narastá v dôsledku nárastu ϕ_S , bude mať závislosť $\log j = f(\text{pH})$ kladnú smernicu. V takomto prípade rýchlosť rozpúšťania s poklesom koncentrácie H^+ iónov stúpa, čo je typické pre počiatočné štádiá rozpúšťania iónových a rýchlorozpustných polovodivých oxidov^{8,17,19,20}.

2.2.2.3. Diggleov model

Diggle⁵, na rozdiel od Vermilyea⁴, vychádzal pri odvedení svojho modelu z týchto predpokladov:

- a) rýchlosti, vyjadrené rovnicami (16) a (21) (cit.⁴) sa dajú uvažovať aj jednotlivito;

- b) potenciálový rozdiel $\Delta\phi$ je definovaný ako (25):

$$\Delta\phi = \phi_S - \phi_H = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{a}{a_0} \right) \quad (25)$$

a – aktivita potenciál určujúcich iónov v Helmholtzovej vrstve, a_0 – aktivita rovnakého druhu iónov pri potenciáli nulového náboja, t.j. v izoelektrickom bode (keď $\phi_H = \phi_S$);

- c) uvažuje sa so zmenami ϕ_H , nie ϕ_S ;

- d) predpokladá, že potenciál určujúce sú prakticky vždy ióny H^+ a OH^- (pretože v počiatočných štádiách rozpúšťania je nepravdepodobné, aby katióny a anióny oxidu mohli výraznejšie ovplyvniť potenciál ϕ_H).

Diggle vychádza z predstavy, že pri výmene aniónov je priamy tok aniónov iba čiastočne vyvážený spätným tokom a nerovnováhu medzi nimi kompenzuje priamy tok katiónov, ktorý určuje celkovú rýchlosť rozpúšťania. Tento prípad označil ako rozpúšťanie riadené odstraňovaním katiónov. V opačnom prípade, pri kompenzácii toku katiónov, sa jedná o riadenie odstraňovaním aniónov.

Celková rýchlosť rozpúšťania môže byť podľa Diggleovej teórie riadená:

- a) odstraňovaním katiónov – platí vzťah (26):

$$n = \frac{d(\ln j_+)}{d(\ln a_{H^+})} = -\frac{d(\log j_+)}{d(\text{pH})} = \frac{\alpha_+z_+}{z} = \alpha_+z_+ \quad (26)$$

$$(z = 1 \text{ pre } H^+)$$

- b) odstraňovaním aniónov – platí vzťah (27):

$$n = \frac{d(\ln j_-)}{d(\ln a_{H^+})} = -\frac{d(\log j_-)}{d(\text{pH})} = (p + \alpha_-z_-) \quad (27)$$

p – rovnaký parameter ako vo Vermilyeovej teórii, t.j. počet protónov prenášaných v rámci rýchlosti určujúceho kroku (18) až (20).

Ak by prebiehalo rozpúšťanie oxidov, ako sú napr. MgO, ZnO ($z_+ = 2$, $\alpha_+ = 0,5$) mechanizmom, v ktorom riadiacu úlohu zohráva odstraňovanie katiónov (Mg^{2+} , Zn^{2+}) z povrchu oxidu, bola by rýchlosť priamo úmerná aktivite vodíkových iónov a_{H^+} .

Tabuľka II

Hodnoty zdanlivého poriadku n vypočítané pomocou rovnice (24) za predpokladu, že katióny a anióny oxidu sú potenciál určujúce a $\alpha_+ = \alpha_-$

Proces	Typ oxidu			
	$z_+ = 1 \Rightarrow M_2O$	$z_+ = 2 \Rightarrow MO$	$z_+ = 3 \Rightarrow M_2O_3$	$z_+ = 4 \Rightarrow MO_2$
$O^{2-}_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow OH^-_{(s)}$	1/3	1/2	3/5	2/3
$OH^-_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow H_2O_{(s)}$	1/2	2/3	3/4	4/5
$O^{2-}_{(s)} + 2H^+_{(aq)} \rightarrow H_2O_{(s)}$	2/3	1	6/5	4/3

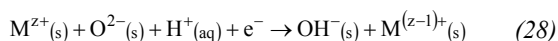
Avšak ak by bolo rozpúšťanie riadené rýchlosťou, akou sú z povrchu oxidu odstraňované anióny (O^{2-} , OH^-), menila by sa rýchlosť procesu s a_{H^+} podľa toho, ktorá z protonačných reakcií (18) až (20) riadi rozpúšťanie. Za predpokladu $\alpha_- = 0,5$ bude sa rýchlosť v prípade reakcie $O^{2-}_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow OH^-_{(s)}$ meniť s $(a_{H^+})^0$; $OH^-_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow H_2O_{(s)}$ s $(a_{H^+})^{0,5}$; $O^{2-}_{(s)} + 2 H^+_{(aq)} \rightarrow H_2O_{(s)}$ s $(a_{H^+})^1$. Zaujímavá je skutočnosť, že rýchlosť rozpúšťania v tomto prípade nezávisí od mocnstva kovového iónu z_+ (vzťah 27).

Smernica závislosti $\log j = f(\text{pH})$ má v pokročilých štádiách rozpúšťania iónových (MgO, BeO) (cit. 11,21,22), ľahko rozpustných (ZnO, CoO, MnO) (cit. 14,23,24) a ťažko rozpustných polovodivých (Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Fe_3O_4) oxidov^{25–28} hodnotu $-1/2$, čo predpokladá, že riadiacim krokom by malo byť podľa tejto teórie odstraňovanie aniónov druhou protonačnou reakciou ($OH^-_{(s)} + H^+_{(aq)} \rightarrow H_2O_{(s)}$).

Vzhľadom k tomu, že obidva mechanizmy predurčujú zápornú smernicu závislosti $\log j = f(\text{pH})$ (vzťahy (26), (27)), experimentálne zistené kladné hodnoty smernice vylučujú riadenie protonáciou v počiatočných štádiách rozpúšťania iónových a rýchlorozpustných polovodivých oxidov^{8,17,19,20}.

2.2.2.4. Gorichevov model

Gorichev³ na rozdiel od Digglea⁵ predpokladá, že k zmene potenciálu ($\Delta\phi$) dochádza nielen zmenou aktivity potenciál určujúcich iónov (rovnica (25)) ale aj v dôsledku pomalého prenikania protónov tuhou fázou (zmenou ϕ_s). V počiatočnej fáze procesu dochádza k prenosu protónov cez elektrickú dvojvrstvu a ich adsorpciu na povrchu oxidu. V druhej fáze prenikajú protóny do podpovrchových oblastí oxidu za súčasného prenosu elektrónu z jedného kovového iónu na druhý podľa rovnice (28):



Závislosť rýchlosti rozpúšťania oxidu, vyjadrená intenzitou toku katiónov kovu z fázového rozhrania do objemu roztoku na aktivite vodíkových iónov (pH), $\Delta\phi$ a T , vystihuje rýchlostný vzťah (29):

$$j = k_G (T, \Delta\phi) \cdot a_{H^+}^{1/2} \quad (29)$$

k_G – rýchlostná konštanta. Účasťou protónov na elektrochemických procesoch sa vysvetľuje rozdielna aktivita hydratovaných a nehydratovaných oxidov.

Nedostatkom tohto modelu je, že neuvažuje prípad oxidačného rozpúšťania (napr. NiO, Cu_2O) a v prípadoch, keď $\Delta\phi$ závisí aj od a_{H^+} , je aktivita závislosť rýchlosti (29) v podstate len empirická.

2.2.2.5 Prigogineov nerovnovážno-termodynamický model

Príkladom kinetickej teórie v ktorej riadiacu úlohu zohrávajú zmeny elektrochemického potenciálu je Prigogineov nerovnovážno-termodynamický model².

Rýchlosť rozpúšťania, vyjadrená intenzitou toku katiónov kovu, je daná vzťahom (30):

$$j = k_P (T) \cdot a_{H^+,eq} \cdot \exp \left(\frac{zF\Delta\phi + 2,3 RT (\text{pH})}{RT} \right) \quad (30)$$

k_P – rýchlostná konštanta, $a_{H^+,eq}$ – rovnovážna aktivita H^+ iónov.

Prigogineov model aplikoval vo svojich prácach Fruhwirth^{12,29}, ktorý analyzoval rozdielny priebeh závislosti $\log j = f(\text{pH})$ v počiatočnom a pokročilom štádiu rozpúšťania MgO a ZnO. Lineárny priebeh závislosti v počiatočnom štádiu ($c_{H^+} > c_{M^{z+}}$) odôvodnil konštantným pokrytím povrchu protónmi. Odklon od linearity v pokročilých štádiách ($c_{H^+} < c_{M^{z+}}$), kedy je rýchlosť úmerná rozdielu $\text{pMg} - \text{pH}$, pripísal vplyvu prítomnosti katiónov M^{z+} z rozpúšťajúceho sa oxidu.

2.2.2.6. Stummov povrchovo-komplexačný model

Vermilyeova teória⁴ síce objasnila závislosť rýchlosti rozpúšťania od a_{H^+} (pH), avšak z praktických skúseností je známe, že nie všetky kyseliny majú na rýchlosť rozpúšťania rovnaký vplyv. Dôležitú úlohu v procese chemického rozpúšťania oxidov zohrávajú anióny. Prínosom v objasnení vplyvu aniónov bol Stummov povrchovo-komplexačný model^{1,7}.

Stumm na základe predpokladu rýchleho ustálenia sa adsorpčnej rovnováhy $\equiv M - OH + H^+ \leftrightarrow \equiv M - OH_2^+$ na fázovom rozhraní oxid kovu – vodný roztok elektrolytu pretransformoval Vermilyeov mocninový rýchlostný vzťah (31)

$$j = k_V (T, \Delta\phi) \cdot a_{H^+}^n \quad (31)$$

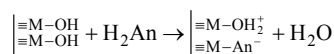
do tvaru (32):

$$r = k_{ST} \cdot \{ \equiv MOH_2^+ \}^m \quad (32)$$

r – rýchlosť rozpúšťania oxidu [$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$], k_{ST} – rýchlostná konštanta, $\{ \equiv MOH_2^+ \}$ – hustota povrchových komplexov, m – poriadok totožný s mocnstvom kovového iónu M^{z+} .

Štúdiom kyslého rozpúšťania kovových oxidov za asistencie ligandov sa zistilo, že nárast rýchlosti rozpúšťania podľa rovnice $\equiv M - OH_2^+ + An^- \leftrightarrow \equiv MAn + H_2O$ je (pri rovnakom počte aktívnych miest) spôsobený vyššími hodnotami rýchlostných konštánt rozpúšťania povrchových komplexov. Uvedený prípad je typický pre silné σ – donorové ligandy, účinkom ktorých dochádza k uvoľneniu oxoväzieb, spájajúcich ión kovu s tuhou mriežkou podľa: $\equiv M - An \rightarrow \equiv + MAn$ (cit. 1,7,30). Urýchľujúci efekt však možno pozorovať aj v roztokoch slabých kyselín s komplexotvorným aniónom (napr. H_2An). V takomto

pripade prebieha disociačná chemisorpcia s veľmi dôležitou koadsorpciou protónov podľa schémy



a nárast rýchlosti rozpúšťania pri akejkoľvek hodnote pH nastáva v dôsledku nárastu koncentrácie povrchových komplexov $\{\equiv\text{MOH}_2^+\}$ – vzťah (32) (cit. ^{1,7}).

Silná chemisorpcia však môže viesť v niektorých prípadoch aj k poklesu rýchlosti rozpúšťania¹. Kým oxidy železa a mangánu sa v prítomnosti kyseliny etyléndiamintetraoctovej (EDTA) rozpúšťajú rýchlejšie², v prípade rozpúšťania oxidov meďi (CuO, Cu₂O) a niklu (NiO, Ni₂O₃) bol zistený jej opačný účinok³. Rovnako bol pozorovaný pokles rýchlosti rozpúšťania Fe₃O₄ a Fe₂O₃ v dôsledku prídavku 1,10-fenantrolínu (cit. ³).

To, či bude ligand urýchľovať alebo pasivovať rozpúšťanie povrchu oxidu, závisí vo všeobecnosti na konfigurácii a stabilite povrchových komplexov¹. Napríklad rozdielny vplyv EDTA sa vysvetľuje jej schopnosťou vytvárať s kationmi rôznych oxidov rozmanité povrchové komplexy, ktoré môžu za určitých podmienok chrániť povrch oxidu pred protónovým útokom¹.

3. Diskusia

Ako vyplýva z prehľadu uvedeného v predchádzajúcej časti, charakter riadiaceho deja závisí od typu oxidu a reakčných podmienok. Na všeobecne platný klesajúci trend rýchlosti rozpúšťania od iónových ($1 \cdot 10^{-4}$ až $1 \cdot 10^{-3}$ mol m⁻² s⁻¹), cez polovodivé ($1 \cdot 10^{-11}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol m⁻² s⁻¹) až po kovalentné oxidy ($< 1 \cdot 10^{-11}$ mol m⁻² s⁻¹) poukazuje tabuľka I. Typy procesov, ktoré riadia rozpúšťanie oxidov v anorganických kyselinách sú vo vzťahu k elektrónovej štruktúre oxidu (iónový, polovodivý, kovalentný)¹ zhrnuté v tabuľke III.

V praxi sa pre určenie riadiaceho deja najčastejšie využívajú tieto kinetické parametre:

a) poriadok reakcie voči H⁺ iónom, ktorý sa určí z nameranej závislosti $\log j = f(\ln a_{\text{H}^+})$

b) zdanlivá aktivačná energia E .

Prehľad hodnôt kinetických parametrov pre niektoré oxidy v kontexte kinetických teórií uvádza tabuľka IV.

Z analýzy údajov uvedených v tabuľke IV. vyplýva, že:

1. Vysoké hodnoty aktivačných energií E ($> 41,8$ kJ mol⁻¹) indikujú, že rozpúšťanie oxidov prebieha v kinetickej oblasti, riadiacim dejom je povrchová reakcia.
2. Široký interval hodnôt smerníc n_E (od $-0,5$ až $2,4$) nameraných závislostí $\log j = f(\ln a_{\text{H}^+})$ poukazuje na skutočnosť, že pri rozpúšťaní rôznych oxidov (pri rôznych podmienkach) sa uplatňujú rôzne mechanizmy riadenia.
3. V prípadoch, kedy sú experimentálne určené hodnoty n_E blízke hodnotám parametra n_T , je možné určiť riadiaci dej na základe teoretických predstáv o priebehu procesu podľa jednotlivých kinetických modelov (kap. 2.2.2.2.–2.2.2.4.).

Tabuľka III

Riadiace deje pri rozpúšťaní kovových oxidov v anorganických kyselinách¹

Typ oxidu		
iónový	polovodivý	kovalentný
difúzia	protolytické reakcie	nukleofilný útok
elektrofilný útok	chemisorpcia	OH ⁻ iónov na
H ⁺ iónov na	prenos náboja	kovový atóm
oxoväzby		adsorpcia aniónov
chemisorpcia		
vody		
povrchová		
rekonštrukcia		

a) Veľmi dobrá zhoda medzi teóriou a experimentom bola zistená v týchto prípadoch:

$n_T = 0,5$; $0,46 \leq n_E \leq 0,53$: MgO(HCl), BeO(HCl), MnO (H₂SO₄), Cr₂O₃(HClO₄)

$n_T = 0,6$; $0,58 \leq n_E \leq 0,59$: Fe₂O₃(H₂SO₄, H₃PO₄)

$n_T = 0,67$; $0,68 \leq n_E \leq 0,7$: BeO(H₂SO₄)

$n_T = 1,0$; $1 \leq n_E \leq 1,06$: BeO(HCl, H₂SO₄, C₂H₂O₄), Fe₂O₃(HF)

Napríklad na základe porovnania hodnôt n_E , zistených experimentálne pri štúdiu rozpúšťania Fe₂O₃ v H₂SO₄ a H₃PO₄ ($n_E = 0,58–0,59$), s teoretickými hodnotami n_T ($n_T = 0,6$) je možné jednoznačne priradiť rýchlosť určujúci krok – protonáciu povrchových aniónov kyslíka, O²⁻_(s) + H⁺_(aq) → OH⁻_(s) (Vermilyea). Podobne, hodnoty $n_E = 1,06 \approx n_T = 1$ určené pre rozpúšťanie Fe₂O₃ v HF naznačujú, že riadiacim dejom je jednostupňová protonácia O²⁻, O²⁻_(s) + 2H⁺_(aq) → H₂O_(s) (Diggle). Pri rozpúšťaní BeO v H₂SO₄ prichádza na základe hodnôt $n_E = 0,68–0,7 \approx n_T = 0,67$ do úvahy ako riadiaci dej protonácia povrchových hydroxylových skupín, OH⁻_(s) + H⁺_(aq) → H₂O_(s) (Vermilyea).

Hoci sú experimentálne výsledky vo väčšine uvádzaných prípadov v súlade s teóriou, v niektorých prípadoch nie sú predpovede kinetických teórií jednoznačné. Napríklad pre $n_E \approx 0,5$ alebo $n_E \approx 1$ sú rôznymi teóriami priradené rovnakej hodnote n_E viaceré možné riadiace deje:

$n_E \approx 0,5$: Pre oxidy typu MO (MgO, BeO, MnO) môže prichádzať do úvahy ako riadiaci dej buď povrchová hydroxylácia O²⁻_(s) + H⁺_(aq) → OH⁻_(s) (Vermilyea) alebo protonácia povrchových hydroxylových skupín OH⁻_(s) + H⁺_(aq) → H₂O_(s) (Diggle), prípadne podpovrchová penetrácia protónov tuhou fázou (Gorichev).

V prípade Cr₂O₃ môže byť rýchlosť určujúcim dejom protonácia povrchových hydroxylových skupín (Diggle) alebo penetrácia protónov pod povrch tuhej fázy (Gorichev).

$n_E \approx 1$: Rozpúšťanie oxidov typu MO (BeO) môže riadiť buď odstraňovanie kationov M²⁺ z povrchu oxidu (Diggle) alebo jednostupňová (priama) protonácia O²⁻, O²⁻_(s) + 2H⁺_(aq) → H₂O_(s) (Diggle, Vermilyea).

Tabuľka IV

Porovnanie teoretických a experimentálnych hodnôt smernice n závislosti $\log j = f(\ln a_{H^+})$

n_T	názov teórie	Teória		príklad	Experiment						
		platnosť pre oxidy typu	riadiaci dej		$n_E(-)$	E (kJ mol ⁻¹)					
0	Diggle	všetky	$O^{2-}(s) + H^+(aq) \rightarrow OH^-(s)$	–	–	–					
1/3	Vermilyea	M ₂ O	$O^{2-}(s) + H^+(aq) \rightarrow OH^-(s)$	–	–	–					
1/2	Vermilyea	M ₂ O	$OH^-(s) + H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	–	–	–					
	Diggle	M ₂ O	odstraňovanie kationov M ⁺	–	–	–					
	Vermilyea	MO	$O^{2-}(s) + H^+(aq) \rightarrow OH^-(s)$	MgO (HCl)	0,47 [21]; 0,48 [31]	72 [3];					
				MgO (HNO ₃)	0,49 [11]						
				BeO (HCl)	0,47–0,53 [3]						
				MnO (H ₂ SO ₄)	0,5 [3]						
				NiO (HCl)	0,6±0,1 [3]						
					Diggle		všetky	$OH^-(s) + H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	MgO (HCl)	0,47 [21]; 0,48 [31]	72 [3]
									MgO (HNO ₃)	0,49 [11]	
									BeO (HCl)	0,47–0,53 [3]	
									Al ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,41 [32]	
									MnO (H ₂ SO ₄)	0,5 [3]	
									NiO (HCl)	0,6±0,1 [3]	
									Cr ₂ O ₃ (HClO ₄)	0,46 [3]	
									Ni ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,5±0,2 [3]	
									Ni ₂ O ₃ (HCl)	0,6±0,1 [3]	
Fe ₂ O ₃ (HCl)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (HClO ₄)	0,5–0,6 [3]										
	Gorichev	všetky	podpovrchová penetrácia protónov tuhou fázou			MgO (HCl)			0,47 [21]; 0,48 [31]	72 [3];	
				MgO (HNO ₃)	0,49 [11]						
				BeO (HCl)	0,47–0,53 [3]						
				MnO (H ₂ SO ₄)	0,5 [3]						
				Al ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,41 [32]						
				Cr ₂ O ₃ (HClO ₄)	0,46 [3]						
				NiO (HCl)	0,6±0,1 [3]						
				Ni ₂ O ₃ (HCl)	0,6±0,1 [3]						
				Ni ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,5±0,2 [3]						
				Fe ₂ O ₃ (HCl)	0,5–0,6 [3]						
				Fe ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,5–0,6 [3]						
				Fe ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,5–0,6 [3]						
				Fe ₂ O ₃ (HClO ₄)	0,5–0,6 [3]						
				3/5	Vermilyea	M ₂ O ₃	$O^{2-}(s) + H^+(aq) \rightarrow OH^-(s)$	α-Fe ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,65 [3]		53,6 [3]; 91,6 [3]
Fe ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,58 [3]										
Fe ₂ O ₃ (H ₃ PO ₄)	0,59 [3]										
Fe ₂ O ₃ (HCl)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (HNO ₃)	0,5–0,6 [3]										
Fe ₂ O ₃ (HClO ₄)	0,5–0,6 [3]										
41,8 [3]; 90,4 [3]; 95,8 [3]; 113 [3]											
2/3	Vermilyea	M ₂ O	$O^{2-}(s) + 2H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	–	–	–					
	Vermilyea	MO	$OH^-(s) + H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	BeO (H ₂ SO ₄) NiO (HCl)	0,68–0,7 [3] 0,6±0,1 [3]	72 [3]					
	Vermilyea	MO ₂	$O^{2-}(s) + H^+(aq) \rightarrow OH^-(s)$	–	–	–					
3/4	Vermilyea	M ₂ O ₃	$OH^-(s) + H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	Ni ₂ O ₃ (HCl)	0,6±0,1 [3]	70,3 [3]					
4/5	Vermilyea	MO ₂	$OH^-(s) + H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	–	–	–					
1	Vermilyea	MO	$O^{2-}(s) + 2H^+(aq) \rightarrow H_2O(s)$	BeO (HCl)	1 [3]	54,4 [3]; 96,2 [3]					
				BeO (H ₂ SO ₄)	1 [3]						
				BeO (C ₂ H ₂ O ₄)	1 [3]						
				NiO (H ₂ SO ₄)	1±0,1 [3]						
				NiO (HNO ₃)	1±0,1 [3]						
				CuO (H ₂ SO ₄)	1±0,1 [3]						

Pokračovanie tabuľky IV

n_T	Teória			Experiment		
	názov teórie	platnosť pre oxidy typu	riadiaci dej	priklad	$n_E (-)$	E (kJ mol ⁻¹)
	Diggle	MO	odstraňovanie katiónov M ²⁺	BeO (HCl) BeO (H ₂ SO ₄) BeO (C ₂ H ₂ O ₄) NiO (H ₂ SO ₄) NiO (HNO ₃) CuO (H ₂ SO ₄)	1 [3] 1 [3] 1 [3] 1±0,1 [3] 1±0,1 [3] 1±0,1 [3]	54,4 [3]; 96,2 [3]
	Diggle	všetky	O ²⁻ (s) + 2H ⁺ (aq) → H ₂ O(s)	BeO (HCl) BeO (H ₂ SO ₄) BeO (C ₂ H ₂ O ₄) NiO (H ₂ SO ₄) NiO (HNO ₃) CuO (H ₂ SO ₄) Fe ₂ O ₃ (HF) Ni ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄) Ni ₂ O ₃ (HNO ₃)	1 [3] 1 [3] 1 [3] 1±0,1 [3] 1±0,1 [3] 1±0,1 [3] 1,06 [3] 1±0,1 [3] 1±0,1 [3]	54,4 [3]; 96,2 [3] 51,5 [3] 143,5 [3]
6/5	Vermilyea	M ₂ O ₃	O ²⁻ (s) + 2H ⁺ (aq) → H ₂ O(s)	–	–	–
4/3	Vermilyea	MO ₂	O ²⁻ (s) + 2H ⁺ (aq) → H ₂ O(s)	–	–	–
3/2	Diggle	M ₂ O ₃	odstraňovanie katiónov M ³⁺	–	–	–
2	Diggle	MO ₂	odstraňovanie katiónov M ⁴⁺	–	–	–
žiadna z uvedených teórií:				MgO(HCl,HClO ₄)	-0,05 [8]	
				MgO (HCl)	-0,1–(-0,2) [9]	58–64 [9]
				Mn ₂ O ₃ (H ₂ SO ₄)	-0,5 [3]	78,7[3]
				BeO (HNO ₃)	0,17 [32]	
				Fe ₂ O ₃ (HCl)	1,94 [3]	41,8 [3]; 90,4 [3]; 95,8 [3]; 113 [3]
				Fe ₂ O ₃ (HCl)	2 [3]	41,8 [3]; 90,4 [3]; 95,8 [3]; 113 [3]
				Fe ₂ O ₃ (HCl)	2,4 [3]	41,8 [3]; 90,4 [3]; 95,8 [3]; 113 [3]
				MnO (H ₂ SO ₄)	2 [3]	

b) Zhoda medzi teóriou a experimentom v rámci chyby merania:

Zdrojom neurčitosti pri určovaní RDS môžu byť:

- rozdielne predstavy o fyzikálnej podstate procesu, na základe ktorých boli odvodené modelové vzťahy pre jednotlivé teórie;
- presnosť odhadu hodnôt modelových parametrov vo vzťahoch (24), (26), (27) a (29);
- presnosť experimentálnej metódy použitej pre meranie rýchlosti rozpúšťania.

Napríklad pre rozpúšťanie Fe₂O₃ v rôznych kyselinách (HCl, H₂SO₄, HNO₃, HClO₄) boli namerané hodnoty n_E v intervale od 0,5 do 0,6, čo zodpovedá predpovediam teórie Digglea, Goricheva ($n_T = 0,5$) ako aj Vermilyea ($n_T = 0,6$). Hodnoty n_E blízke 0,5 napovedajú, že riadiacim dejom môže byť buď reakcia povrchových OH⁻ skupín s H⁺ iónmi za vzniku vody (Diggle) alebo prenikanie protónov tuhou fázou (Gorichev). Naopak hodnoty n_E blízke 0,6 zodpovedajú povrchovej hydroxylácii, O²⁻(s)+H⁺(aq) → OH⁻(s) (Vermilyea). Významný rozptyl experimentálnych hodnôt môže viesť k situácii, kedy nie je možné spoľahlivo zvoliť žiadnu z teórií. Napríklad pri roz-

púšťaní Ni₂O₃ v H₂SO₄ bola určená hodnota smernice $n_E = 0,5 \pm 0,2$. V takom prípade môže riadiacu úlohu zohrávať niektorý z dejov, ktoré podľa teórií prichádzajú do úvahy pre oxidy typu M₂O₃ v rozsahu $0,5 \leq n_T \leq 0,7$.

V prípade rozpúšťania MgO v HCl (cit.²¹) autor označil za riadiaci dej protonáciu povrchových hydroxylových skupín, OH⁻(s) + H⁺(aq) → H₂O(s) (Vermilyea, $n_T = 0,67$) aj napriek tomu, že experimentálne určená hodnota $n_E = 0,47$ bola výrazne nižšia – rozdiel zdôvodnil nespoľahlivosťou odhadu hodnôt modelových parametrov α_+ , α_- vo vzťahu (24).

Rozmanitosť riadiacich dejov pre jednotlivé oxidy je pravdepodobne zapríčinená tým, že rôzni autori študovali rovnaký (?) oxid pri rôznych reakčných podmienkach. Zaujímavé sú z tohto pohľadu rozdiely v publikovaných hodnotách aktivačných energií – v jednotlivých prípadoch sa pohybujú aj v rozsahu niekoľkých desiatok kJ mol⁻¹ (napr. pre Fe₂O₃ (HCl): $E = 41,8$ kJ mol⁻¹ až 113 kJ mol⁻¹ (cit.³)). Pri práci s publikovanými údajmi je preto potrebné zohľadniť ich spojitost' s reakčnými podmienkami.

4. Nesúlady medzi teóriou a experimentom:

a) Pre rozpúšťanie Fe₂O₃ v HCl bol publikovaný rad vý-

sledkov ($1,94 \leq n_E \leq 2,4$), ktoré významne prevyšujú maximálnu teoretickú hodnotu n_T (1,5 pre trojmočné oxidy). Úvahy o mechanizme sa v takomto prípade môžu prikloniť k Diggleovej teórii riadenia odstraňovaním katiónov M^{3+} z povrchu oxidu ($n_T = 1,5$) s tým, že rozdiel sa buď pripíše hrubým experimentálnym chybám alebo nepresnému odhadu hodnôt modelových parametrov (napr. hodnoty α_+ vo vzťahu (26)).

- b) Experimentálne bola zistená existencia režimov chemického rozpúšťania oxidov, pre ktoré je charakteristická záporná hodnota n_E . K objavu neočakávaného správania oxidov viedlo najmä systematické štúdium rozpúšťania jednotlivých oxidov v širokom intervale reakčných podmienok. Pokles rýchlosti rozpúšťania s rastúcou koncentráciou kyseliny bol pozorovaný napríklad pri rozpúšťaní Mn_2O_3 v H_2SO_4 (cit.³) a MgO v HCl (cit.⁹). Nakoľko všetky známe teórie predpovedajú kladnú hodnotu smernice n_T , záporné hodnoty otvárajú nový priestor pre analýzu výsledkov a teoretickú interpretáciu doposiaľ nevysvetleného správania oxidov.

4. Záver

Pre chemické rozpúšťanie oxidov v kyslých roztokoch je charakteristická rozmanitosť riadiacich dejov. Popri experimentálnych výsledkoch, ktoré sú viac alebo menej kompatibilné s teóriou, sa však objavuje aj celý rad režimov, ktoré sa nedajú s pomocou jestvujúcich kinetických teórií vysvetliť. Tieto skutočnosti naznačujú, že formulovanie všeobecných zákonitostí, ktorými sa procesy riadia, si vyžadujú tak kritické prehodnotenie teórií, ako aj dôkladné experimentálne štúdium rozpúšťania jednotlivých oxidov v širokom intervale reakčných podmienok.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV (granty 1/0393/03 a 1/0350/03).

Zoznam použitých symbolov a skratiek

An^{y-}	anión
a	aktivita potenciál určujúcich iónov v Helmholtzovej vrstve
a_0	aktivita potenciál určujúcich iónov v Helmholtzovej vrstve v izoelektrickom bode
a_{H^+}	aktivita H^+ iónov
$a_{H^+, eq}$	rovnovážna aktivita H^+ iónov
c	koncentrácia roztoku soli [$mol\ dm^{-3}$]
c_{nas}	koncentrácia nasýteného roztoku soli [$mol\ dm^{-3}$]
c_S	koncentrácia iónov uvoľnených z povrchu oxidu [$mol\ dm^{-3}$]
c_{H^+}	koncentrácia H^+ iónov [$mol\ dm^{-3}$]
c_{Mz^+}	koncentrácia kovových katiónov [$mol\ dm^{-3}$]
D	koeficient difúzie [$m^2\ s^{-1}$]
E	zdanlivá aktivačná energia [$J\ mol^{-1}$]
F	Faradayova konštanta [$C\ mol^{-1}$]

j	intenzita toku [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
j_+, j_-	intenzita toku iónov [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
j_i	intenzita toku iónov i [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
j_D	rýchlosť difúzie [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
Kat^{z+}	katión
k_+, k_-	rýchlostné parametre v rovnici (16) a (17) [$mol\ s^{-1}$]
k_-	rýchlostná „konštanta“ vo vzťahu (21) [$mol\ s^{-1}$]
k_E	rýchlostná konštanta vo vzťahu (15) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
k_G	rýchlostná konštanta vo vzťahu (29) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
k_P	rýchlostná konštanta vo vzťahu (30) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
k_{ST}	rýchlostná konštanta vo vzťahu (32) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
k_V	rýchlostná konštanta vo vzťahu (31) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
M^{z+}	kovový katión
m	poriadok v rovnici (32) totožný s mocenstvom kovového iónu
n	zdanlivý poriadok celkovej povrchovej reakcie definovaný (24): $n = d \log j / d \log a_{H^+}$
n_+, n_-	počet iónov prislúchajúcich na jednotku plochy fázového rozhrania [m^{-2}]
p	počet protónov prenášaných v reakcii (18), (19) alebo (20)
pMg	záporný dekadický logaritmus aktivity Mg^{2+} iónov
R	plynová konštanta = $8,314\ [J\ mol^{-1}\ K^{-1}]$
r	rýchlosť rozpúšťania tuhej látky (oxidu) [$mol\ m^{-2}\ s^{-1}$]
T	teplota [K]
z_+, z_-	mocenstvo iónov
z_i	mocenstvo iónu i

Grécke symboly:

α_+, α_-	podiel, ktorý charakterizuje mieru vplyvu potenciál určujúcich iónov
δ	hrúbka difúznej vrstvy [m]
μ_+, μ_-	chemický potenciál iónov [$J\ mol^{-1}$]
ϕ_H	potenciál vonkajšej Helmholtzovej roviny [V]
ϕ_S	potenciál na povrchu tuhej fázy [V]
$\Delta\phi$	potenciálový rozdiel ($\Delta\phi = \phi_S - \phi_H$) [V]

LITERATÚRA

- Blesa M. A., Morando P. J., Regazzoni A. E.: *Chemical Dissolution of Metal Oxides*. CRC Press, Florida 1994.
- Nowotny J., Dufour L. C. (ed.): *Surface and Near-Surface Chemistry of Oxide Materials*. Elsevier, Amsterdam 1988.
- Gorichev I. G., Kyprianov N. A.: Russ. Chem. Rev. 53, 1039 (1984).
- Vermilyea D. A.: J. Electrochem. Soc. 113, 1067 (1966).
- Diggle J. W. (ed.): *Oxides and Oxide Films*. Marcel Dekker, New York 1973.
- Warren I. H., Devuyt E.: *International Symposium on Hydrometallurgy: Leaching of metal oxides, Chicago, 25 March 1973*, Book of Abstract (Evans D. J. I., Shohemaker R. S., ed.), str. 229. The American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers Inc., New York 1973.

7. Stumm W.: *Aquatic Surface Chemistry*. John Wiley&Sons, New York 1987.
8. Jones C. F., Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: Proc. Roy. Soc. Lond. A 374, 141 (1981).
9. Raschman P., Fedoročková A.: Hydrometallurgy 71, 403 (2004).
10. Sohn H. Y, Wadsworth M. E.: *Rate Processes of Extractive Metallurgy*. Plenum Press, New York 1979.
11. Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: J. Chem. Soc. Faraday I 74, 2907 (1978).
12. Fruhwirth O., Herzog G. W., Hollerer I., Racetti A.: Surf. Technol. 24, 301 (1985).
13. Erbse H., Hauffe K., Range J.: Z. Phys. Chem. N. F. 74, 248 (1971).
14. Arnison B. J., Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: J. Chem. Soc. Faraday I 77, 535 (1981).
15. Jones C. F., Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: J. Chem. Soc. Faraday I 74, 1615 (1978).
16. Monhemius A. J., Katunga G.: Chem. React. Eng. 87, 635 (1984).
17. Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: Chem. Austral. 49, 241 (1982).
18. Jones C. F., Reeve R. A., Rigg R., Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: J. Chem. Soc. Faraday I 80, 2609 (1984).
19. Gorichev I. G., Kyprianov N. A.: Zhur. Fiz. Khim. 55, 1558 (1981).
20. Jones C. F., Segall R. L., Smart R. St. C., Turner P. S.: J. Mat. Sci. Letts 3, 810 (1984).
21. Vermilyea D. A.: J. Electrochem. Soc. 116, 1179 (1969).
22. Koch G.: Phys. Chem. 69, 141 (1965).
23. Simkovitch G., Wagner J. B.: J. Electrochem. Soc. 110, 513 (1963).
24. Ashkharua F. G., Gorichev I. G., Klyuchnikov N. G., Kyprianov N. A.: Zhur. Fiz. Khim. 52, 1560 (1978).
25. Seo M., Sata N.: Bashoku Gijutsu 44, 399 (1975).
26. Frenier W. M., Growcock F. B.: Corrosion - NACE 40, 663 (1984).
27. Gorichev I. G., Kyprianov N. A.: Russ. J. Phys. Chem. 53, 508 (1979).
28. Seo M., Furiuchi R., Okamoto G., Sato N.: Trans. Jap. Inst. Metals 16, 519 (1975).
29. Fruhwirth O., Herzog G. W., Poullos J.: Surf. Technol. 24, 293 (1985).
30. Atwood J. D.: *Inorganic and Organometallic Reaction Mechanisms*. Brooks/Cole, Monterey 1985.
31. Jordan G., Higgins S. R., Eggleston C. M.: American Mineralogist 84, 144 (1999).
32. Wieland E., Wehrli B., Stumm W.: Geochim. Cosmochim. Acta 52, 1969 (1988).

A. Fedoročková^a and P. Raschman^b (^a*Department of Chemistry*, ^b*Department of Ceramics, Faculty of Metallurgy, Technical University, Košice*): **Kinetics of Chemical Dissolution of Oxides: Comparison of Theory and Experiment**

The mechanism of chemical dissolution of oxides in aqueous solutions of acids has been the subject of significant interest during the last three decades. The reactivity and dissolution behaviour of oxides is crucial for a wide variety of processes including, e.g, hydrometallurgy, corrosion of oxide materials, geochemical processes, catalysis, environmental processes or drug design. In the theoretical study of the mechanism of the process, electrochemical, colloid-science and surface-science approach have been used. Current electrochemical theories assume that dissolution rates are controlled by solid-liquid interaction in the interphase region, predicting their inverse exponential dependence on solution pH. The colloid-science approach explains the dissolution of oxides by ionic adsorption at the oxide/solution interface. The surface-science approach is based on the categorisation of oxides into groups (ionic, covalent, semiconducting), characterized by bulk and surface defects and structural changes in both regions. General principles that govern the kinetics of the dissolution of oxides, are not sufficiently known. A major difficulty is that no single oxide was extensively studied and the range of the conditions for the individual oxides studied varies. Very often, the rate-controlling step cannot be determined at all. There are also the regimes that could not be explained by existing kinetic theories. This study treats theoretical aspects of the dissolution from the oxide type viewpoint, brings a review of the existing kinetic theories, classifies the published experimental data and shows discrepancies between theory and experiment, which seem to be worth detailed analysis.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POROVNANIE VYPAROVACIEHO PROCESU V NERIADENOM D.C. OBLÚKU V KLASICKEJ SPEKTROGRAFII A RIADENOM D.C. OBLÚKU V OPTICKEJ SPEKTROMETRII PRI ANALÝZE NIEKTORÝCH VYBRANÝCH ENVIRONMENTÁLNE RELEVANTNÝCH PRVKOV

SILVIA RUŽIČKOVÁ, JOLANA BAJUSZOVÁ, MIKULÁŠ MATHERNY a LADISLAV KOLLER

*Katedra chémie, Hutnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Letná 9, 042 00 Košice, Slovenská republika
silvia.ruzickova@tuke.sk*

Došlo 13.7.05, prepracované 20.11.05, prijaté 5.1.06.

Kľúčové slová: spektrometria, spektrografia, DC oblúk, riadený DC oblúk, environmentálna analýza

Úvod

Budenie v oblúku jednosmerného prúdu (DC) predstavovalo počas celej histórie atómovej spektroskopie hlavnú techniku pre priamu analýzu práškových vzoriek, prednostne v špeciálnej oblasti geochemických analýz, neskôr aj pri analýze vzoriek environmentálneho charakteru. Táto spočiatku semikvantitatívna metóda sa po mnohých optimalizáciách a kvantifikáciách¹ stala rýchlou a najviac používanou mnohoprvkovou kvantitatívnou metódou. Neskoršia optimalizácia vyhodnocovania fotograficky registrovaných spektier¹ viedla k dosiahnutiu presnosti od 5 až 20 %, s relatívne nízkou hodnotou hranice dôkazu. Taktiež sa vyvíjali a zdokonaľovali niektoré modifikácie jednosmerného oblúka, ako napr. využitie stacionárneho magnetického poľa², nehomogénneho magnetického poľa³ a metóda dvojitej plazmy⁴. Takisto techniky kontinuálneho vnášania vzorky sa úspešne rozvíjali a používali pri analýze práškových vzoriek.

Neriadený jednosmerný oblúk v tzv. klasickej DC spektrografii a časovo náročné vyhodnocovanie spektra sú nahradené moderným a počítačom riadeným oblúkom, ktorý je prostredníctvom optického kábla napojený na mnohokanálový spektrometer.

Cieľom tejto práce bolo porovnať vyparovacie schopnosti dvoch optických metód: klasickú DC spektrografiu

a „novú“ spektrometrickú tandemovú techniku s riadeným oblúkom jednosmerného prúdu, kde je vyparovanie separované od budenia. Vyparovanie prebieha v cele pre produkciu aerosolu, odkiaľ sú pary analytu unášané plynom a následne vnášané do plazmy Marinkovičovho plazmového zdroja, kde nastáva ich budenie. Intenzita prúdu pre vyparovanie je programovateľná a riadená počítačom. Na druhej strane, pri klasickej spektrografii prebieha vyparovanie a budenie súčasne.

Prezentované metódy boli použité pre analýzu niektorých vybraných, environmentálne dôležitých prvkov (Al, Cr, Ni, V). Špeciálna pozornosť bola venovaná štatistickému vyhodnoteniu základných hodnotiacich parametrov ako sú: aritmetický priemer ($\bar{I}(x)$), štandardná odchýlka ($s(\bar{I})_x$), relatívna štandardná odchýlka ($s(\bar{I})_{x,r}$), medián ($\tilde{I}(x)$), modus ($\hat{I}(x)$), polosuma ($\tilde{I}(x)_p$), rozpätie (ΔI), špicatosť ($E(x)$) a šikmosť ($A(x)$), ktoré charakterizujú presnosť, normalitu a homogenitu distribúcie jednorozmerných vstupných údajov.

Experimentálna časť

Spektrografická metóda

Experimenty boli uskutočnené na mriežkovom spektrografe PGS-2. Budenie vzorky a registrácia spektier prebiehala za podmienok uvedených v tabuľke I. Hlavné parametre vybraných prvkov a použité spektrálne čiary udáva tabuľka II. Pre experimenty bola použitá modelová zmes pripravená zo spektrálne čistých oxidov Al, Cr, Ni a V (J. Mathey, London), o koncentracii 0,1 % a 1 % každého prvku v zmesi oxidov a spektrálne čistého grafitového prášku (Elektrokarbon, Topoľčany). Spektrá sa exponovali za použitia difrakčnej mriežky pre 2. poriadok difrakcie. Na odstránenie prípadných prekryvaní s inými poriadkami spektra sa použil aj poriadkový filter s prednostnou priepustnosťou v sledovanej oblasti spektra. Budenie spektier sa uskutočnilo pomocou neriadeného zdroja jednosmerného prúdu (DC) s anodicky zapojenou nosnou elektródou. Počas 90 s expozície a intenzite prúdu 10 A nastalo totálne vyparenie navážky. Pri sledovaní vyparovacieho procesu sa na totožné miesto spektrálnej dosky exponovali tri elektródy.

Po vyvolaní exponovaných spektrálnych dosiek sa merali sčernania týchto spektrálnych čiar denzitometrom 4 D, ktorý je vybavený široko-lineárnym detektorom – ftoodporom. Pre transformovanie hodnôt sčernaní na hodnoty I a I , ako aj pre vypočítanie konštant γ a k fotografickej emulzie sa používali výpočtové programy⁵ pre I -transformáciu podľa Töröka a Zimmera⁶.

Tabuľka I
Experimentálne podmienky (Spektrografia)

<i>Všeobecné a optické podmienky</i>	
Spektrograf	mriežkový, PGS-2, C. Zeiss, Jena
Mriežka	651 vrypov/mm
Spektrálna oblasť	280–330 nm, poriadkový filter č. 101
Druh zobrazenia	trojšošovkové s medzizobrazením otvor medzizobrazovacej clony 3,2 a 5 mm
Šírka štrbiny	20 μm
Výška štrbiny	1 mm
Elektrodový materiál	uhlík (Elektrokarbon Topoľčany, SR)
Fotografická platňa	Banse und Grohmann Fotoplatten, WU-2
Vývojka	R-09
<i>Budiace podmienky</i>	
Budiaci zdroj	neriadený oblúk jednosmerného prúdu
Intenzita prúdu	10 A
Primárne napätie	220 V
Nosná elektróda	SW 380, \varnothing vývrtu 3 mm
Protielektróda	SW 202
Vzdialenosť elektród	4 mm
Navážka vzorky	10 mg
Koncentrácia vzorky	0,1 a 1 % zmes oxidov
Expozičná doba	90 s
Polarita nosnej elektródy	kladná
<i>Vyhodnocovacie podmienky</i>	
Fotometer	4D G-II MFKI
Šírka štrbiny	20 μm
Výška štrbiny	16 mm
Rozsah meraných hodnôt	0–4 S

Tabuľka II
Charakteristika zvolených spektrálnych čiar a ich parametre pre vybrané prvky pre spektrografiu a spektrometriu

Prvok	Oxid	Spektrografia			Spektrometria		
		λ [nm]	E_e [eV]	E_e [kJ]	λ [nm]	E_e [eV]	E_e [kJ]
Al	Al ₂ O ₃	308,216	4,02	388,03	396,152	3,14	303,09
Cr	Cr ₂ O ₃	302,156	5,13	495,17	425,433	2,91	280,89
Ni	NiO	300,249	4,16	401,54	349,296	3,65	352,32
V	V ₂ O ₅	318,540	3,96	382,24	318,540	3,96	382,24

λ - Vlnová dĺžka, E_e – budiaca energia

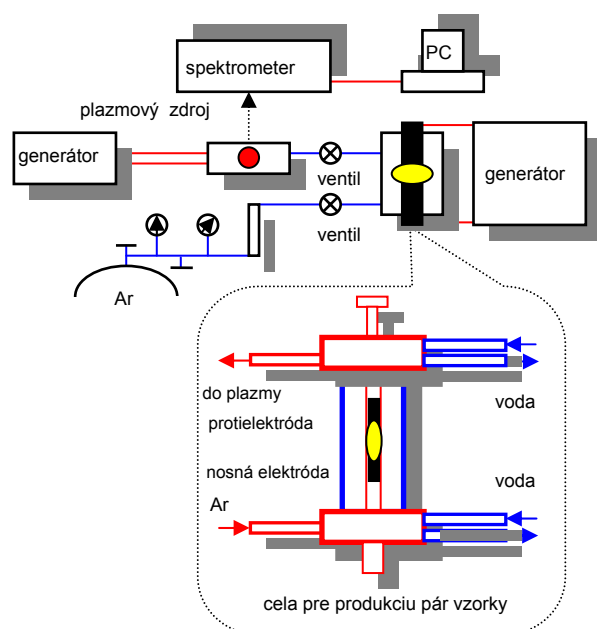
Spektrometrická metóda

Spektrometrická analýza sa vykonala na simultánnom mnohokanálovom spektrometri LECO-750 za experimentálnych podmienok uvedených v tabuľke III. Parametre

študovaných prvkov a použité spektrálne čiary udáva tabuľka II. Merania sa uskutočnili použitím 1% modelovej zmesi oxidov spektrálnej čistoty (J. Mathey, London) spomínaných prvkov a spektrálne čistého grafitového prášku (Elektrokarbon Topoľčany). Vysokočistý argón slúži ako

Tabuľka III
Experimentálne podmienky (Spektrometria)

<i>Všeobecné podmienky</i>	
Spektrometer	LECO – 750
Mriežka	2400 vrypov/mm
Spektrálna oblasť	220–766 nm
<i>Vyparovacie podmienky</i>	
Vyparovací zdroj	programovateľný oblúk jednosmerného prúdu, generátor DCA 301
Intenzita prúdu	10 A
Prietok Ar v cele pre produkciu aerosolu	1,6 dm ³ min ⁻¹
Nosná elektróda	SW 380, Elektrokarbon Topoľčany, SR
Protielektróda	SU 206, Elektrokarbon Topoľčany, SR
Vzdialenosť elektród	1 mm
Navážka vzorky	10 mg
Koncentrácia vzorky	1 % zmes oxidov
Expozičná doba	90 s
<i>Budiace podmienky</i>	
Budiaci zdroj	Marinkovičova plazma
Intenzita prúdu	11 A
Prietok Ar v Marinkovičovej plazme	2,8 dm ³ min ⁻¹
Vzialenosť od stredu plazmy	4 mm
<i>Vyhodnocovacie podmienky</i>	
Program	SPECTRUMAT

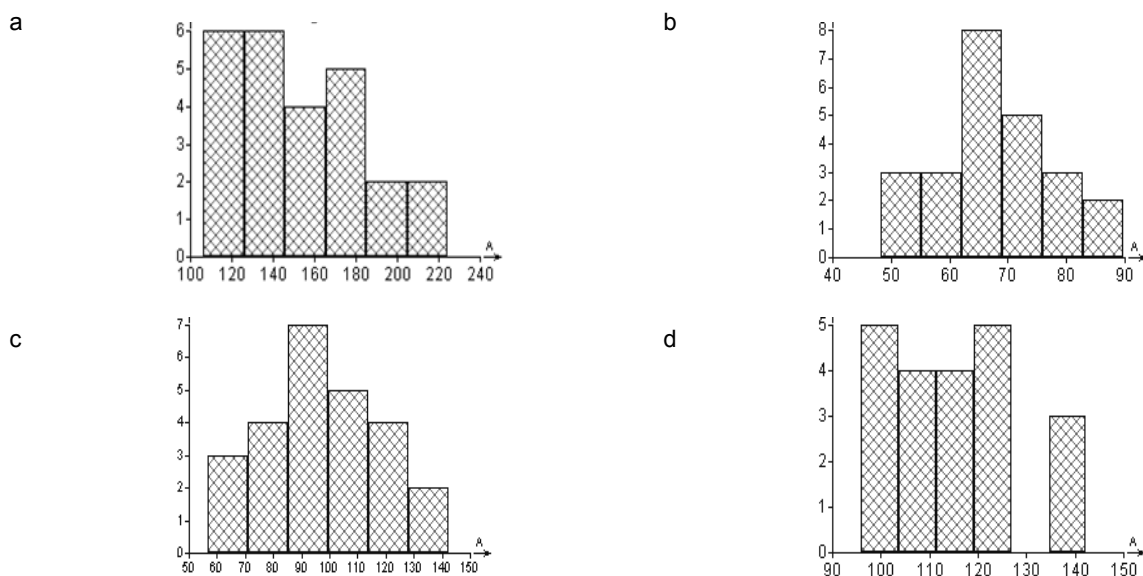


Obr. 1. Schéma experimentálnej aparatury pri spektrálnej analýze

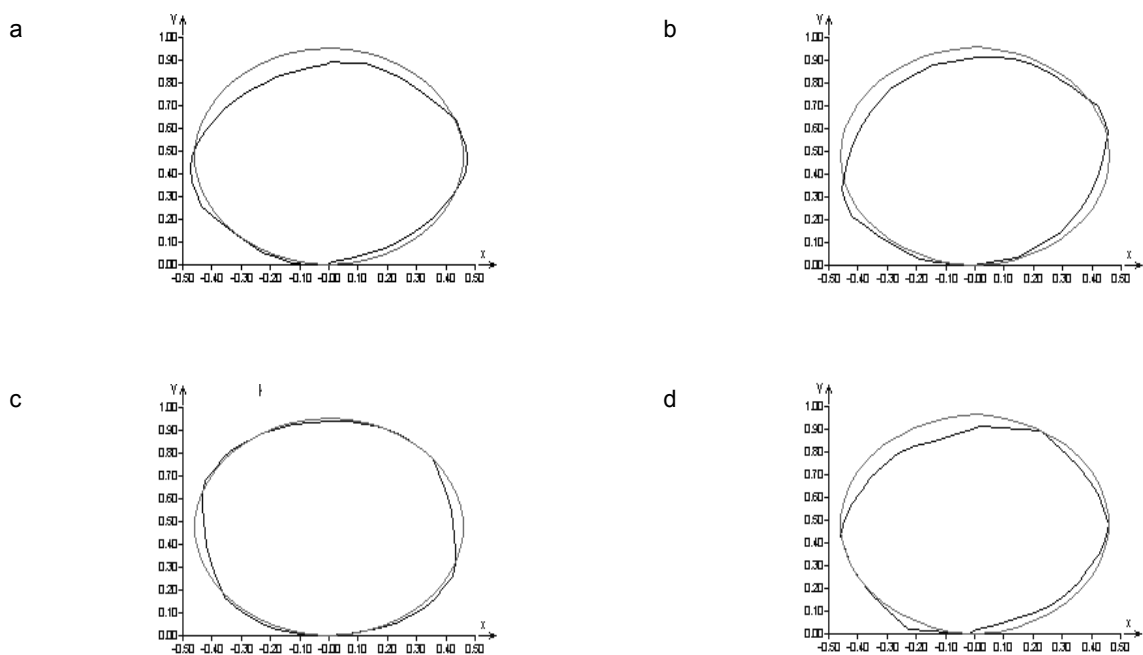
nosný plyn a zároveň aj stabilizuje plazmu. Vyparovanie práškovej vzorky v oblúku jednosmerného prúdu prebieha vo zvlášťnej cele pre produkciu aerosolu. Cela je napojená na programovateľný generátor DCA-301 (cit.⁷), ktorý riadi celý proces vyparovania. Pre sledovanie vyparovania bola kvôli porovnaniu so spektrografiou použitá intenzita prúdu 10 A, hoci zariadenie umožňuje naprogramovať intenzitu prúdu až do 30 A. Pary odparenej vzorky sú tangenciálne unášané prúdom nosného argónu do Marinkovičovho plazmového zdroja⁸, kde dochádza k budeniu atómov sledovaných prvkov. Emitované žiarenie z plazmy, ktoré je registrované vo vzdialenosti $r = 4$ mm od jej stredu, je prostredníctvom optického kábla prenášané na vstupnú štrbinu spektrometra⁹. Získané integrálne intenzity spektrálnych čiar študovaných prvkov boli vyhodnotené pomocou programu SPECTRUMAT. Schéma experimentálnej aparatury je znázornená na obr. 1 (cit.⁹).

Výsledky a diskusia

Hľadanie optimálnych experimentálnych podmienok pre sledovanie vyparovacích pomerov emisného budenia spektier si v prvom rade vyžaduje prieskumovú štatistickú analýzu jednorozmerných vstupných údajov. Z tohto dô-



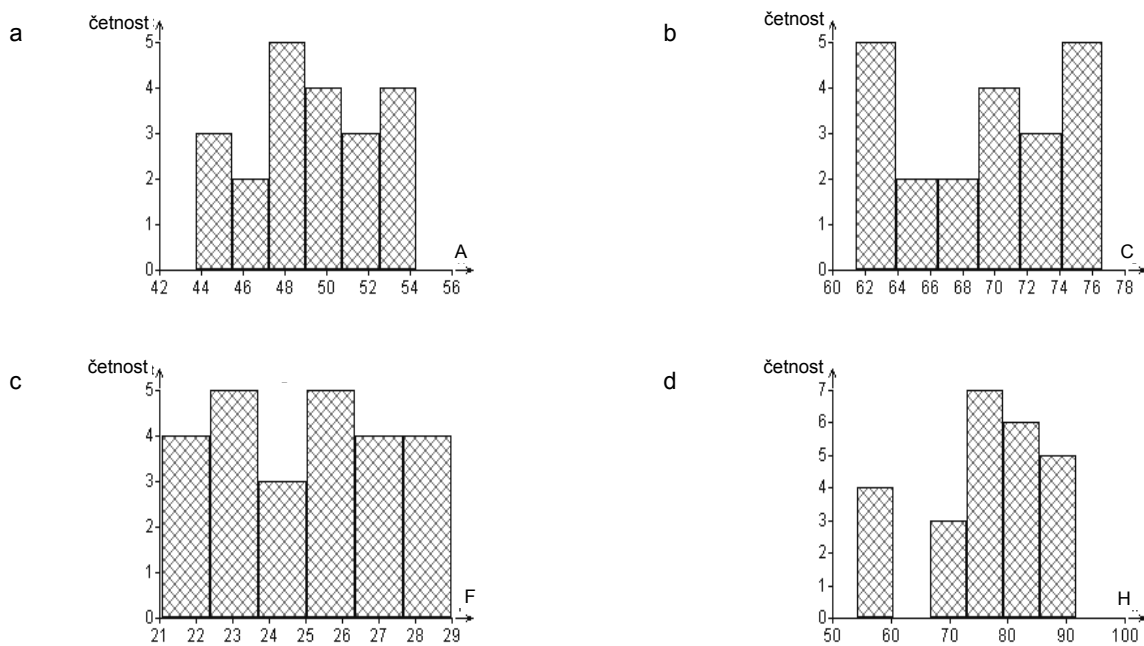
Obr. 2. Histogramy početnosti rozdelenia intenzít pri spektrografii pre zvolené prvky; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V



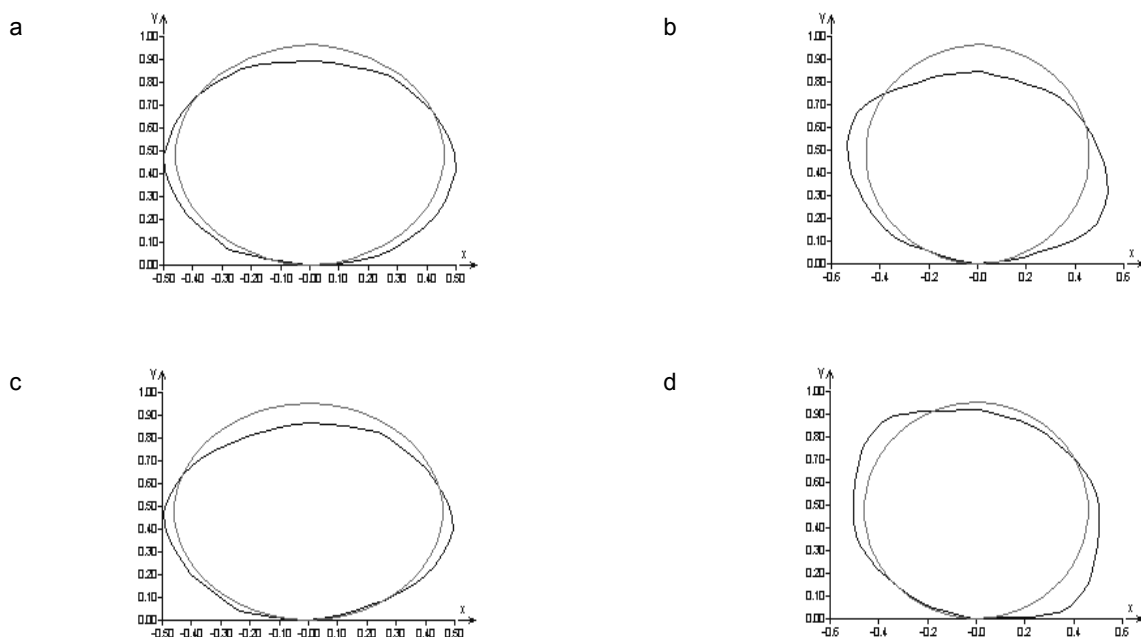
Obr. 3. Kruhové diagramy pri spektrografii pre zvolené prvky; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V

vodu, za účelom zistenia výkonnosti obidvoch spektrálnych analytických metód, bolo uskutočnené 25 násobné opakovanie merania intenzít spektrálnych čiar zvolených prvkov (Al, Cr, Ni a V). Tieto súbory intenzít sa podrobili programom QC. Expert 2.5 (cit.¹⁰)kompletnej štatistickej

analýze. Výsledky tejto analýzy sú uvedené v tabuľke IV. Normovanou metódou programu QC Expert 2.5 sa spočítali histogramy vstupných údajov. V prípade spektrografie histogramy pre Al a V poukazujú na čiastočné zošikmenie smerom k vyšším hodnotám (obr. 2a, 2d), čo potvrdzujú



Obr. 4. Histogramy početnosti rozdelenia intenzít pre zvolené prvky pri spektrometrii; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V

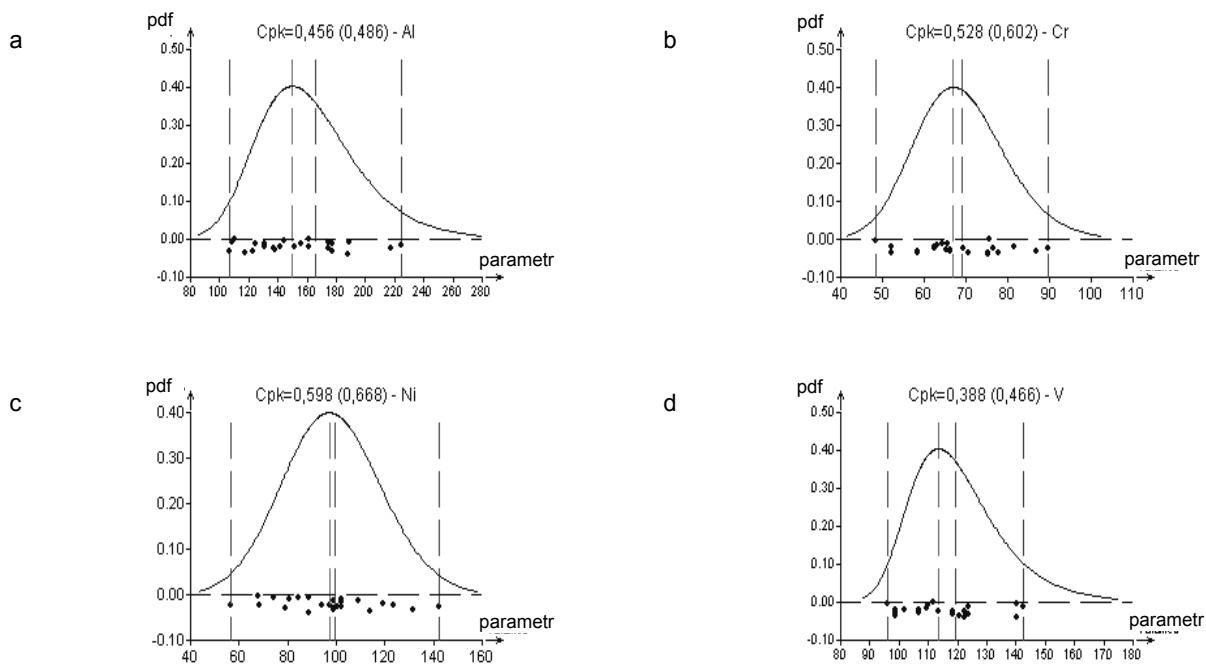


Obr. 5. Kruhové diagramy pri spektrometrii pre zvolené prvky; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V

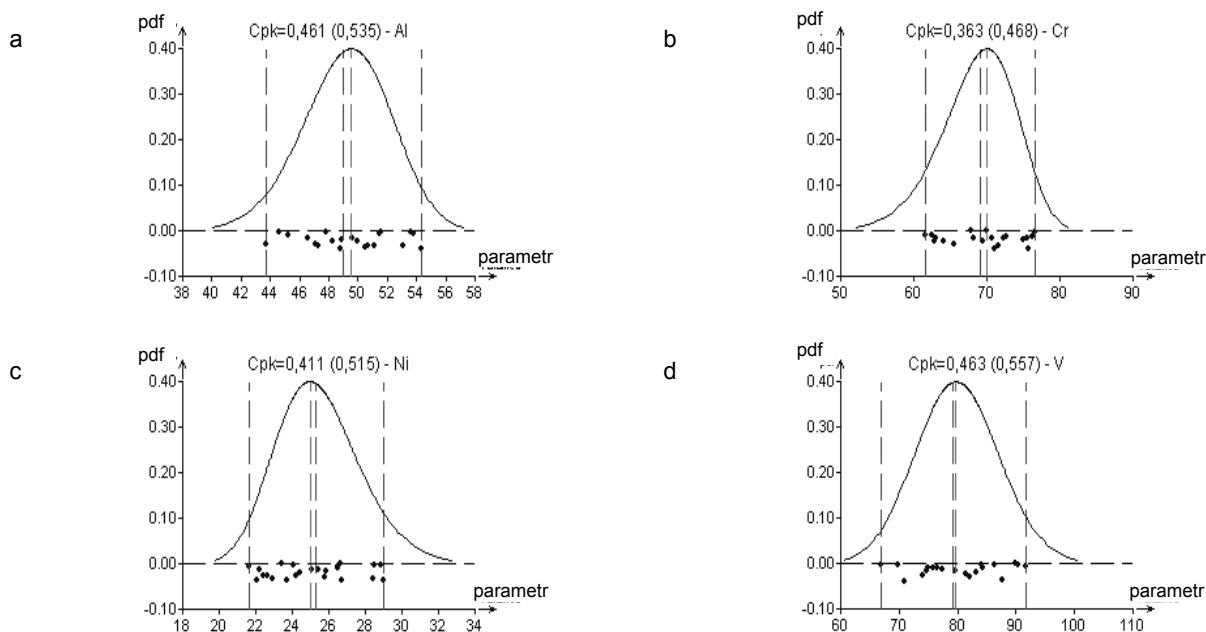
i kruhové diagramy (obr. 3a, 3d). Histogramy u prvkov Cr a Ni (obr. 2b, 2c) vykazovali značnú symetriu, čo potvrdili aj príslušné kruhové diagramy (obr. 3b, 3c), ktoré zohľadňujú aj dosiahnutú šikmosť a špicatosť.

V prípade spektrometrie, histogramy (obr. 4a – 4d)

a kruhové diagramy (obr. 5a – 5d) pre prvky Al, Cr, Ni a čiastočne i V vykazovali iba rovnomerné rozloženie. Prvky Al a Ni (obr. 5a, 5c) vykazovali veľmi dobrú zhodu s teoretickými krivkami kruhových diagramov, čo potvrdzuje symetrické rozloženie vstupných dát okolo aritme-



Obr. 6. Transformovaná hustota pravdepodobnosti rozdelenia intenzít pri spektrografii pre zvolené prvky; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V



Obr. 7. Transformovaná hustota pravdepodobnosti rozdelenia intenzít pri spektrometrii pre zvolené prvky; a – Al, b – Cr, c – Ni, d – V

tického priemeru. Táto zhoda v prípade prvkov Cr a V nie je ale už tak pregnantná (obr. 5b, 5d).

Presnosť stanovenia intenzít analytických spektrálnych čiar je daná dosiahnutými hodnotami RSD. Tieto hodnoty pre aritmetický priemer boli vždy vyššie ako

15 %, čo je prijateľná hodnota pre spektrografické merania. Naproti tomu, hodnoty RSD pre spektrometrické merania sú vždy nižšie ako 10 %, ale vyššie ako 6 %. Vysoké hodnoty RSD pre spektrografické merania sú podmienené nielen individuálnymi prvkovými fluktuáciami intenzít, ale

Tabuľka IV

Výsledky prieskumovej štatistickej analýzy pre spektrometrickú a spektrografickú metódu

Parameter	Parameter	Spektrografia				Spektrometria			
		Al	Cr	Ni	V	Al	Cr	Ni	V
Vlnová dĺžka	l / nm	308,21	302,16	300,25	318,54	396,15	425,43	349,30	318,54
Arit. priemer	$\bar{I}(x)$	153,68	67,60	97,51	115,49	49,43	69,23	24,96	79,83
Štand. odch.	$s(\bar{I})_x$	32,41	10,68	20,37	13,95	3,03	5,19	2,35	7,12
RSD, %	$s(\bar{I})_{x,r}$	21,09	15,80	20,89	12,08	6,13	7,49	9,41	8,92
Medián	$\tilde{I}(x)$	151,15	65,88	98,91	113,26	49,62	70,01	25,08	79,58
Štand. odch.	$s(\tilde{I})_x$	11,044	3,31	3,48	4,03	1,06	2,18	0,78	2,45
RSD / %	$s(\tilde{I})_{x,r}$	7,31	5,02	3,52	3,56	2,14	3,11	3,11	3,08
Modus	$\hat{I}(x)$	146,48	62,70	101,49	109,21	49,96	71,43	25,29	79,13
Polosuma	$\tilde{I}(x)_p$	165,52	69,00	99,45	119,15	49,01	69,03	25,03	79,30
Rozpätie	DI	118,25	41,35	85,49	46,36	10,58	15,22	7,93	24,84
Šikmost' (asymetria)	$A(x)$	0,43	0,25	0,11	0,50	-0,13	-0,14	0,16	0,04
Test šikm.	$t_{A(x)} \neq 0$	N	N	N	N	N	N	N	N
Špicatost' (excess)	$E(x)$	2,47	2,50	2,77	2,41	2,17	1,69	2,00	2,00
Test špicatosti	$t_{E(x)} \neq 3$	N	N	N	N	N	N	N	N
Test norm.	t_{norm}	P	P	P	P	P	P	P	P
Test homog.	t_{horm}	P	P	P	P	P	P	P	P
Box-Cox. T	r	-0,1	0,4	0,9	-0,5	1,0	1,0	0,4	0,8
Oprávnenosť		Nie	Nie	Nie	Nie	Nie	Nie	Nie	Nie

N – nevýznamná; P – prijatá

i nepresnosťami fotografickej registrácie, ako aj samotným komplikovaným vyhodnocovacím postupom. Pomerne výhodnejšie RSD hodnoty spektrometrických meraní sú dané tým, že sa jedná o tzv. fotoelektrické registrovanie rozloženého žiarenia. Napriek tomu sú hodnoty RSD vyššie ako je to pri tomto spôsobe detekcie žiarenia zaužívané. Túto skutočnosť možno pripísať komplikovanému prívodu pár analytu do budenej plazmy. Hodnoty RSD pre medián sú pre obidve metódy systematicky nižšie ako pre aritmetický priemer, čo je však pochopiteľné, pretože medián neberie ohľad na extrémne vybočujúce hodnoty.

Ďalšie štatistické hodnotenie sa zameralo na hodnotenie zhody aritmetického priemeru $\bar{I}(x)$, mediánu $\tilde{I}(x)$, modusu $\hat{I}(x)$ a polosumy $\tilde{I}(x)_p$. Pri tom sa nebrala do úvahy štandardná odchýlka aritmetického priemeru a mediánu. Pre spektrografiu a pre prvky Al, Cr a V je typické, že vyššie uvedené hodnotiace parametre vykazujú nasledovnú postupnosť: aritmetický priemer > medián > modus. Táto postupnosť, čiže výberová charakteristika, poukazuje na čiastočné zošikmenie rozdelenia smerom k nižším hodnotám, čo znamená už čiastočné porušenie symetrie. Týmto zošikmením sa súbor približuje k lognormálnemu rozložению. Jedine u Ni možno pozorovať čiastočnú zmenu postupnosti: modus > medián > aritmetický priemer. Táto

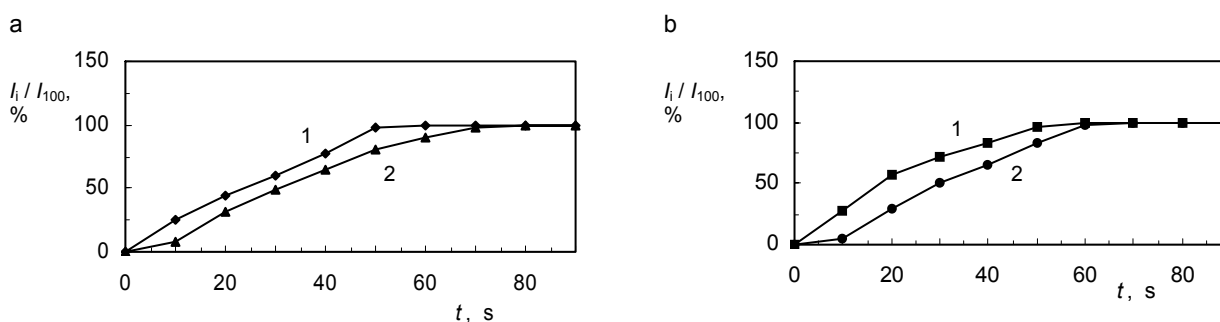
postupnosť poukazuje na čiastočné zošikmenie smerom k vyšším hodnotám výberových charakteristík, čo je typické pre asymetrické rozloženie. Pre spektrometriu a prvky Al, Cr a Ni je typická nasledovná postupnosť výberových charakteristík: aritmetický priemer < medián < modus. Táto postupnosť je už dominantná. Čiastočnú výnimku tvorí prvok V s postupnosťou: modus < medián < aritmetický priemer, čo naznačuje zmenu charakteru rozloženia.

Test šikmosti vo všetkých prípadoch potvrdil štatistickú zhodu šikmosti s nulou ($A(x) = 0$) a zhody špicatosti s trojkou ($E(x) = 3$), čo je približne optimálna hodnota¹¹ pre normálne rozloženie vstupných dát a počet meraní $N \geq 20$. Nakoniec test normality a homogenity potvrdil prijatie týchto dvoch kritérií. Box.-Coxova transformácia vyvrátila opodstatnenosť použitia tejto transformácie pre štúdium normálneho rozloženia. Napriek tomu sa pri spektrografii iba pre prvky Cr a Ni dosiahlo ideálne symetrické rozloženie (obr. 6b, 6c). V prípade prvkov Al a V (obr. 6a, 6d) sa už dosiahli asymetrické rozloženia veľmi podobné lognormálnym rozložением. V prípade spektrometrie sa dosiahli skoro ideálne symetrické rozloženia (obr. 7a – 7d) typické pre normálne rozloženie. Gausovský charakter rozloženia potvrdzuje nakoniec i pomerne dobrá zhoda hodnôt aritmetického priemeru a polosumy.

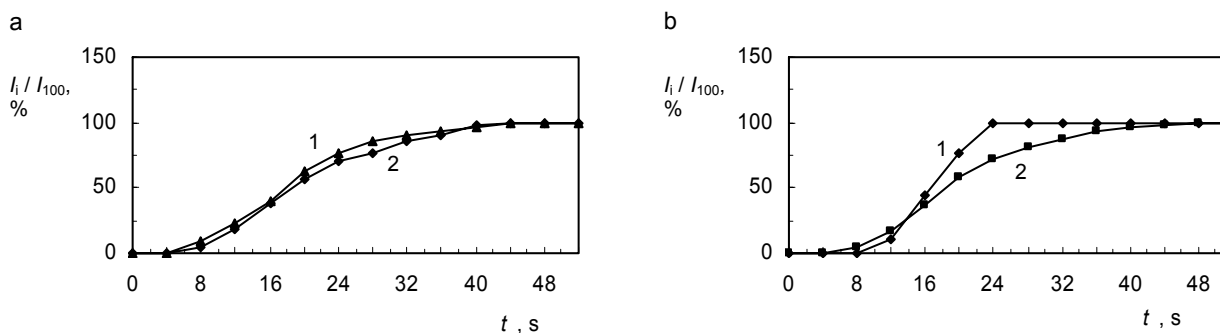
Tabuľka V

Polčasy vyparovania ($t_{50\%}$) a totálne časy vyparovania ($t_{100\%}$) pre sledované prvky; intenzita prúdu 10 A

Prvok	$t_{50\%}$ [s]		$t_{100\%}$ [s]	
	spektrografická	spektrometrická ^a	spektrografická	spektrometrická ^a
Al	23,6	18,5	60,0	44,0
Cr	17,6	18,0	60,0	52,0
Ni	29,7	16,0	70,0	24,0
V	30,5	17,5	80,0	44,0

^a $r = 4$ mm

Obr. 8. Normované vyparovacie krivky pre zvolené prvky pri spektrografii; (a) 1 – Al, 2 – V, (b) 1 – Cr, 2 – Ni



Obr. 9. Normované vyparovacie krivky pre zvolené prvky pri spektrometrii; (a) 1 – V, 2 – Al, (b) 1 – Ni, 2 – Cr

Prieskumnou analýzou overené spektrálne čiary sa potom využili aj na sledovanie vyparovacieho procesu. Spektrá sledujúce vyparovací proces sa zhotovili metódou v čase pohyblivou spektrálnou doskou. Samotný vyparovací proces, ako pre spektrografickú metódu, tak i pre spektrometrickú metódu sa výsledne sledoval konštrukciou normovaných vyparovacích diagramov¹², pričom sa stanovili polčasy vyparovania $t_{50\%}$ ako i časy totálneho vyparovania $t_{100\%}$ (cit.¹³) obidvoch spomínaných metód (tabuľka V). Pri budení spektier sa pre porovnanie pracovalo s dvoma druhmi budenia. Pri spektrografickej metóde sa ešte

použil neriadený oblúk jednosmerného prúdu, ale pri spektrometrickej metóde sa pracovalo už s počítačom riadeným oblúkovým výbojom, ktorý je časovo stabilnejší. Vypočítané normované krivky vyparovania znázorňuje obr. 8 a 9. Hodnoty polčasov vyparovania pri spektrografii sa pohybujú v rozsahu od 17,6 do 30,5 s, ale pri spektrometrii je to podstatne kratší interval, od 16 do 18,5 s. Časy totálneho odparenia sú pre spektrografiu opäť vyššie, a to od 60 do 80 s, zatiaľčo pre spektrometriu sú v intervale len od 24 do 52 s.

Záver

Prezentovaná práca má komparatívny charakter a bola zameraná na štúdium vyparovacieho procesu v neriadenom a počítačom riadenom oblúku jednosmerného prúdu pri analýze práškových vzoriek. Zo získaných výsledkov možno vyvodit' nasledujúce závery:

- Lognormálne rozloženie dát v prípade spektrografie a takmer ideálne normálne rozloženie dát v spektrometrii vyplýva z rozdielneho spôsobu budenia, registrácie i vyhodnocovania získaných spektier. To potvrdili aj vypočítané hodnoty RSD, ktoré sú v prípade spektrografie vyššie ako 15 %. Naproti tomu, hodnoty RSD pri spektrometrii sú síce nižšie, v intervale od 6 do 10 %, ale sú vyššie ako je pri tomto spôsobe detekcie zaužívané, čo je pravdepodobne spôsobené komplikovaným prívodom pár analytu do plazmy pri tejto tandemovej technike.
- Charakteristiky vyparovania sú značne prvkovo špecifické. Počas vyparenia pre spektrografickú metódu sa pohyboval v rozmedzí od 17,6 do 30,5 s, ale u spektrometrickej metódy iba od 16 do 18,5 s, čo sú podstatne kratšie časy. Časy totálneho vyparenia pre spektrografiu boli v intervale od 60 do 80 s, kým pri spektrometrii iba od 24 do 52 s, čo potvrdzuje stabilnejší charakter počítačom riadeného oblúkového zdroja jednosmerného prúdu, ale i vyššiu efektivitu tohto spôsobu budenia, a to v prípade všetkých skúmaných prvkov.

Záverom možno konštatovať, že vyparovanie sledovaných prvkov (Al, Cr, Ni a V) v riadenom DC oblúku má rozdielne správanie ako v neriadenom oblúku. Naše údaje potvrdzujú nevyhnutnosť používania počítačom riadeného DC oblúka za účelom dosiahnutia vyššej efektivity vyparovania.

LITERATÚRA

1. Zimmer K., Flórián K., Heltai Gy.: Prog. Anal. Atom. Spectrosc. 5, 341 (1982).
2. Lummerzheim D., Nickel H.: Z. Anal. Chem. 245, 267 (1969).
3. Todorović M., Vukanović V., Geogijević V.: Spectrochim. Acta, Part B 24, 571 (1969).
4. Vukanović V., Simić V., Vukanović V., Nickel H., Mazurkiewicz M.: Spectrochim. Acta, Part B 32, 305 (1977).
5. Flórián K.: Nепublikované údaje – súkromné oznámenie.
6. Török T., Zimmer K.: *Quantitative Evaluation of Spectrograms*. Akadémiai Kiadó, Budapest 1972.
7. Hassler J., Perzl P. R.: GIT Labor-Fachzeitschrift 40, 989 (1996).
8. Marinković M., Antonijević V. G.: Spectrochim. Acta, Part B 56, 129 (1980).
9. Ružičková S., Jankovská E., Koller L., Matherny M.: Transaction of the Universities 1, 13 (2003).
10. Kupka K.: *QC.ExpertTM*, Trilobyte, Pardubice 2002.
11. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Ars Magna, Praha 1998.
12. Pliško E.: Pure & Appl. Chem. 48, 69 (1976).
13. Kántor T., Pungor E.: Spectrochim. Acta, Part B 29, 139 (1974).

Táto práca vznikla za finančnej podpory Slovenskej grantovej agentúry VEGA 1/0214/03 a projektu APVT 20-009404.

S. Ružičková, J. Bajuszová, M. Matherny, and L. Koller (*Department of Chemistry, Faculty of Metallurgy, Technical University, Košice, Slovak Republic*): **A Comparison of Evaporation in Uncontrolled DC Arc in Classical Spectrography and in Computer-Controlled DC Arc in Optical Spectrometry in Analysis of Environmentally Relevant Elements**

Evaporation of Al, Cr, Ni and V in the classical uncontrolled DC arc spectrography and in the computer-controlled DC arc optical emission spectrometry was compared in the determination of the environmentally important elements. The experiments were carried out with a grating spectrograph PGS-2 and simultaneous multichannel LECO 750 spectrometer which was connected to the evaporation cell and adjusted to the Marinković plasma source. Standardized evaporation curves were obtained and the half-time and total evaporation time values were calculated. The basic statistical evaluation was also made.

MATERIÁLY PRO TENKÉ VRSTVY INFRAČERVENÝCH ZRCADEL

JITKA MOHELNÍKOVÁ

Fakulta stavební VUT v Brně, Veveří 95, 602 00 Brno
mohelnikova.j@fce.vutbr.cz

Došlo 22.7.05, přijato 22.11.05.

Klíčová slova: infračervená zrcadla, optické vlastnosti skel, tenké vrstvy pro IČ zrcadla

Obsah

1. Úvod
2. Měření optických vlastností skel
3. Princip funkce infračervených zrcadel
4. Skladba tenkých vrstev pro infračervená zrcadla
5. Závěr

1. Úvod

Motivace k využívání solární energie v budovách a energeticky úsporné programy způsobily vývoj a rozšíření speciálních druhů okenních zasklení^{1–3}, která mají, v porovnání s obyčejnými skly, upravené optické vlastnosti na požadované parametry dle účelu jejich používání. Některé typy speciálních skel pracují na principu infračervených zrcadel². Na povrchu těchto zasklení jsou při výrobě nanášeny tenké vrstvy, které odrážejí dlouhovlnné infračervené záření interiéru zpět do místnosti. Uvedená skla tedy omezují tepelné ztráty radiací. Označují se také jako skla s nízkou emisivitou nebo tepelná či infračervená zrcadla.

Vzhledem k tomu, že výrobci neuvádějí podrobné informace o těchto speciálních sklech, cílem publikované práce bylo najít vhodné materiály, které mohou být použity pro tenké vrstvy infračervených zrcadel.

2. Měření optických vlastností skel

Optické vlastnosti uvedených skel jsou v odborné literatuře i podle údajů výrobců většinou udávány v podobě průměrných hodnot odrazivosti a propustnosti, popř. pohltivosti. Nejsou však zveřejňovány spektrální charakteristiky ani materiálové složení speciálních tenkých vrstev, které zajišťují vysokou odrazivost infračerveného záření. Z toho důvodu bylo provedeno spektrální měření vybraných vzorků skel za účelem zjištění optických vlastností a na základě jejich analýzy byl proveden výběr vhod-

ných materiálů pro uvedené vrstvy. Podle změřených spektrálních charakteristik činitelů prostupu $\tau(\lambda)$ a odrazu $\rho(\lambda)$ byl hledán optimální návrh složení tenkých vrstev vysoce odrazných v oblasti dlouhovlnného infračerveného záření.

Byly posuzovány následující dva vzorky skel:

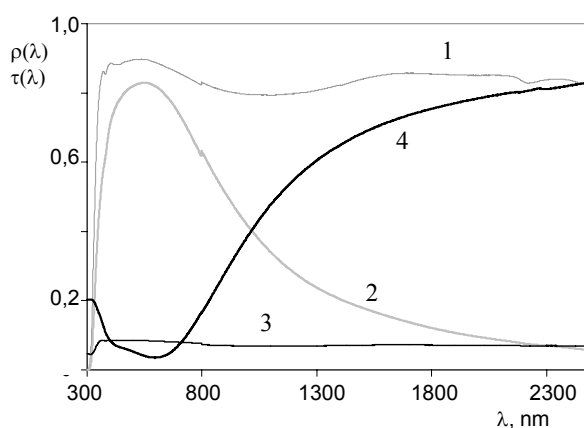
- vzorek A: čiré sklo float, tl. 4 mm
- vzorek B: nízkoemisivní sklo Planitherm, tl. 4 mm

Tyto vzorky o velikosti 30 mm × 30 mm byly posouzeny na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně na Katedře fyziky pevné fáze. Bylo provedeno spektrální měření v oblasti od ultrafialového do infračerveného záření, v rozsahu vlnových délek $\lambda \in (300 \text{ nm}, 2500 \text{ nm})$, tedy v intervalu vlnových délek odpovídajících spektrálnímu složení slunečního záření dopadajícího na zemský povrch. Dále byly ověřovány vlastnosti těchto skel v oblasti dlouhovlnného infračerveného záření v intervalu $\lambda \in (5 \text{ } \mu\text{m}, 11 \text{ } \mu\text{m})$. Ke spektrálnímu měření bylo použito těchto spektrometrů:

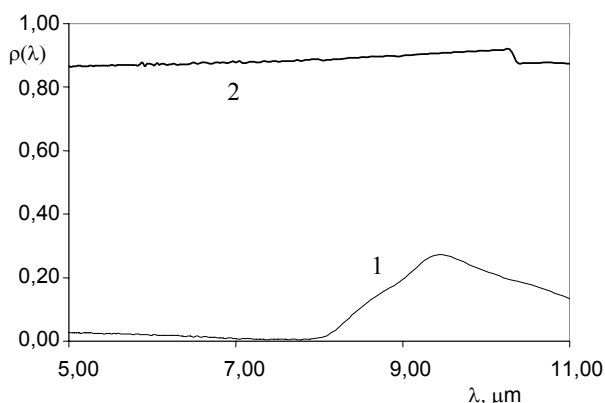
- VARIAN CARY 5E (vlnový rozsah 185–3300 nm),
- ZEISS SPECORD M80 (vlnový rozsah 2,5–50 μm).

Na obr. 1 je ukázka zpracovaných výsledků z uvedených měření.

Vzhledem k tomu, že sklo Float má v porovnání se vzorkem B ve středu viditelné oblasti vyšší propustnost $\tau(555 \text{ nm}) = 0,91$, ale také vyšší odrazivost $\rho(\lambda=555) = 0,09$, zatímco vzorek B nižší propustnost $\tau(555 \text{ nm}) = 0,83$ a nižší odrazivost $\rho(555 \text{ nm}) = 0,07$, lze usuzovat, že u vzorku B dochází k větší absorpci světla, tedy $\alpha(555 \text{ nm}) = 0,1$. Absorpce je způsobena existencí speciálních tenkých vrstev nanášených na povrchu skla. Tato vrstva pohlcuje část viditelného záření. Důkaz existence této vrstvy podává i zvýšená odrazivost posuzovaného vzorku skla na rozhraní mezi viditelnou a infračervenou oblastí (vlnová délka 780 nm) (viz obr. 1).



Obr. 1. Spektrální propustnost a odrazivost vybraných vzorků skel; 1 – spektrální propustnost $\tau(\lambda)$ – vzorek A, 2 – spektrální propustnost $\tau(\lambda)$ – vzorek B, 3 – spektrální odrazivost $\rho(\lambda)$ – vzorek A, 4 – spektrální odrazivost $\rho(\lambda)$ – vzorek B



Obr. 2. Odrázkost vzorků skel v oblasti infračerveného záření (od 5 do 11 μm); 1 – spektrální odrázkost $\rho(\lambda)$ – vzorek A, 2 – spektrální odrázkost $\rho(\lambda)$ – vzorek B

Je pozoruhodné, že z vysoce transparentního materiálu ve viditelné oblasti se sklo stává nepropustným pro oblast infračervenou, jak ukazují spektrální měření. Na základě měření bylo zjištěno, že sklo Float má v části infračerveného spektra v intervalu $\lambda \in (5 \text{ m}, 11 \mu\text{m})$ velmi nízkou odrázkost. Pouze v okolí vlnové délky 10 μm se čísel odrazu zvyšuje na hodnotu $\rho(9,5 \mu\text{m}) = 0,28$ (viz obr. 2).

3. Princip funkce infračervených zrcadel

Sluneční záření procházející sklem dopadá na povrchy konstrukcí a předmětů v místnosti. Na těchto površích se zčásti odráží a zčásti prochází a pohlcuje. Při pohlcení se energie záření mění na kvalitativně jinou formu energie, např. na energii tepelnou, elektrickou nebo chemickou. U stavebních konstrukcí dochází většinou k přeměně na tepelnou energii. Konstrukce se ohřívají a jejich povrchy sálají dlouhovlnné infračervené záření, které sklo nemá schopnost propouštět mimo prostor místnosti.

Podle principu zachování energie musí při nízké odrázkosti a nulové propustnosti v infračervené oblasti docházet k vysoké absorpci záření, tedy $\alpha(\lambda) \rightarrow 1$, $\lambda \in (5 \mu\text{m}, 50 \mu\text{m})$. V chladných dnech, kdy venkovní teplota je nižší než teplota v interiéru, dochází k velkým ztrátám právě vlivem absorpce dlouhovlnného infračerveného záření z interiéru do skla okenní tabule a následně sálání tohoto záření do venkovního prostoru. Tepelným ztrátám radiací je však možno zabránit tím, že se na sklo nanese tenká, dostatečně transparentní vrstva, která zabrání absorpci infračerveného záření. Tato vrstva musí vykazovat vysokou odrázkost pro dlouhovlnné infračervené záření a nízkou emisivitu.

Prvořadá podmínka pro omezení tepelných ztrát zasklení radiací je tedy vytvoření takové soustavy tenkých vrstev, jejíž čísel odrazu $\rho(\lambda) \rightarrow 1$ v okolí vlnové délky $\lambda = 10 \mu\text{m}$. Tato vlnová délka odpovídá podle Wienova zákona⁴ teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$, tedy běžné pokojové teplotě. Jediné tím, že se infračervené záření odráží od povrchu, nedochá-

zí k jeho absorpci ve hmotě skla. Čím nižší emisivitu bude vrstva mít, tím vyšší odrázkosti lze v dané oblasti dosáhnout. Toto tvrzení je možné jednoduše zdůvodnit na základě platnosti Kirchhoffova zákona⁴, principu zachování energie a již zmíněné skutečnosti, že sklo je pro dlouhovlnné záření nepropustným materiálem, tedy $\tau(\lambda) \rightarrow 0$, pro $\lambda \in (5 \mu\text{m}, 50 \mu\text{m})$. Potom lze vztah mezi odrázkostí a emisivitou v infračervené oblasti vyjádřit $\rho(\lambda) = 1 - \varepsilon(\lambda)$.

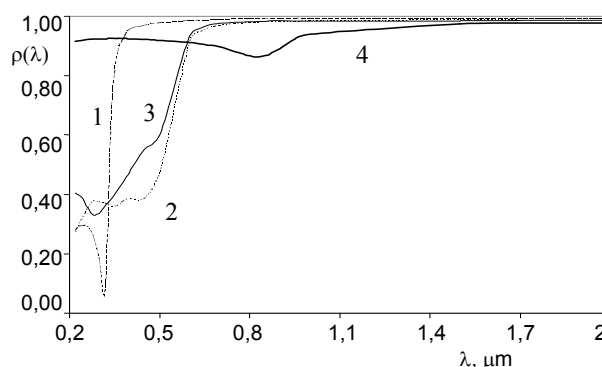
Emisivita je závislá na teplotě tělesa, tedy na vlnové délce záření, které dané těleso vysílá. Střední emisivita obyčejného skla v oblasti dlouhovlnného infračerveného záření je $\bar{\varepsilon} = 0,84$ (cit.⁵), tedy průměrná odrázkost se pohybuje kolem hodnoty $\bar{\rho} = 0,16$. Skla s nízkou emisivitou mají $\bar{\varepsilon} = 0,2$ až $0,1$ (cit.^{2,5}) i nižší, což ukazuje na vysoký čísel odrazu v průměru až $\bar{\rho} = 0,90$.

Měření v infračervené oblasti ukázala v případě vzorku B velmi vysokou odrázkost až $\bar{\rho} = 0,86$ a kolem vlnové délky $\lambda = 10 \mu\text{m}$ je $\rho(\lambda) = 0,91$ (viz obr. 2). Toto sklo se tedy opravdu chová jako infračervené zrcadlo.

4. Skladba tenkých vrstev pro infračervená zrcadla

Z předchozích úvah je zřejmé, že navrhovaná tenká vrstva musí mít maximální propustnost v oblasti viditelného záření $\lambda \in (380 \text{ nm}, 780 \text{ nm})$, pro pracovní vlnovou délku $\lambda_c = 555 \text{ nm}$ a vysokou odrázkost v intervalu $\lambda \in (5 \mu\text{m}, 50 \mu\text{m})$.

Ušlechtilé kovy jako zlato, stříbro, měď, popřípadě jejich slitiny, mají vysokou odrázkost právě v infračervené oblasti⁶⁻⁹. Na obr. 3 je uveden průběh spektrálního čísel odrazu vybraných kovových vrstev (stříbro-Ag, zlato-Au, měď-Cu, hliník-Al) nanesených na skleněnou podložku metodou vakuového napařování⁹. Jak je vidět z obrázku, nejlepších vlastností z hlediska výběru materiálu pro tenké reflexní vrstvy pracující na principu infračervených zrcadel vykazuje stříbrná vrstva. U stříbra, je-li nanášeno v dostatečně tenké vrstvě, je zaručena vysoká propustnost ve viditelné oblasti a vysoká odrázkost



Obr. 3. Odrázkost tenkých kovových vrstev v intervalu vlnových délek od 0,2 do 2,0 μm ; 1 – Ag, 2 – Au, 3 – Cu, 4 – Al

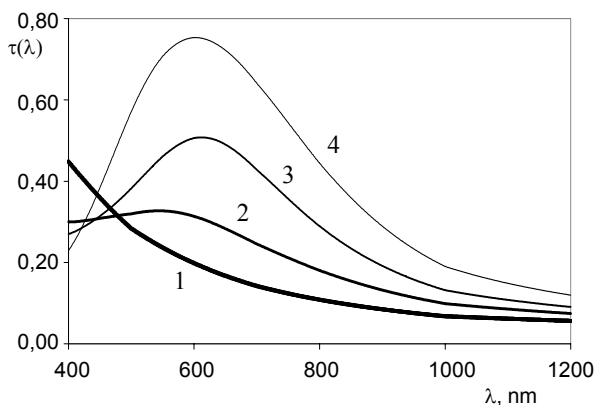
infračerveného záření. Zlatá vrstva má také v intervalu vlnových délek dlouhovlnného infračerveného záření vysokou reflexi, ale oproti stříbru má poněkud nižší propustnost ve viditelné oblasti, podobně jako vrstva měděná. Nižší propustnost viditelného záření je způsobena zvýšenou absorpcí v oblasti mezi UV-A a viditelným zářením³. Hliník pro účely IČ reflexních skel není zcela vhodným materiálem, neboť jeho vysoká odrazivost převažuje nejen v infračervené oblasti, ale také v oblasti viditelné, čímž je značně omezen vstup světla. Tenké hliníkové vrstvy však nachází uplatnění u reflexních tepelně izolačních materiálů.

Kromě zlata většina výše uvedených kovů na vzduchu oxiduje. Vlastnosti zoxidované kovové vrstvy se výrazně liší od požadovaných původních vlastností – značně se snižuje odrazivost. Proto se kovové vrstvy obkládají vrstvami dielektrickými, které plní funkci nejen ochrannou, ale také přispívají k jejich prosvětlení ve viditelné oblasti⁷.

Na následujícím obrázku je provedeno srovnání spektrálního činitele prostupu tenké vrstvy stříbra (tloušťka vrstvy $h=25$ nm) nanesené na sklo, dále téže stříbrné vrstvy s jedním i se dvěma dielektrickými obloženími, pro vlnové délky v intervalu $\lambda \in (300 \text{ nm}, 2500 \text{ nm})$.

Z obr. 4 lze usoudit, že na prosvětlení tenké kovové vrstvy má zásadní vliv právě přední dielektrické obložení.

Mezi nejčastěji používané materiály pro dielektrické vrstvy patří TiO_2 , SnO_2 , SiO_2 , ZrO_2 , MgF_2 , ZnS , Al_2O_3 (cit. ^{5,6,8,13}). Vhodnou kombinací dielektrických a kovových vrstev, optimálním návrhem jejich tloušťek a správně zvolenou technologií nanášení lze vytvářet soustavy tenkých vrstev, které pro zadanou oblast vlnových délek budou splňovat požadované vlastnosti. Při návrhu soustav tenkých vrstev pro úpravu optických vlastností zasklení musí být zvažovány následující požadavky:



Obr. 4. Spektrální propustnost $\tau(\lambda)$ tenké stříbrné vrstvy s dielektrickým obložení; 1 – stříbrná vrstva (tl. 25 nm) – sklo, 2 – stříbrná vrstva (tl. 25 nm) – dielektrická vrstva TiO_2 (tl. 45 nm) – sklo, 3 – dielektrická vrstva TiO_2 (tl. 45 nm) – stříbrná vrstva (tl. 25 nm) – sklo, 4 – dielektrická vrstva TiO_2 (tl. 45 nm) – stříbrná vrstva (tl. 25 nm) – dielektrická vrstva TiO_2 (tl. 45 nm) – sklo

- požadované hodnoty spektrálního činitele prostupu $\tau(\lambda)$ odrazu $\rho(\lambda)$ a pohlcení $\alpha(\lambda)$ pro zadaný interval vlnových délek λ ,
- indexy lomu jednotlivých vrstev,
- počet vrstev v soustavě,
- tloušťku kovové vrstvy i tloušťky dielektrického obložení,
- vlastnosti přizpůsobovací vrstvy při návrhu soustavy o více vrstvách¹².

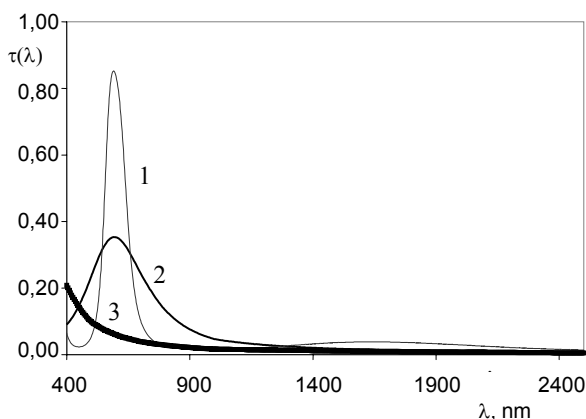
Index lomu jednotlivých vrstev je funkcí vlnové délky dopadajícího záření a jeho hodnota je ovlivňována chemickým složením materiálu, krystalickou strukturou vrstvy, množstvím absorbovaných vodních par a způsobem nanášení na podklad⁸. Index lomu ve skutečnosti závisí i na tloušťce vrstvy. Těto vlastnosti je možno úmyslně využít pro konstrukci nehomogenní vrstvy s definovaným profilem indexu lomu¹². V běžných případech se však tenká vrstva považuje za homogenní, tedy její index lomu se mění jen s vlnovou délkou, a v prostorové souřadnici zůstává konstantní. Absorbující materiály jsou charakterizovány komplexním indexem lomu $n = n - ik$, kde k je index absorpce. Kovy jsou silně absorbující materiály, u kterých se ve viditelné oblasti elektromagnetického záření snižuje propustnost (úměrně se zvětšující se tloušťkou kovové vrstvy) vlivem vysokého indexu absorpce^{3,7,9}. Tím lze také vysvětlit vyšší absorpci viditelného záření u vzorku B (viz obr. 1).

Na základě studia optických vlastností vybraných vzorků skel a výběru vhodných materiálů pro tenké vrstvy s vysokou odrazivostí v infračervené oblasti^{6,10,12,13} byly provedeny výpočty spektrálních charakteristik pomocí počítačového programu Film*Calc 3.03-Advanced Optical Thin Film Technology, FTG Software Associates, Princeton, USA. Tento program provádí výpočty spektrálních činitelů odrazu a prostupu jako funkce zadaných vlnových délek a určených úhlů dopadu pro zadané hodnoty indexů lomu zvolených materiálů a pro stanovené tloušťky tenkých vrstev.

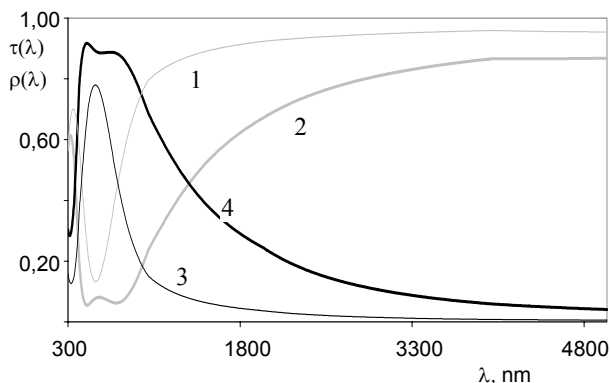
Výsledky počítačových hodnocení v podobě spektrálních činitelů odrazu $\rho(\lambda)$ a prostupu $\tau(\lambda)$ byly provedeny pro několik materiálových variant. Pro kovovou vrstvu se použilo stříbra (Ag), jehož vlastnosti byly v porovnání se zlatem (Au) a hliníkem (Al). Pro dielektrické vrstvy byl vybrán TiO_2 . Z výsledků počítačových hodnocení byla prováděna analýza vlastností navrhovaných soustav tenkých vrstev.

Z hlediska počtu vrstev v soustavě je možno dojít k následujícím poznatkům. Při návrhu soustavy tenkých vrstev o více než pěti vrstvách vycházela sice vysoká propustnost ve viditelné oblasti, ale jen ve velmi úzké části viditelného spektra, v rozsahu vlnových délek $\lambda \in (550 \text{ nm}, 650 \text{ nm})$ (viz obr. 5). Taková úprava zasklení by vytvářela barevný filtr, což jistě není žádoucí. Zmenšením počtu vrstev se sice propustnost snížila, ovšem spektrum propustnosti se rozšířilo na celou viditelnou oblast.

Tloušťka vrstev, zvláště kovových, výrazně ovlivňuje



Obr. 5. Vliv tenké kovové vrstvy a dielektrického obložení na spektrální propustnost $\tau(\lambda)$ tenkých vrstev; 1 – soustava tenkých vrstev: H-L-H-Ag-H-L-H, 2 – soustava tenkých vrstev: H-Ag-H, 3 – tenká vrstva: Ag; H – dielektrická vrstva s vysokým indexem lomu (TiO_2), L – dielektrická vrstva s nízkým indexem lomu (ZrO_2), Ag – vrstva stříbra



Obr. 6. Vliv tloušťky kovové vrstvy na optické vlastnosti tenkých reflexních filmů; 1 – odrazivost $\rho(\lambda)$ tenkého filmu: 36 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 40 nm TiO_2 – sklo, 2 – odrazivost $\rho(\lambda)$ tenkého filmu: 36 nm TiO_2 – 10 nm Ag – 40 nm TiO_2 – sklo, 3 – propustnost $\tau(\lambda)$ tenkého filmu: 36 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 40 nm TiO_2 – sklo, 4 – propustnost $\tau(\lambda)$ tenkého filmu: 36 nm TiO_2 – 10 nm Ag – 40 nm TiO_2 – sklo

Tabulka I

Tloušťky tenkých kovových vrstev vhodné pro infračervená zrcadla

Tloušťka tenké kovové vrstvy h	$\tau(555\text{nm})^a$	$\bar{\rho}$ pro $\lambda \in \langle 5\mu\text{m}, 50\mu\text{m} \rangle^b$	Vhodnost použití pro IR zrcadla
$h > 25\text{nm}$	$\tau(555\text{nm}) < 0,70$	$\rho \in \langle 0,90; 0,95 \rangle$	– ^c
$h \in \langle 10\text{ nm}, 25\text{nm} \rangle$	$\tau(555\text{nm}) \in \langle 0,70; 0,85 \rangle$	$\rho \in \langle 0,85; 0,90 \rangle$	+ ^d
$h < 10$	$\tau(555\text{nm}) \in \langle 0,85; 0,90 \rangle$	$\rho \in \langle 0,80; 0,85 \rangle$	+,* ^e

^a $\tau(555\text{nm})$ – maximální propustnost τ ve viditelné oblasti pro pracovní vlnovou délku $\lambda=555\text{ nm}$, ^b $\bar{\rho}$ pro $\lambda \in \langle 5\mu\text{m}, 50\mu\text{m} \rangle$ – střední hodnota odrazivosti v oblasti infračerveného záření $\lambda \in \langle 5\mu\text{m}, 50\mu\text{m} \rangle$, ^c nevhodné, nízká propustnost světla, ^d vhodné, ^e náročnější požadavky na technologii nanášení tenkých vrstev

propustnost viditelného záření. Bylo provedeno posouzení soustavy tenkých vrstev⁹, ve které se měnila tloušťka vrstvy stříbra. Tloušťka kovové vrstvy nad 35 nm výrazně snižovala vstup viditelného záření, teprve zmenšením tloušťky na 25 nm a méně bylo dosaženo požadované propustnosti. Velmi tenké vrstvy kovu o tloušťce 7 nm až 10 nm dávají vysokou světelnou propustnost, vyžadují však náročnější požadavky z hlediska technologie nanášení. Na obr. 6 je ukázka vyhodnocení spektrálních charakteristik soustavy tenkých vrstev s vrstvou stříbra tloušťky 10 a 25 nm.

Na základě výpočtů spektrální propustnosti $\tau(\lambda)$ navrhovaných soustav tenkých vrstev pro oblast vlnových délek viditelného záření $\lambda \in \langle 380\text{ nm}, 780\text{ nm} \rangle$, je možné stanovit následující doporučení pro návrh tenkých kovových vrstev vhodných pro infračervená zrcadla (viz tabulka I).

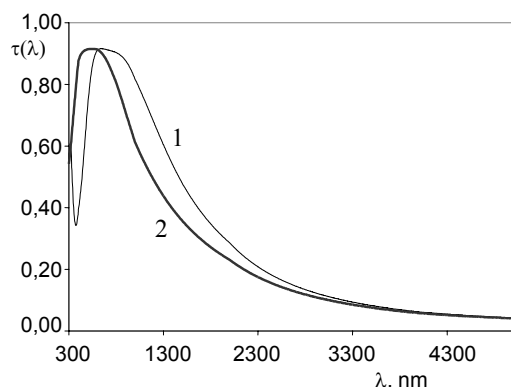
Obr. 7 zohledňuje především vliv tloušťky dielektrického obložení na spektrální propustnost soustavy tenkých vrstev v oblasti viditelného záření. Z obrázku je patrné, že dielektrické obložení v tloušťce větší jak 50 nm způsobilo posun maxima propustnosti za střed viditelné oblasti ($\lambda=555\text{ nm}$).

Na základě počítačových hodnocení byly zjištěny podobné spektrální charakteristiky soustavy tenkých vrstev z obr. 6 a 7 se zlatou vrstvou stejné tloušťky. Ve srovnání se stejnou soustavou s vrstvou hliníkovou by pro dosažení obdobných optických vlastností ve viditelné oblasti musela mít hliníková vrstva tloušťku menší jak 5 nm.

Na obr. 8 je uvedena ukázka srovnání spektrální odrazivosti skla s navrženou soustavou tenkých vrstev obsahující vrstvu stříbra (45 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 45 nm TiO_2) v porovnání se změřenými hodnotami spektrální odrazivosti nízkoemisivního skla – vzorek B z obr. 1 a 2.

5. Závěr

Na základě poznatků z výše popsané analýzy je možné sestavit požadavky pro návrh soustavy tenkých vrstev, pracujících na principu infračervených zrcadel pro úpravu optických vlastností okenních zasklení.



Obr. 7. Vliv tloušťky dielektrického obložení na optické vlastnosti tenkého reflexního filmu; 1 – propustnost $\tau(\lambda)$ tenkého filmu: 53 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 54 nm TiO_2 – sklo, 2 – propustnost $\tau(\lambda)$ tenkého filmu: 36 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 40 nm TiO_2 – sklo

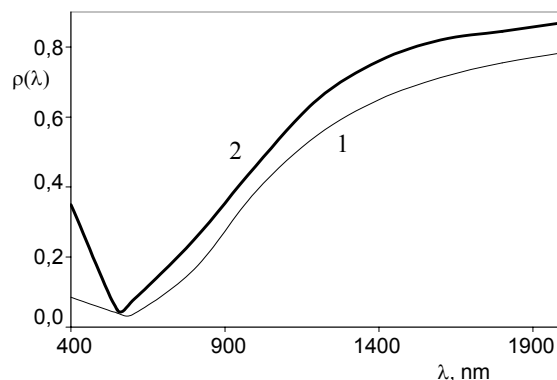
Jako nejjednodušší řešení se nabízí návrh třívrstvé soustavy se střední kovovou vrstvou a dvěma vrstvami dielektrickými. Dostatečná tloušťka celé soustavy se pohybuje kolem 100 nm, doporučená tloušťka tenké kovové vrstvy je 10 nm, doporučené tloušťky vrstev dielektrického obložení mezi 35 až 45 nm. Z hlediska spektrálního rozsahu, je žádoucí zajistit vysokou propustnost slunečního záření $\tau(\lambda) \rightarrow 1$ ve spektrální oblasti viditelného záření $\lambda \in (380 \text{ nm}, 780 \text{ nm})$ a vysokou odrazivost v oblasti dlouhovlnného infračerveného záření $\rho(\lambda) \rightarrow 1$, pro $\lambda \in (5 \mu\text{m}, 50 \mu\text{m})$.

Pro infračervená zrcadla se jako nejvhodnější materiály jeví pro kovové vrstvy stříbro a TiO_2 pro vrstvy dielektrické. Tyto materiály jsou dostupné a i finančně přijatelné. Výhody stříbrné vrstvy byly popsány u vlastností kovů. TiO_2 je materiál s vysokým indexem lomu, který lze nanášet jak metodou vakuového napařování, tak i teplotním či katodovým napařováním^{8,13}.

Děkuji doc. RNDr. Karlu Navrátilovi, CSc. z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně za spektrální měření vzorků skel a RNDr. Pavlu Pokornému z Ústavu přístrojové techniky, AV ČR za cenné rady a umožnění přístupu k počítačovému programu Film*Calc 3.03, pomocí kterého byly provedeny výpočty spektrálních charakteristik tenkých vrstev pro analýzu optických vlastností materiálů vhodných pro úpravu zasklení pracujících na principu infračervených zrcadel.

Seznam symbolů

- λ vlnová délka [m]
- $\rho(\lambda)$ spektrální činitel odrazu [–]
- $\tau(\lambda)$ spektrální činitel prostupu [–]
- $\alpha(\lambda)$ spektrální činitel pohlcení [–]
- ε spektrální emisivita [–]



Obr. 8. Srovnání spektrálních odrazivostí vzorku B (nízkoemisivní sklo) se sklem s navrženou soustavou tenkých vrstev; 1 – odrazivost $\rho(\lambda)$ nízkoemisivního skla – vzorek B, 2 – odrazivost $\rho(\lambda)$ skla s tenkým filmem: 45 nm TiO_2 – 25 nm Ag – 45 nm TiO_2 – sklo

- $\bar{\rho}$ střední odrazivost (střední činitel odrazu) [–]
- $\bar{\varepsilon}$ střední emisivita [–]

LITERATURA

1. Hutchins M. G.: Solar Energy 62, No. 3 (1998).
2. Wigginton M.: *Glass in Architecture*. Phaidon Press, London 1996.
3. Balcomb J. D.: *Passive Solar Buildings – Solar Heat Technologies and Applications*. The MIT Press, Cambridge 1992.
4. Modest M.: *Radiative Heat Transfer*. The Pennsylvania State University Press, USA 1993.
5. Johnson E. T.: *Low-E Glazing Design Guide*. Butterworth Architecture, Boston 1991.
6. Berning P. H.: Applied Optics 22, No. 24 (1983).
7. Born M., Wolf E.: *Principles of Optics*. The University Press, Cambridge 2003.
8. Eckertová L.: *Physics of Thin Films*. Plenum Press, New York 1990.
9. Gray D. E.: *American Institute of Physics Handbook*. McGraw-Hill Book Company, New York 1972.
10. Knittl Z.: *Optics of Thin Films*. John Wiley & Sons, London 1976.
11. Krpata F.: *Aplikovaná optika*. Vydavatelství ČVUT Praha, Praha 1997.
12. Křepelka J.: *Optika tenkých vrstev*. Skriptum Přírodovědecké fakulty UP Olomouc, Olomouc 1993.
13. Yoldas B. E.: Applied Optics 23, No. 20 (1998).

J. Mohelníková (*Faculty of Civil Engineering, Technical University, Brno*): **Materials for Thin Layers of Infrared Mirrors**

Glasses with deposited IR-reflective thin films on one of their surfaces operate as heat mirrors. The films improve optical properties of glazings and, compared with ordinary clear glasses, reduce heat radiation losses. The design of thin reflective coatings is based on the theory of optics of thin films. Optical properties of the films are defined by spectral characteristics such as reflectance,

transmittance and absorptance for a given wavelength. The paper deals also with classification of the materials suitable for IR-reflective thin films. Spectral reflectance measurements of glass samples were carried out to determine their optical properties in the spectral range of solar radiation (300–2500 nm) and in the long-wave IR region (5–11 μm). Spectral optical properties of IR-reflective coatings were calculated for different compositions of the films to obtain coatings with very high light transmittance and IR reflectance.

IDENTIFIKACE KOMPLEXŮ HLINÍKU V UHLÍ METODOU NMR TUHÉ FÁZE

PAVEL STRAKA^a a ZDENĚK KLIKA^b

^a Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, Holešovičkách 41, 182 09 Praha 8, ^b VŠB – Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15, Ostrava – Poruba
straka@irms.cas.cz, zdenek.klika@vsb.cz

Došlo 20.1.05, přepracováno 16.8.05, přijato 30.8.05.

Klíčová slova: komplexy, Al, NMR, uhlí

Úvod

Uhlí je v současné době významnou energetickou a chemickou surovinou a jeho význam i nadále poroste s vyčerpáváním zásob ropy. Pro pokročilé chemické využití uhlí má velký význam co možná nejširší poznání jeho komplikované chemické struktury, která zahrnuje alicyklicko-aromatické polymery, heterocyklické struktury, nízkomolekulární organické látky (fenoly, alkany C10–C24, cyklopentany a cyklohexany, alkybenzeny a alkylnaftaleny aj.), minerální složky (hlinítokřemičitany, oxidy, sulfidy, uhličitany, sirany, chloridy a fosforečnany) a komplexní sloučeniny.

Komplexní sloučeniny s organickými ligandy jsou nejméně prozkoumanými sloučeninami uhelné substance (organická hmota nebo část uhlí, hořlavina) a jejich znalost je velmi vágní. Přítomnost těchto látek v uhlí je spíše spekulativní a analytické důkazy chybí. Je uvažován výskyt blíže nespecifikovaných komplexů Al, Be, Cu, Ge, U a W, porfyrinů Mn, Ni a vanadu¹, ftalocyaninů Al, Co, Cu, Ga a trikarbonylových komplexů Fe, Mn a chromu².

Z řady kovových prvků obsažených v různých koncentracích v uhelné substanci se v souvislosti s komplexními sloučeninami jeví významný hliník, jehož komplexotvornost vyplývá z elektronové konfigurace a sp^3 a sp^3d^2 hybridizace valenčních orbitalů, poskytující 4 a 6

σ -vazeb. Hliník náleží v uhelné hmotě k majoritním kovovým prvkům, vytváří v uhlí minerál mellit^{1,3}, obecně poskytuje řadu komplexů a organokovových sloučenin⁴, tvoří tetraedrické komplexy s alkoholovými, etherovými a ketonovými ligandy⁵ a fenolát hliníty.

Koncentrace hliníku v hnědém i černém uhlí bývá oproti jiným kovům dosti vysoká, 0,3–0,5 % hm. (cit.^{6,7}); hliník také jeví výraznou afinitu k organické hmotě uhlí, jak vyplývá z posledně uvedených prací. Pro identifikaci Al komplexů jsou významné magnetické vlastnosti jádra isotopu ²⁷Al, zejména jaderný spin, dosti vysoký gyromagnetický poměr a další parametry (tabulka I) a rovněž výlučné zastoupení jader ²⁷Al v přírodním hliníku^{8,9}. Z tabulky I vyplývá, že vhodnou metodou ke sledování komplexů hliníku v uhlí je nukleární magnetická rezonance isotopu ²⁷Al v tuhé fázi (²⁷Al MAS NMR) a měření chemických posunů v závislosti na chemickém okolí atomu Al. (Pro srovnání jsou v tabulce I uvedeny magnetické vlastnosti a zastoupení isotopu ¹³C v přírodním uhlíku.)

Cílem této práce je popsat metodu identifikace komplexů hliníku umožňující studium těchto komplexů v uhlí, kaustobiolitech, horninách a surovinách. Jmenovitě uhlí prošlo při svém vzniku a zrání procesy v laboratoři prakticky nerealizovatelnými a mohly v něm vzniknout komplexní sloučeniny dosud nepopsané.

Experimentální část

Princip metody

Organická hmota uhlí obsahující komplexy Al byla separována ze suchého uhlí dlouhodobým loužením 2-methoxyethanolem za laboratorní teploty¹⁰. Ze získaného výluhu bylo pak odstraněno rozpouštědlo a sušina podrobena elementární, rentgenfluorescenční a ²⁷Al MAS NMR analýze. Dále byly v sušině stanoveny fenolické skupiny OH pro jejich význam v uhelné substanci^{11,12} a schopnost fenolů tvořit sloučeniny s Al.

Separace komplexů

Předpokládané organické komplexy hliníku byly separovány z uhlí tak, aby koncentrace Al v získaném tuhém

Tabulka I
Magnetické vlastnosti atomového jádra isotopu ²⁷Al a isotopu ¹³C

Isotop	Přirozený výskyt [%]	Spin	$10^4 \gamma$	Magnetický moment ^a	Kvadrupólový moment $\times 10^{28}$ [m ²]	Relativní citlivost ^b	Rezonanční frekvence ^c [MHz]
²⁷ Al	100	5/2	6971	3,639	0,149	12,9	26,0
¹³ C	1,11	1/2	6728	0,702	–	1,0	25,15

γ – gyromagnetický poměr [rad s⁻¹ T⁻¹], ^a násobek jaderného magnetonu μ_N ; ^b při stejném počtu jader ve stejném magnetickém poli; ^c v magnetickém poli o indukci 2,349 T

Tabulka II

Obsah popela a elementární analýza sušín výluhů z černého a hnědého uhlí

Vzorky	Obsah popela a elementární analýza [% hm.]					
	popel	C	H	N	S	O
Uhlí Dukla	0,5	82,4	7,0	1,1	0,6	8,4
Uhlí ČSA	1,2	80,0	7,9	0,9	2,6	7,4

organickém vzorku byla okolo 0,5 % hm. Pro organický charakter sledovaných Al komplexů byly tyto sloučeniny odděleny loužením v 2-methoxyethanolu. Toto činidlo bylo zvoleno na základě výsledků studie loužení¹⁰. Výluhy obsahovaly organické látky a organické komplexní sloučeniny Al, zbytky po loužení pak hlinitokřemičitany.

Ke sledování uvažovaných komplexů byly použity výluhy z černého uhlí z dolu Dukla (ostravsko-karvinský revír, česká část hornoslezské pánve, obsah popela 10,41 % hm. v suchém uhlí, obsah Al 0,45 % hm. v původním uhlí) a výluhy z hnědého uhlí z velkolomu Čs. armády (severočeský hnědouhelný revír, obsah popela 17,42 % hm. v suchém uhlí, obsah Al 0,51 % hm. v původním uhlí).

K loužení byl použit 2-methoxyethanol čistoty 99,3+% (Sigma Aldrich). Proschlá, jemně mletá uhlí byla loužena tak, že vždy 60–70 g vzorku bylo smíšeno se 140 až 150 cm³ 2-methoxyethanolu v uzavřené nádobce s fritou zatavenou v postranním tubusu a louženo za laboratorní teploty po dobu 20 měsíců za občasného míchání (většinou 1–2× denně). Po odfiltrování roztoku a šetrném odpaření 2-methoxyethanolu byly získané tuhé výluhy (sušiny) analyzovány.

Srovnávací sloučeniny

Pro interpretaci ²⁷Al MAS NMR spekter získaných sušín výluhů byla pořízena srovnávací spektra 4 sloučenin: chloridu Al-ftalocyaninu, chloridu Al-naftalocyaninu, fenolátu hlinitého a α-Al₂O₃. Dále bylo pořízeno srovnávací spektrum směsi hexafenoxidového komplexu Al a chloridu Al-ftalocyaninu (vše Sigma Aldrich).

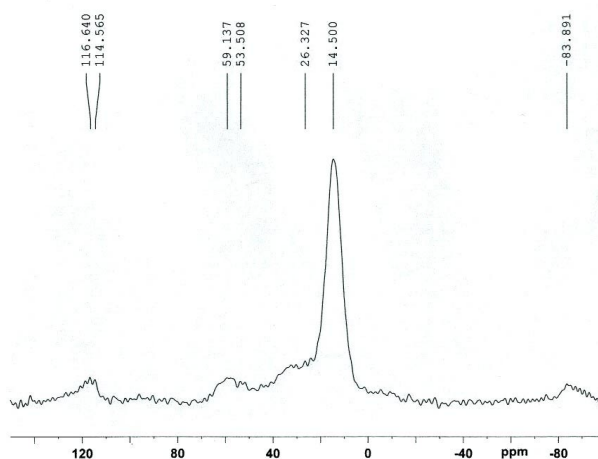
Přístroje a metody

K elementární analýze H, C, N, S a O sušín výluhů byl použit přístroj Flash 1112 EA (Thermo Finnigan, Rodano), k rentgenfluorescenčním analýzám hliníku a SiO₂ v uhlí i v sušinách výluhů pak přístroj XRF EDS Spectro X-Lab (SPECTRO Analytical Instruments, Kleve). Popel byl stanoven podle ČSN¹³. Sušiny výluhů byly dále analyzovány NMR spektrometrií tuhé fáze. ²⁷Al MAS NMR spektra byla pořízena na přístroji Bruker Avance 500 (Bruker, Rheinstetten). Jako NMR standard sloužil Al(NO₃)₃ · 6 H₂O, měření proběhla při rotační frekvenci vzorku 12 kHz. Fenolické skupiny OH v sušinách byly stanoveny acetylační metodou¹¹, vyzkoušenou pro daná uhlí¹².

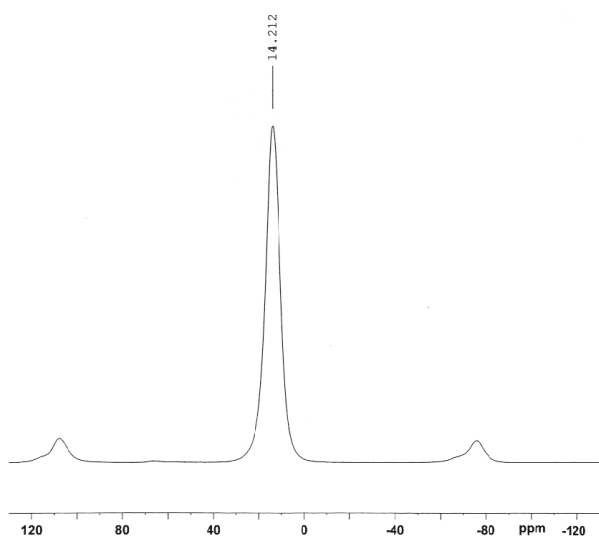
Výsledky a diskuse

Zvolená uhlí měla dobré předpoklady pro sledování komplexů hliníku, protože obsahovala dostatečná množství Al, jak bylo výše uvedeno. U černého uhlí z dolu Dukla byla novou metodou stanovení afinity prvku k organické a minerální části uhlí^{6,7} prokázána vysoká afinita Al k organické substanci (75,9 %). U hnědého uhlí z velkolomu ČSA byla tato afinita pouze 32 %, avšak pro známý vysoký obsah kyslíkatých a dusíkatých skupin v hnědých uhlích byla zkoumána možnost výskytu Al komplexů i v tomto případě. Pro identifikaci organických Al komplexů je významné, že sušiny výluhů měly vysoký obsah C a H, nízký obsah popela (tabulka II) a tím i SiO₂, obsahovaly 0,4 % hm. Al (tedy množství dostačující pro identifikaci metodou ²⁷Al MAS NMR uvedeným přístrojem) a vykazovaly významné obsahy dusíku a kyslíku (tabulka II), což bylo důležité vzhledem k tomu, že organické komplexy Al obsahují vždy vazby Al–N nebo Al–O.

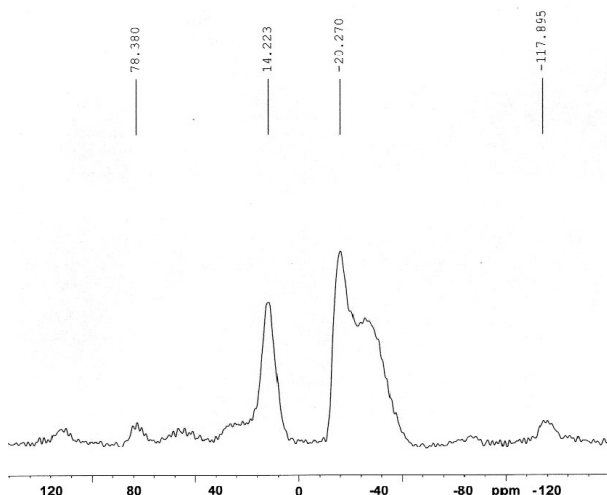
Sloučeniny hliníku se v uhlí vyskytují v tetraedrické a oktaedrické koordinaci jako součást anorganické/minerální části uhlí ve formě alumosilikátů a rovněž jsou zastoupeny v jeho organické části. Výskyt tetraedricky koordinovaných komplexů hliníku s alkoholovými, etherovými nebo ketonovými ligandy není v uhlí pravděpodobný vzhledem k jeho aromatickému charakteru. Jiné organické



Obr. 1. ²⁷Al MAS NMR spektrum sušiny výluhu z černého uhlí z dolu Dukla; pik při 14,5 ppm odpovídá Al hexakoordinovanému s kyslíkem



Obr. 2. ^{27}Al MAS NMR spektrum $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$; pík při 14,2 ppm odpovídá Al hexakoordinovanému s kyslíkem v oktaedrickém uspořádání



Obr. 3. ^{27}Al MAS NMR spektrum směsi Al-hexafluoridového komplexu a chloridu Al-fulcyaninu; pík při 14,2 ppm odpovídá Al hexakoordinovanému s kyslíkem

ligandy, zejména aromatického charakteru, však mohou v uhlí tvořit komplexy s atomem Al koordinovaným se 4 nebo 6 atomy kyslíku nebo se 4 atomy dusíku. Z uvedených možností výskytu komplexů hliníku v organické složce uhlí vyplývá, že lze uvažovat fulcyaniny a – pro vysoký obsah fenolických struktur v uhlí^{12,14,15} – také fenoxidové komplexy ($\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_n^{3-n}$), tj. komplexy odvozené od fenolátu hlinitého ($\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_3$): tetrafenoxidový ($\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_4^-$) a hexafluoridový ($\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_6^{3-}$).

K identifikaci předpokládaných komplexů byly proto

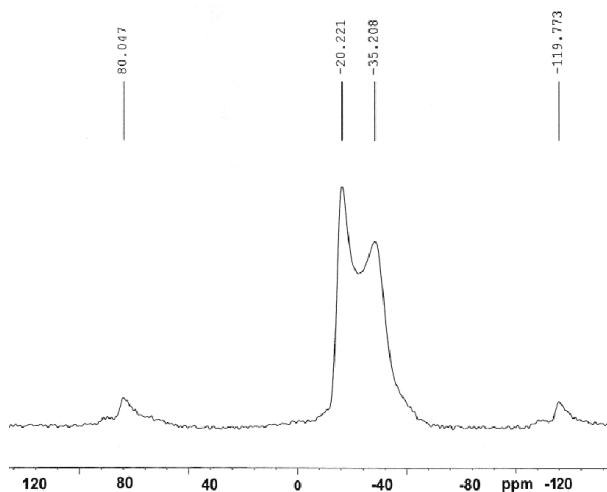
Tabulka III

Obsah fenolických OH skupin v sušině výluhů A, B, C z černého a hnědého uhlí

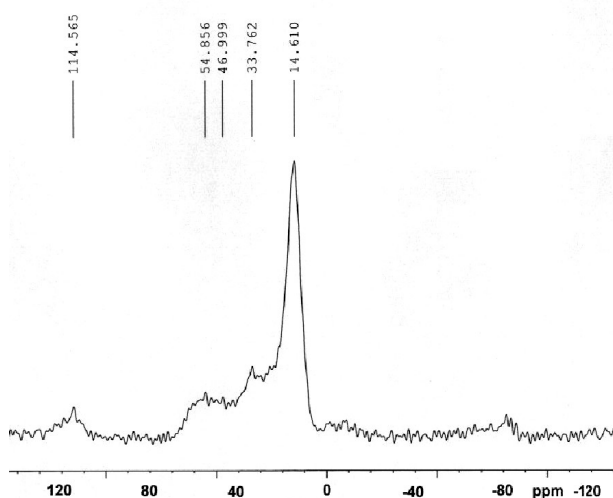
Vzorky	Obsah fenolických skupin OH [% hm.]		
	A	B	C
Uhlí Dukla	1,0	1,1	1,4
Uhlí ČSA	5,2	5,4	5,3

vybrány odpovídající srovnávací sloučeniny a jedna směs (viz výše). Jejich ^{27}Al MAS NMR spektra potvrdila vhodnost výběru.

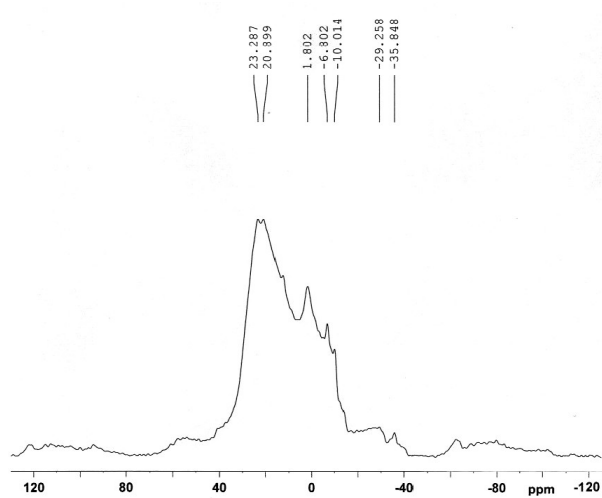
Ve ^{27}Al MAS NMR spektrech sušin výluhů z černého uhlí z dolu Dukla byla nalezena výrazná odezva (pík) při 13,5–14,8 ppm, často při 14,5 ppm (obr. 1), odpovídající symetrickému píku při 14,2 ppm nalezenému u $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, který vytváří Al hexakoordinovaný s kyslíkem v oktaedrickém uspořádání⁵ (obr. 2), a píku 14,2 ppm u směsi hexafluoridového komplexu Al a chloridu Al-fulcyaninu (obr. 3). Pík na obr. 1 lze tedy připsat Al hexakoordinovanému s kyslíkem, což vyplývá i z uvedené schopnosti Al vytvářet organické komplexy s vazbou Al–O. U srovnávací směsi jde o Al hexakoordinovaný s fenolickým kyslíkem, protože jiný kyslík tato směs neobsahovala. Pík identifikovaný v sušině výluhu uhlí z dolu Dukla proto náležel Al hexakoordinovanému s fenolickým kyslíkem. Sušina výluhu měla jednoznačně organický charakter (tabulka II) a vysoký obsah fenolů, vyplývající ze stanoveného obsahu fenolických skupin OH (tabulka III). Přítomnost hexafluoridového komplexu hliníku je velmi pravděpodobná také vzhledem k vysokému obsahu fenolických struktur v původním uhlí z dolu Dukla a jeho frakcích¹². Komplex má oktaedrické uspořádání organických



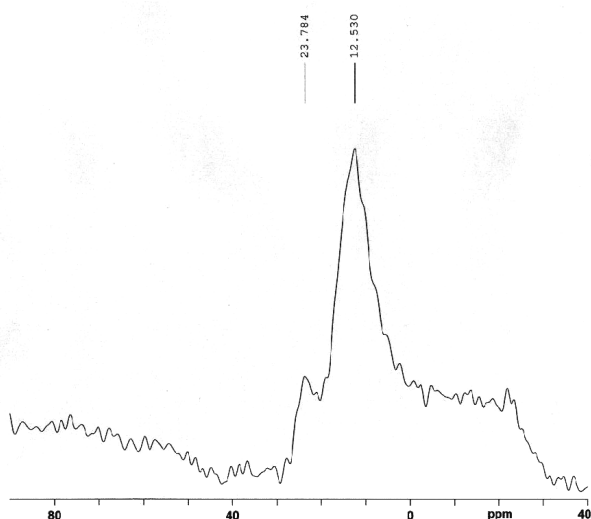
Obr. 4. ^{27}Al MAS NMR spektrum chloridu Al-fulcyaninu; píky při –20,2 a –35,2 ppm náležejí Al tetrakoordinovanému s pyrrolovým dusíkem a vazbě Al–Cl



Obr. 5. ^{27}Al MAS NMR spektrum sušiny výluhu z hnědého uhlí z velkolomu ČSA; pík při 14,6 ppm odpovídá Al hexakoordinovanému s kyslíkem



Obr. 7. ^{27}Al MAS NMR spektrum fenolátu hlinitého; dvojitý pík při 23,3/20,9 ppm odpovídá Al vázanému na 3 atomy kyslíku



Obr. 6. ^{27}Al MAS NMR spektrum chloridu Al-naftalocyaninu; pík při 12,5 ppm náleží Al tetrakoordinovanému s pyrrolovým dusíkem a vazbě Al–Cl

ligandů, což vyplývá z sp^3d^2 hybridizace valenčních orbitalů Al.

Srovnávací směs vykázala kromě píku při 14,2 ppm také píky při $-20,3$ a $-35,2$ ppm (obr. 3). Srovnání se spektrem chloridu Al-ftalocyaninu samotného (obr. 4) potvrdilo, že tyto píky náleží Al ve ftalocyaninovém komplexu. Je zřejmé, že tento ftalocyaninový komplex hliníku se v uhelné substanci nevyskytoval, o čemž svědčí evidentní odlišnost spektra sušiny výluhu z uhlí z dolu Dukla na obr. 1 a chloridu Al-ftalocyaninu na obr. 4.

Obdobné výsledky byly získány u sušiny výluhů z hnědého uhlí z velkolomu Čs. armády, kdy byl detego-

ván výrazný pík při 13,6–14,6 ppm (obr. 5) odpovídající opět píku při 14,2 ppm na obr. 2 a obr. 3 a svědčící o přítomnosti hexafenoxidového komplexu hliníku. Tě nasvědčuje i vysoký obsah fenolických OH skupin v sušinách výluhů uvažovaného uhlí (tabulka III).

Hexafenoxidový komplex hliníku je sloučenina v uhlí dosud nezjištěná.

Pík při 13,6–14,6 ppm může odpovídat také naftalocyaninovému komplexu hliníku, protože jeho pík při 12,5 ppm (obr. 6) je blízký píku nalezenému v sušinách výluhů. Pro přítomnost tohoto komplexu hovoří i relativně vysoká koncentrace chloru ve výluhu uhlí ČSA (485 ppm) a zjištěná velmi vysoká afinita chloru k organické hmotě sledovaného hnědého uhlí (96,8 %).

Je známo, že hliník vytváří fenolát hlinitý, jehož charakteristiky uvádí příručka⁹. Možnost jeho výskytu v uhlí byla proto rovněž sledována. Z porovnání uvedených ^{27}Al MAS NMR spekter sušiny výluhů černého i hnědého uhlí a spektra fenolátu hlinitého (obr. 7) vyplývá, že tato sloučenina se v uhelné substanci nevyskytovala. Hliník tedy v uhlí vytváří nikoli jednoduché, ale komplexní sloučeniny.

Závěr

V sušinách výluhů černého a hnědého uhlí získaných dlouhodobým loužením 2-methoxyethanolem za laboratorní teploty a následným šetrným odpařením činidla byl metodou ^{27}Al MAS NMR nalezen hexafenoxidový komplex hliníku, velmi pravděpodobně s oktaedrickým uspořádáním organických ligandů Al. Naproti tomu se předpokládaný ftalocyaninový komplex hliníku v uvažované uhelné složce nevyskytoval, avšak přítomnost naftalocyaninového komplexu hliníku není vyloučena.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky jako grantový projekt č. 105/02/0163 a Akademií věd ČR v rámci výzkumného záměru AVOZ30460519.

LITERATURA

1. Bouška V., Pešek J., Sýkorová I.: Acta Montana Ser. B 10(117), 53 (2000).
2. Straka P., Náhunková J.: Acta Geodyn. Geomater. 1, 245 (2004).
3. Bouška V., Pešek J.: Folia Musei Rerum Nat. Bohem. Occidentalis – Geol. 42, 3 (1999).
4. Shriver D. F., Atkins P. W.: *Inorganic Chemistry*. Oxford University Press, Oxford 1999.
5. Gažo J., v knize: *Všeobecná a anorganická chémie*. Str. 479. Alfa, Bratislava 1981.
6. Klika Z., Mrozek S., Kolomazník I.: Uhlí Rudy Geologický průzkum 6, 9 (1999).
7. Klika Z., Kolomazník I.: Fuel 79, 659 (2000).
8. Spasov S., Kamenov L., v knize: *Jaderná magnetická rezonance v organické chemii*. Str. 13. SNTL, Praha 1981.
9. Raghavan P., Holden N. E., Pyykkö P., v knize: *Handbook of Chemistry and Physics*. 74. vyd. (D. R. Lide, ed.), str. 9/156. CRC Press, Boca Raton 1993–1994.
10. Straka P., Klika Z.: *5th European Conference on Coal Research & Its Applications, Edinburgh, 6 – 8 Sept. 2004*, Book of Abstracts (Thompson A., ed.), Session 9 – Trace Elements, No. 5.
11. Bhaumik I. K., Murkherjee A. K., Murkherjee P. N., Kahiri A.: Fuel 41, 443 (1962).
12. Zubková H.: *Doktorská disertační práce*. VŠCHT v Praze, Praha 2003.
13. ČSN 44 1378: *Tuhá paliva – Stanovení obsahu popela* (leden 1981).
14. Buryan P., Macák J.: Chem. Listy 69, 457 (1975).
15. Buryan P., Macák J.: Chem. Listy 71, 829 (1977).

P. Straka^a and Z. Klika^b (^a*Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Faculty of Mining, Technical University, Ostrava*): **Identification of Aluminium Complexes in Coal by Solid State NMR Spectroscopy**

On the basis of solid-state NMR measurements organoaluminium complexes in coal substance are presented. Solid extracts obtained from the Ostrava-Karviná bituminous coal and from the North Bohemian brown coal were used. It was found that the significant chemical shift at 13.5–14.8 ppm corresponds to that obtained for the hexaphenolatoaluminium complex (14.2 ppm). This shift can be also ascribed to the Al-naphthalocyanine complex. Hence, organoaluminium compounds coordinated to six oxygens are present in coal substance.

NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

DOPORUČENÍ IUPAC

Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Inorganic and Polymeric Gels and Networks, and Inorganic Polymeric Materials

This document defines terms related to the structure and processing of inorganic, polymeric and hybrid inorganic-polymeric materials from precursors, through gels to solid products. It is divided into four sections, precursors, gels, solids and processes and the terms have been restricted to those most commonly encountered. For the sake of completeness, and where they are already satisfactorily defined for the scope of this document, terms from other IUPAC publications have been used. Otherwise, the terms and their definitions have been assembled in consultation with experts in the relevant fields. The definitions are intended to assist the reader who is unfamiliar with sol-gel processing, ceramization and related technologies and materials, and to serve as a guide to the use of standard terminology by those researching in these areas.

Otiskujeme synopsis názvoslovného návrhu z oboru anorganických polymerních gelů a materiálů, který byl připraven Divizí IUPAC pro anorganickou chemii a Divizí pro polymery. Návrh je určen k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR

Heyrovského nám. 2

162 06 Praha 6

tel. 296 809 322, fax 296 809 410, e-mail kah@imc.cas.cz

Návrh je též vystaven na webové stránce IUPAC na adrese <http://www.iupac.org/reports/provisional/index.html>

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 31. července 2006 na adresu:

Prof. Richard G. Jones

University of Kent

School of Physical Sciences

Centre for Materials Research

Canterbury, Kent CT2 7NR

Velká Británie

Tel: +44 (1227) 823 544, Fax: +44 (1227) 827 558

E-mail: R.G.Jones@kent.ac.uk

OPRAVA

V čísle Chem. Listy 100, 302 (2006) jsme uvedli chybnou informaci v rubrice Zákony, které ovlivní život chemiků v článku Odborná způsobilost chemiků.

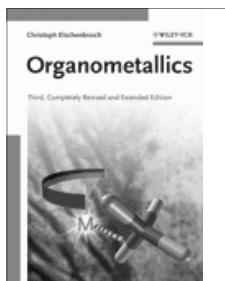
Správné znění bodu 3 v odstavci (1a) §44b Zákona o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů 258/2000 Sb. ve znění pozdějších úprav je následující:

„3. získali vysokoškolské vzdělání v oblasti skupiny učitelských oborů se zaměřením na chemii, nebo“

Všem čtenářům se omlouváme

redakce

RECENZE



Christoph Elschenbroich:
Organometallics
Vydal Wiley-VCH, Weinheim
2006. 3. vydání, 804 stran.
ISBN 3-527-29390-6

Třetí anglické vydání známé učebnice organokovové chemie Ch. Elschenbroich, A. Salzer: „Organometallics A Concise Introduction“ vychází krátce po pátém německém vydání. Autorem je tentokrát vzhledem k tomu, že Albrecht Salzer „přehodnotil své priority“, pouze Christoph Elschenbroich. To se zřejmě projevilo na dlouhé době, která uplynula od druhého anglického vydání (čtrnáct let). Původní dílo bylo kompletně přepracováno a rozšířeno o více než 300 stran, přitom koncepce a členění knihy zůstaly zachovány.

Po úvodních třech kapitolách, věnovaných historickému přehledu, klasifikaci organokovových sloučenin a vlastnostem vazby kov-uhlík, následuje osm kapitol věnovaných chemii organokovových sloučenin nepřechodných prvků. Jednotlivé kapitoly jsou řazeny podle skupin periodického systému a jsou dále členěny podle jednotlivých prvků. U každého prvku je pak diskutována příprava, struktura, typy vazeb a reaktivita organokovových sloučenin. Tam, kde je to vhodné, je provedena exkurze do spektrálních vlastností sloučenin příslušného kovu. Rovněž členění části věnované organokovovým sloučeninám přechodných kovů podle typů ligandu zůstalo zachováno. Tato část obsahuje osm kapitol zahrnujících úvod, σ -donorové ligandy, σ -donorové/ π -akceptorové ligandy, σ, π -donorové/ π -akceptorové ligandy, vazbu kov-kov a klastry). Nově byla zařazena kapitola věnovaná organokovovým sloučeninám lantanoidů a aktinoidů (25 stran). Poslední kapitola „Organometallic Catalysis in Synthesis and Production“ byla kompletně přepracována a rozšířena. Tato kapitola představuje velmi zdařilý přehled současných katalytických reakcí, které jsou využívány v organické syntéze a v průmyslové výrobě. Přitom zdaleka nejde o povrchní výčet metod, ale u každé reakce je diskutován podrobný mechanismus a opominuto není ani enantio-selektivní provedení těchto reakcí. Appendix byl nově rozšířen o redoxní činidla používaná v chemii organokovových sloučenin.

Autorovi se velmi zdařilým způsobem podařilo zahrnout výsledky, kterých bylo od posledního vydání na poli chemie organokovových sloučenin dosaženo. Navíc jsou výběr materiálu a způsob jeho prezentace tradičně vynikající. Kniha je primárně určena jako učebnice organokovové chemie. Podle autora obsahuje materiál vhodný pro roční kurz, který se koná dvakrát týdně. Stává se tak velmi užitečnou pomůckou pro studenty a učitele anorganické, organické, organokovové, koordinační a bioorganické

chemie. Mimoto kniha jistě výborně poslouží jako zdroj informací všem, kdo se zabývají syntetickou organickou chemií, anorganickou chemií a organokovy, a to jak na úrovni základního výzkumu, tak v průmyslu.

Dalimil Dvořák

Marko Zlokarnik:

Scale-up in Chemical Engineering

Vydal Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim
2006. Druhé, zcela přepracované a rozšířené vydání,
271 stran, 190 literárních citací na původní prameny.
ISBN: 3-527-31421-0

Druhé, zcela přepracované a rozšířené vydání této monografie (první vydání vyšlo v roce 2002 a bylo rychle rozebráno) svědčí o stále aktuálnosti problému zvětšování měřítka aparátů při přenosu dat, poznatků a zkušeností z laboratoře přes pilotní jednotky do průmyslové aplikace. Je tedy evidentní, že text nového vydání této knihy zaujme chemické inženýry, technology, projektanty, kteří velmi často hledají odpovědi na rozličné, prakticky významné otázky. Jako příklady upoutávek na recenzovanou knihu lze uvést:

- Jak se homogenizují směsi kapalin rozdílné hustoty a viskozity?
- Jak dosáhnout požadované homogenizace směsi s vynaložením minimální práce?
- Na čem závisí zádrž plynu v probublávaných kolo-nách?
- Jaké parametry jsou významné pro separaci částic v cyklonech?
- Co ovlivňuje koalescenci v systémech plyn-kapalina?
- Jak zvětšit měřítko mechanického rozražeče pěny nebo flotačního aparátu?
- Jak optimalizovat míchání reaktoru s ohledem na ma-ximální odvod reakčního tepla?
- Které parametry ovlivňují tabletování prášků?
- Jak zvětšovat měřítka mísičů sypkých hmot nebo apa-rátů pro výrobu emulzí?
- K čemu je užitečná rozměrová analýza vlivu přenosových jevů na reagující systémy?
- Jak rozměrovou analýzou vysvětlit Weissenbergův jev?
- Lze pomocí rozměrové analýzy pochopit mechanické procesy s ne-newtonovskými tekutinami?

Výklad je postaven na 53 prakticky zajímavých řeše-ných úlohách, které ukazují velkou zkušenost a odborný nadhled autora, který působil 35 let v inženýrském odděle-ní společnosti BAYER AG, Leverkusen, Německo a před-nášel na různých univerzitách v Německu, Rakousku a Švýcarsku.

Monografii Zlokarnika není co vytknout, tím spíše ji lze doporučit všem, kdo se chtějí podrobně seznámit s metodikou a možnostmi rozměrové analýzy, která představuje důležitý stupeň při hledání vztahů mezi parametry složitých, na první pohled neprůhledných systémů. Pro potřeby výuky je text ještě doplněn 25ti problémy k přemýšlení s uvedenými výsledky řešení. Lze ji tedy jistě doporučit k využití postgraduálním studentům v technologických a chemicko-inženýrských oborech.

Jiří Hanika

Siegfried Stampf, Song-I Han, (ed.):
NMR Imaging in Chemical Engineering
 Vydal Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim
 2006, první vydání, 620 stran, nepřeborné množství
 literárních citací na původní prameny.
 ISBN: 3-527-31234-X

Je asi troufalost psát recenzní hodnocení na monografii z oblasti NMR člověkem, který v oboru nukleární magnetické rezonance aktivně nepůsobí. Nicméně, posuzovaná kniha je jedinečná svým zaměřením a představuje velice inspirativní čtení, jak lze uvedenou metodou experimentálně a v režimu on-line pozorovat jevy, obtížně postižitelné jinými technikami. Odborná i laická veřejnost si již zvykla na to, že metoda NMR není jen výsadou organických či analytických chemiků, ostatně příkladů aplikací třeba z oblasti medicíny je jistě dnes již dostatek. Ovšem je velmi cenné, že shrnutí poznatků a řady příkladů o možnostech využití uvedené metody v oboru chemicko-

inženýrského výzkumu najde čtenář v uvedené knize přemnoho. Vznikla totiž za přispění úctyhodného počtu 71 autorů ze špičkových laboratoří USA, Kanady, Velké Británie, Německa, Ruska, Brazílie a Nového Zélandu.

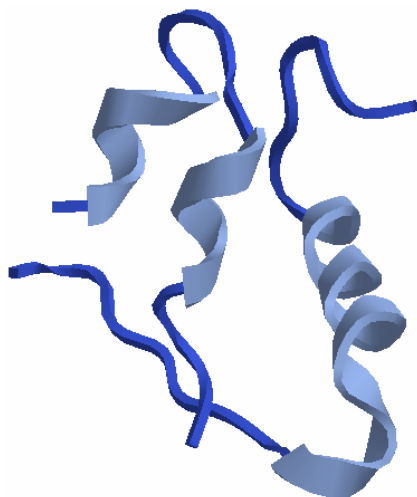
Čtenář se tak dozví, jak s využitím nukleární magnetické rezonance studovat v dynamickém režimu difuzi v nano-porézních materiálech, „zviditelňovat“ filtrační procesy, zkoumat tok tekutin, emulzí, sypkých hmot, hodnotit kvalitu stavebních materiálů, potravin a zkoumat mnoho dalších zajímavých systémů. Editoři z vedoucích světově respektovaných laboratoří univerzit v Aachen a Santa Barbara vyzvali také některé z autorů ke zpracování kapitol o aplikaci techniky NMR k výzkumu chování reaktorů a reakčních soustav. Za zmínku jistě stojí třeba „zviditelňování“ toku plynu a kapaliny v reaktoru se zkrápnou vrstvou katalyzátoru, transportních jevů v biofilmech, bioreaktorech a mnoho dalších zajímavých aplikací. Kniha vyniká mnoha názornými ilustracemi diskutovaných aplikací.

Recenzovanou monografii nepochybně uvítají všichni ti, kteří se chtějí podrobně seznámit s nejmodernější experimentální metodikou a jejích současných možnostech. K jejímu studiu čtenář vystačí jen se znalostmi běžné inženýrské matematiky, v knize se narozdíl od učebnic NMR spektroskopie nepoužívají nástroje kvantové mechaniky. Lze ji tedy doporučit k využití jak zkušeným odborníkům, kteří mají přístup k náročné experimentální technice a rovněž tak ke studiu zaníceným postgraduálním studentům v chemicko-technologických a chemicko-inženýrských oborech, kteří mají vůli překonat tradiční stereotypní přístupy k řešení technických problémů.

Jiří Hanika



SIGMA-ALDRICH



VI KONFERENCE MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH VĚDECKÝCH A
VÝZKUMNÝCH PRACOVNÍKŮ Z OBORŮ CHEMIE, BIOCHEMIE,
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A OBORŮ PŘÍBUZNÝCH,
POŘÁDANÁ FIRMOU SIGMA-ALDRICH

14.6. – 17.6. 2006

Devět skal - Žďárské vrchy

sborník redigovali

Radmila Řápková, Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VI Mezioborové setkání mladých vědeckých a výzkumných pracovníků z oborů chemie, biochemie, molekulární biologie a oborů příbuzných

Byl jsem požádán editorem, abych napsal úvodní slovo ke sborníku prací VI. mezioborové konference mladých biologů a chemiků. Protože je to již šestá konference, asi těžko vymyslím originální provolání přání zdaru, či zbrusu nové provolání radosti nad tím, že projekt, který jsme před mnoha lety spolu s dalšími nadšenci začali, zdárně pokračuje. Když jsem zmínil nadšence, chtěl bych poděkovat celému týmu, který se na organizaci nyní podílí. Snahou je, obsáhnout jak oborovou pestrost oponentů, tak jejich geografické rozmístění po celé republice. Nyní v odborné komisi pracují (uvádím jména bez titulů, protože než tento sborník vyjde, určitě dojde změnám, jak tomu bylo zatím u každého ročníku) : Jaroslav Blahoš, ÚEM AVČR, Praha, Jiří Damborský, MU, Brno, Pavel Drašar, VŠCHT, Praha, Libor Grubhoffner JU, České Budějovice, Martin Kotora, PřF UK, Praha, Jitka Moravcová, VŠCHT, Praha, Šárka Pospíšilová, FN, Brno, Ivo Starý, UOCHB AV ČR, Praha, Jitka Ulrichova, UP, Olomouc. Všem mockrát děkuji a velmi si vážím jejich ochoty pomoci s náročným výběrem. A nejen to, mám velikou radost, že s těmito předními odborníky mohu spolupracovat a učit se od nich. Nejradošnější však je, že kvalita přihlášených prací se stále zvyšuje, a přitom průměrný věk přihlášených se stále snižuje. Práci komise to komplikuje, protože vybrat těch 65 nejlepších prací pro osobní presentaci na konferenci není vůbec jednoduché. Ale je to rozhodně velmi milá komplikace. Je vidět, že biochemie, biologie, molekulární biologie, chemie a všechny příbuzné obory se rozvíjejí velmi dynamicky a mladí lidé o ně mají zájem. Snad tato konference pomáhá v prohlubování tohoto zájmu a usnadní budoucí komunikaci mezi jednotlivými vědci a vědeckými týmy.

Tento sborník se připravuje v měsíci březnu 2006, samotná konference se bude konat v červnu 2006. Ted' je za oknem minus pět stupňů, občas sněží a zima 2005-2006 se zdá být nekonečná. Rozhodně je to dobrá doba na práci v laboratoři, nebo studium v knihovně..... Samotná konference je ale plánována na polovinu června a tak si nyní hlavně přeji, aby bylo příznivé počasí, aby všichni, co byli vybráni mohli přijet a aby se všem, jak organizátorům, tak soutěžícím, na konferenci velmi líbilo.

mf

MUTAGENEZE LEKTINU PA-III A SOUVISEJÍCÍ ZMĚNY V AFINITNÍM CHOVÁNÍ VŮČI SACHARIDŮM – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝPOČETNÍ STUDIE

JAN ADAM^a, MARTINA POKORNÁ^a, MARTIN PROKOP^a, ZDENĚK KRÍŽ^a, ANNE IMBERTY^c, JAROSLAV KOČA^a, and MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,b}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul a ^bKatedra biochemie, PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno ^cCERMAV-CNRS, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble, Francie

Pseudomonas aeruginosa je příležitostným lidským patogenem schopným napadat lidské tkáně, je-li snížena celková imunita organismu. Dva lektiny produkované touto bakterií mají velký význam stran její virulence. Mimoto, ačkoli většina známých lektinů má vůči monosacharidům malou afinitu, lektin PA-III vykazuje vysokou afinitu vůči L-fukose – rovnovážná disociační konstanta zde leží v mikromolární oblasti¹.

Srovnáním s databází bakteriálních genomů byla odhalena existence podobných lektinů v dalších podmíněných patogenech. Jeden z nich, fytopatogen *Ralstonia solanacearum*, produkuje lektin RS-III, preferující však D-mannosu². Srovnání PA-III s krystalovou strukturou lektinu RS-III poukázalo na fakt, že za afinitní změny je pravděpodobně zodpovědná triáda aminokyselin v „sacharid-vázající smyčce“, což bylo potvrzeno experimenty s designovanými, připravenými a krystalizovanými mutanty PA-III. Pro stanovení termodynamických parametrů interakce byla využita isothermální titrační mikrokolorimetrie.

Paralelně s experimentálním studiem interakcí těchto mutantů byl zahájen projekt využívající metod výpočetní chemie. Prostřednictvím mutagenese *in silico* a dokovacích experimentů za předpokladu výsledků korelujících s experimentálními daty, cílem tohoto projektu je vyvinout spolehlivou *in silico* metodu pro předpovídání budoucích interakcí.

LITERATURA

- Mitchell E.P., Sabin C., Šnajdrová L., Pokorná M., Perret S., Gautier C., Hofr C., Gilboa-Garber N., Koča J., Wimmerová M., Imberty A.: Proteins: Struct. Func. Bioinform. 58, 735 (2005).
- Sudakevitz D., Kostlánová N., Blatman-Jan G., Mitchell E., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D.J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: Mol. Microbiol. 52, 691 (2004).

ROLE METALOTHIONEINU PŘI DIAGNOSTICE A PRŮBĚHU NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

VOJTĚCH ADAM^{a,b}, JITKA PETRLOVÁ^b, ONDŘEJ BLAŠTÍK^b, MICHAL SVOBODA^b a RENÉ KIZEK^b

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bÚstav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno
ilabo@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

Nádorová onemocnění jsou celosvětově zodpovědná za 7 milionů úmrtí ročně a podle Světové zdravotnické organizace jejich počet bude v nejbližších letech růst. Nejen z tohoto důvodu vyhlásilo mnoho zemí po celém světě programy zaměřené na pokles výskytu zhoubných onemocnění v populaci. Jedním z cílů programu vypsaného Ministerstvem zdravotnictví ČR a Českou onkologickou společností je zlepšení časné diagnostiky mezi něž náleží i hledání nových potencionální markerů tohoto zhoubného onemocnění. Jak se ukazuje, jedním z nových potencionálních markerů by mohl být protein metalothionein (MT). MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6–10 kDa. Nejnovější výzkumy naznačují, že pravděpodobně existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru. V naší práci jsme se zaměřili na potvrzení hypotézy metalothioneinu jako potencionálního nádorového markeru. Pro tyto účely jsme využili různých elektrochemických technik. Nejprve jsme se snažili zvolit a optimalizovat techniku vhodnou pro stanovení velmi malých koncentrací MT nejen pro jeho samotnou sensitivní detekci, ale především pro možnost sledování jakýchkoliv změn jeho hladiny v lidském organismu. Pro tyto účely jsme optimalizovali chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu (CPSA) ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou (AdTS), kde jsme dosáhli detekčního limitu 11 zmol. Souběžně s optimalizací techniky AdTS CPSA jsme se zaměřili na ověření metalothioneinu jako nádorového markeru. Pro tyto účely jsme AdTS ve spojení s diferenční pulsní voltametrií – Brdičkova reakce. Před více než sedmdesáti lety objevil Rudolf Brdička katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. Tato metoda byla dále vylepšena a využita pro analýzu proteinů krevních sér pacientů s nádorovým onemocněním. Celkem jsme analyzovali krevní séra 72 pacientů, u nichž bylo diagnostikován melanom, nádor prsu, plic, štítné žlázy, ledvin, jícnu, tlustého střeva, anebo lymfoidní leukémie. U všech typů zhoubných nádorů byl pozorován nárůst obsahu MT 2 až 5krát v porovnání s hladinou zdravých lidí, která je okolo 0,6 μM. Zjistili jsme, že nejnižší obsah MT byl v krevním séru pacientů s nádory prsu, u nichž byl průměrný obsah MT 1,6 μM, přičemž u 9 pacientů překročila hladina MT 1 μM (64 %). V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT 1,97 μM. U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT absolutně nejvyšší a dosahovala hodnot 3,2 μM. Z námi získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že hladina sérového MT výrazně stoupá u většiny pacientů se zhoubnými nádory.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GA ČR 525/04/P132.

LITERATURA

- Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: Anal. Chem. 73, 4801 (2001).
- Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: Bioelectrochemistry 56, 57 (2002).

3. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Nemeč M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
4. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnaek J., Adam V., Petřlova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* 51, A56 (2005).

IMOBILIZACE SOUBORŮ BIOLOGICKÝCH A SYNTETICKÝCH MAKROMOLEKUL NA PEVNÉ PLOCHY

KAROLÍNA BOHATÁ, EDUARD BRYNDA a MILAN HOUSKA

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v Praze, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6

Cílem práce byla tvorba a studium stability multivrstevných systémů globulárních proteinů a polyelektrolytů na pevných površích. Multivrstvy byly vytvořeny pomocí postupné depozice (tzv. layer-by-layer method), která je založena na opakovaném střídání adsorpce proteinu a opačně nabitých polyelektrolytů.

Multivrstevné soubory byly imobilizovány na hydrofobní povrch (polystyrenový film nanosený na ZnSe krystalu). Jejich tvorba a stabilita byla sledována metodou reflexní infračervené spektroskopie (ATR-FTIR Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared). Výzkum byl především zaměřen na studium faktorů (pH, iontová síla, neionogenní detergenty) ovlivňujících tvorbu a stabilitu vícevrstevných systémů složených z bílkovin a polyelektrolytů. Experimenty ukázaly, že tvorba a stabilita multivrstev bílkovin a polyaniontů může být snadno kontrolována pomocí pH roztoku, přičemž lze tyto soubory rozpustit zvýšením pH nad isoelektrický bod bílkoviny. Oproti tomu soubory vytvořené z bílkovin a polykationtů se pouze z části rozpouští při snižování pH pod isoelektrický bod bílkoviny nebo zvyšováním iontové síly okolního roztoku.

Dále byla sledována depozice bílkovin z lidské krevní plazmy na povrchy modifikované multivrstvami sérového albuminu. Nežádoucí usazování bílkovin se podařilo výrazně snížit pokrytím umělého povrchu kovalentně síťovanou albuminovou dvojvrstvou, zatímco depozice byla značně vysoká, jestliže multivrstvy albuminu obsahovaly polykationty.

Potenciálně mohou být vícevrstevné soubory albuminu použity pro biokompatibilní potahování povrchů umělých materiálů přicházejících do kontaktu s krví, nebo k modifikaci povrchů zabraňujících nežádoucímu usazování (anti-fouling) bílkovin z biologických tekutin. Podobně lze multivrstvy obsahující polyklonálních nebo monoklonálních protilátek (IgG typu) použít pro přípravu afinitních povrchů optických imunosenzorů¹ nebo nosičů pro afinitní separační metody.

LITERATURA

1. Brynda E., Houska M., Wikerstál A., Brandenburg A.: *Biosensors Bioelectron.* 17, 665 (2002).

INAKTIVACE p53 A DELECE ATM V SOUBORU B-CLL PACIENTŮ VE VZTAHU K MUTAČNÍMU STATUSU IgVH A LÉČBĚ

SOŇA BUKOVSKÁ^{a,d}, M. TRBUŠEK^{a,d}, J. MALČÍKOVÁ^{a,d}, J. ŠMARDOVÁ^b, J. CHUMCHALOVÁ^{a,d}, X. SVITÁKOVÁ^b, D. MENTZLOVÁ^c, V. LINKOVÁ^c, P. KUGLÍK^c, V. KUHRVÁ^{a,d}, H. FRANCOVÁ^{a,d}, M. DOUBEK^d, Y. BRYCHTOVÁ^d a J. MAYER^d

^aCentrum molekulární biologie a genové terapie FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno, ^bPatologicko-anatomický ústav FN Brno, ^cOddělení lékařské genetiky FN Brno, ^dInterní hematologická klinika FN Brno sonabu@email.cz

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémií v západním světě. B-CLL je běžnými přístupy neléčitelná. Mutace a delece ATM a p53, spolu s mutačním statusem imunoglobulinového řetězce (IgVH) patří mezi nejdůležitější negativní prognostické faktory – p53 má navíc vliv i na léčbu (resistance na chemoterapii). Za fyziologické situace je hladina p53 velmi nízká, kinasa ATM v buňkách stabilizuje a aktivuje klíčový tumor-supresor p53 prostřednictvím fosforylace - a to v případě poškození DNA nebo v přítomnosti genotoxického stresu. Pokud je p53 mutován, není degradován a akumuluje se v buňce tato vysoká hladina proteinu je považována za negativní prognostický marker.

Delece genů ATM a p53 mapujeme cytogeneticky prostřednictvím FISH hybridizací, funkční status p53 stanovujeme pomocí analýzy FASAY, konkrétní mutace v p53 vyhledáváme sekvenováním a expresi tohoto proteinu monitorujeme Western-blotem. Dále máme k dispozici data o mutačním statusu IgVH. V souboru 168 pacientů jsme pozorovali 16 případů mutací p53 (9,5 %), všechny tyto mutace byly identifikovány sekvenováním. Delece ATM se vyskytla ve 21 případech (18 %), pouze jediný pacient měl paralelní mutaci p53 a ATM. V tomto souboru jsme pozorovali velmi silnou asociaci mezi delecí ATM a nemutovaným IgVH, též mezi mutovaným p53 a nemutovaným IgVH. Nezaregistrovali jsme vliv léčby na vznik mutací p53.

Na tomto dobře charakterizovaném souboru pacientů provádíme testy cytotoxicity – kombinace různých cytostatik a cytostatik a monoklonálních protilátek.

Tento výzkum směřuje k racionalizaci využívání kombinací chemoterapeutik u pacientů s B-CLL na základě statusu molekulárně-biologických faktorů.

NOVÉ SELEKTIVNÍ INHIBITORY CDK

PETR CANKAŘ^a, IVETA FRYŠOVÁ^a, JAN SLOUKA^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^b, PETER M. FISCHER^c a MIROSLAV STRNAD^b

^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc;

^bLaboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AVČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc; ^cThe School of Pharmacy, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, The United Kingdom

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) řídí důležité vnitrobuněčné procesy, jako je buněčný cyklus, transkripce či apoptóza. Díky své důležitosti v uvedených procesech se záhy staly významným cílem nových potencionálních chemoterapeutik cílených zvláště proti nádorovým onemocněním¹ a některé z nich jsou již ve druhé fázi klinického testování^{2,3}. Dále se uvažuje o možných farmakologických aplikacích v oblasti inhibice replikace virů a zamezení množení některých buněčných parazitů².

Rutinním testováním heterocyklických sloučenin byla identifikována nová skupina látek inhibujících katalytickou aktivitu CDK2/cyklin E kinasy. Základní sloučenina 3,5-diamino-4-fenylazopyrazol však vykazovala jen slabou inhibiční schopnost. Systematickým obměňováním substituentů na fenylové skupině (studium vztahů mezi substitucí a inhibiční aktivitou) bylo zjištěno, že hydroxy a nitroderiváty patří mezi nejúčinnější inhibitory.

S nejsilnějším inhibitorem byly provedeny další biochemické a biologické testy⁴. Kinetickým měřením bylo potvrzeno, že se jedná o kompetitivní inhibitor soutěžící ve vazebném místě s ATP, což bylo dále dokázáno pomocí rentgeno-strukturní analýzy krystalu CDK2 s inhibitorem. Rovněž byla zjištěna selektivita tohoto inhibitoru na panelu rekombinantních proteinkinás s překvapivě jedinečnou afinitou k CDK9/cyklin T1 kinase, která je součástí transkripčního elongačního faktoru P-TEFb. Inhibitor byl schopen blokovat proliferaci lidských nádorových buněčných linií MCF7, HOS, G361 a K562. Na základě získaných poznatků vztahu struktury a biologické aktivity jsou dále tyto inhibitory modifikovány za účelem vyšších inhibičních schopností CDK a lepší permeability skrz buněčné membrány.

Tato práce vznikla na základě finanční podpory MŠMT ČR v rámci výzkumného záměru MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Sielecki T.M., Boylan J.F., Benfield P.A., Trainor G.L.: *J. Med. Chem.* 43, 1 (2000).
2. Meijer L., Raymond E.: *Acc. Chem. Res.* 36, 417 (2003).
3. Benson C., Kaye S., Workman P., Garret M., Walton M., de Bono J.: *Br. J. Cancer* 92, 7 (2005).
4. Kryštof V., Cankař P., Fryšová I., Slouka J., Kontopidis G., Džubák P., Hajduch M., Fischer P.M., Strnad M.: připravováno k tisku.

OXIDATIVNÍ STRES A MITOCHONDRIE PŘI VÝVOJI KVASINKOVÝCH KOLONIÍ

MICHAL ČÁP, LUDEK ŠTĚPÁNEK a ZDENA PALKOVÁ

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2

Mnohé mikroorganismy tvoří při růstu na pevném médiu mnohobuněčné útvary – kolonie.

V naší laboratoři se zabýváme koloniemi kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jako modelovými objekty pro studium mnohobuněčných kvasinkových populací. Kolonie rostoucí po dlouhou dobu na médiu s limitovaným množstvím živin je svými vlastnostmi bližší stavu, v jakém se kvasinky nacházejí v přírodě. V koloniích spolu kvasinky mohou interagovat a předávat si různé signály, které pak vedou k rozdílné expresi genů v různých místech kolonie, buněčné diferenciaci nebo vzniku prostorově uspořádaných struktur. Jedním ze signálů, působících mezi koloniemi na dlouhou vzdálenost, je plyný amoniak. Kvasinkové kolonie jsou schopny přijímat a vysílat amoniakový signál, jehož produkce probíhá v pulsech a je doprovázena alkalizací okolního média. Jednotlivé pulsy produkce amoniaku jsou odděleny acidifikací média.

Aby byly odhaleny změny, ke kterým dochází při přechodu do fáze produkce amoniaku, byly provedeny celotranskriptomové studie změn exprese (microarrays) během tohoto přechodu. Bylo nalezeno několik skupin genů, jejichž exprese se mění. Mezi nejzápadnější změny patřilo snížení exprese genů zajišťujících mitochondriální respiraci a současně zvýšení exprese peroxisomálních genů. Tyto výsledky poukazují na změnu metabolismu buněk v koloniích. Další výraznou změnou bylo snížení exprese genů stresové odpovědi, což naznačuje snížení stresové zátěže v kolonii. O tom, jak jsou tyto změny důležité, svědčí studium kmene s delecí v genu SOK2, který není schopen produkovat amoniak a ani u něj nedochází k expresním změnám popsaným výše. Tento kmen vykazuje zhoršené dlouhodobé přežívání buněk v koloniích.

Zajímalo nás, která ze změn je pro přežívání kolonie důležitější, zda přeprogramování metabolismu, nebo ochrana proti stresu. K tomu jsem zvolil studium tří kmenů s delecí ve významných genech oxidativní ochrany (SOD1, SOD2 a CTT1). Tyto kmeny jsem charakterizoval z hlediska produkce amoniaku a dlouhodobého vývoje kolonií. Dále jsem sledoval produkci kyslíkových radikálů a množství a struktury mitochondrií během vývoje kolonií. K objasnění změn, ke kterým dochází při vývoji kolonií u těchto kmenů, jsem sledoval expresi vybraných genů.

Tato práce je podporována grantem GA ČR 525-05-0297, Centrem základního výzkumu LC 531 a doktorským projektem GA ČR 204/03/H066.

STUDY OF THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF CYP3A4

LUKÁŠ ČERVENÝ, PETR PÁVEK, LUCKA ŠVECOVÁ, and FRANTIŠEK ŠTAUD

*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05
cerveny@faf.cuni.cz*

Currently available studies indicate that two nuclear receptors, constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3) and pregnane X receptor (PXR; NR1I2), are involved in transcriptional activation of some cytochrome P450 isoenzymes. PXR and CAR are activated in the presence of a ligand and they bind as a heterodimer with retinoid X receptor (RXR) to proximal PXR response element (prPXRE) and distal xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) that are localized in regulatory regions of the *CYPs*. Recently, it has been found that rifampicine is capable of activating PXR-mediated transcription of *CYP3A4* and substances such as phenytoin and phenobarbital can activate CAR-mediated transcription of *CYP2B6*.

The aim of our study was to test several antiepileptic drugs for their ability to activate CAR- and/or PXR-mediated transcription of *CYP3A4* gene. For this purpose HepG2 cells were co transfected with the human expression vector pCR3-CAR or pSG5-PXR human expression vector and with XREM-CYP3A4-Luc reporter construct inserted into pGL3-basic vector. This construct contained the prPXRE (362/+53) and XREM (7836/-7208) of *CYP3A4* driving luciferase gene expression.

Eight antiepileptic drugs were tested in this model for detection of CAR activators of *CYP3A4* transcription; in particular: primidone, ethosuximid, clonazepam, carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, valproate and lamotrigine. Phenytoin and valproate at a concentration of 25 μM significantly increased CAR-mediated transcriptional activity of *CYP3A4* (1.7 fold and 1.3 fold, respectively). Further, concentration dependence of CAR-mediated transcriptional activation of *CYP3A4* on concentration of valproate was investigated. Increase in the CAR mediated transcriptional activity was observed for all concentrations tested ($\text{EC}_{50} = 177.14 \mu\text{M}$). Additionally, the same concentration range of valproate was used to test PXR mediated transcriptional activation of *CYP3A4*. Increase of PXR-mediated transcription was observed for all concentrations tested ($\text{EC}_{50} = 305.7 \mu\text{M}$).

Based on these cell-based reporter assays valproate seems to be capable to activate both CAR and PXR and we suppose valproate activates CAR more effectively than PXR. These findings should be proved by further studies (RT-PCR).

SOLUBLE FORMS OF BOAR SEMINAL PLASMA HYALURONIDASE

**M. CIBULKOVÁ^{a,b}, P. MAŇÁSKOVÁ^a,
V. JONÁKOVÁ^a, and M. TICHÁ^b**

^aDepartment of Biochemistry of Reproduction, Institute of Molecular Genetics, AS CR, Prague 6; ^bDepartment of Biochemistry, Charles University, Prague 2

The sperm membrane-bound hyaluronidase (PH-20) is known to be essential for fertilization in different species. However, the male reproductive tract contains also soluble forms of this enzyme, whose role is not fully understood. In some species, it is believed that these soluble forms are

mostly degradation products of the membrane-bound enzyme. In this study, we have investigated different forms of soluble hyaluronidase in boar seminal plasma, that have not been characterized yet.

Two forms of soluble hyaluronidase were detected in boar seminal plasma (rel. mol. masses 50 000 and 65 000) using SDS-electrophoresis and zymographic method. These two forms can be separated by means of affinity chromatography on heparin-Sepharose. They differ besides their affinity to heparin, also in the pH optimum of their enzyme activity. The soluble form with rel. mol. mass 50 000 was active both at the acidic (pH 3.7) and the neutral pH (pH 7.4) and was bound to immobilized heparin. The second form (rel. mol. mass 65 000) was active only at acidic pH and did not interact with heparin. Soluble hyaluronidase with affinity to heparin (50 000) was detected in epididymal fluid and in the SDS-extract of boar spermatozoa. Hyaluronidase of rel. mol. mass 65 000, without affinity to heparin, was found in boar seminal vesicles fluid.

Further studies are necessary to find out a relationship between the soluble forms of boar hyaluronidase and the membrane-bound one and to learn about their physiological function in the reproduction process.

This work was supported by grants No. 303/04/P070 and 303/06/0895 GA CR and by the project AVOZ 50520514 AS CR.

POKROKY V CHARAKTERIZACI LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU Z LAREV MASAŘKY *NEOBELLERIA BULLATA*

**ALICE CIENCIALOVÁ^{a,b}, TEREZA NEUBAUEROVÁ^c, RADEK ŠINDELKA^d, MILOSLAV ŠANDA^a, JOSEF CVAČKA^a, BOHUMÍR KOUTEK^a
a JIŘÍ JIRÁČEK^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra biochemie PFF UK, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^cKatedra biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^dÚstav molekulární genetiky AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6 ciencial@uochb.cas.cz

Objev antibiotik v třicátých letech minulého století znamenal revoluci v historii medicíny. Nadměrné používání antibiotik však vedlo k nárůstu rezistence bakterií vůči antibiotikům. Od roku 1960 do roku 2000, kdy byly zavedeny linezolidy, nebyla na trh uvedena žádná nová třída antibiotik. I přes toto přehlížení některé společnosti stále hledají nové látky s antimikrobiálním účinkem, například na bázi peptidů 1.

Jako zdroj izolace takových peptidů jsme vybrali organismus, který často přichází do střetu s bakteriálními infekcemi masařku *Neobellieria bullata*. K indukci tvorby antibakteriálních peptidů u larev *Neobellieria bullata* jsme používali bakteriální suspenzi. Po několika hodinách inkubaci byla izolována hemolymfa a postupnou centrifugací a srážením byly odděleny frakce obsahující

nízkomolekulární peptidy a proteiny. Získané frakce byly dále děleny chromatografickými metodami. Izolované látky byly charakterizovány pomocí SDS-PAGE, MALDI nebo ESI hmotnostní spektrometrií. Antimikrobiálně aktivní proteinové a peptidové frakce byly identifikovány *N*-terminální sekvenací a analýzou tryptických štěpů MALDI-MS nebo ESI-MS/MS a porovnáním s údaji v databázích. Antimikrobiální aktivita frakcí byla detekována metodou vyhodnocování odezvy růstu patogenních mikroorganismů v závislosti na přítomnosti testované látky. Pro testování byly použity bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. V izolovaných frakcích se nám podařilo identifikovat již známé antimikrobiální peptidy, 40 aminokyselinový sapecin a dipeptid β -alanyltyrosin. Antimikrobiální aktivitu vykazovala také frakce identifikována jako transferin a zatím neidentifikovaný 16 kDa protein. Izolovaný β -alanyltyrosin byl analyzován pomocí ionexové chromatografie s ampérometrickou detekcí a byla zjištěna přítomnost příměsi, která nebyla oddělitelná pomocí RP-HPLC. Další peptidy jsou postupně izolovány a analyzovány z hlediska antimikrobiálních vlastností.

Dále jsme izolovali RNA z celých larev a z hemocytů indukovaných i neindukovaných larev. Metodou q-PCR jsme sledovali změny exprese identifikovaných antimikrobiálně aktivních frakcí u indukovaných a neindukovaných larev. 2D-elektroforézy jsme využili k porovnání proteomu indukovaných a neindukovaných larev a ke zjištění proteinů, které se mohou podílet na imunitní odpovědi *Neobellieria bullata*.

Tato práce je podporována grantem GA ČR 203/05/0832, FRVŠ grantem 315/2005 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

1. McPhee J.B., Hancock R. E. W.: *J. Pept.Sci.* 11, 677 (2005).

KLONOVÁNÍ A PURIFIKACE CATHEPSINU B2 Z CERKÁRIÍ PTAČÍ SCHISTOSOMY *TRICHOBLHARZIA REGENTI*

KATEŘINA DOLEČKOVÁ^a, LIBOR MIKEŠ^a, PETR HORÁK^a a ADRIAN MOUNTFORD^b

^a*Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 7, 128 44 Praha,* ^b*The University of York, Department of Biology (Area 5), YO10 5YW York, UK.*
k.doleckova@centrum.cz

Trichobilharzia regenti, parazitická motolice vodních ptáků z čeledi Schistosomatidae, má neobvyklou životní strategii. Na rozdíl od běžných schistosom, které využívají k migraci krevní řečiště, vyhledává *T. regenti* po proniknutí kůží periferní nervový systém a postupuje dál míchou a mozem, až do nosní dutiny definitivního hostitele, kde dospělci kladou vejce. Migrace způsobuje degradaci tkání a neuro-motorické poruchy jak u specifických (vodní ptáci), tak u nespecifických hostitelů (experimentálně nakažené myši).

Do kůže definitivního hostitele se invazní larvy (cerkárie) dostávají díky aktivní penetraci. K tomu jim slouží penetrační žlázy, jejichž obsah začnou cercárie po kontaktu s kůží hostitele vyprazdňovat. Exkrečně sekreční produkty žláz obsahují řadu látek, např. proteasy serinového a cysteinového typu, lektiny, vápník, eikosanoidy, calreticulin, mukopolysacharidy apod.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium proteas. Tyto enzymy umožňují parazitům pronikat do hostitelských tkání a trávit je, unikat imunitní odpovědi hostitele nebo naopak hostitelskou imunitu stimulovat. Ze studia na lidských schistosomách vyplynulo, že právě proteasy by se mohly stát slibnými serodiagnostickými markery nebo potenciálními cíli pro vývoj nových chemoterapeutik.

Na základě sekvenčně homologii aktivních konzervovaných míst cathepsinů B známých u lidských schistosom byly vytvořeny degenerované primery a provedena PCR. Byl získán DNA fragment o délce cca 600 bp. Po porovnání s databází DNA sekvencí BLAST byl rozpoznán jako částečná nukleotidová sekvence pro cathepsin B, pracovním názvem označený jako TrCB2.

Využitím sekvenčně specifických primerů byla provedena 5' a 3' amplifikace konců (RACE) pro získání celého genu. Takto získaný gen (1032 bp ~ 344 aminokyselin) vykazoval největší homologii s cathepsin B2 z lidských schistosom (81,1 % s SJC2 ze *S. japonicum* a 79,9 % s SmCB2 ze *S. mansoni*).

Úplná sekvence TrCB2 byla poté upravena pro klonování do expresního systému methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris* a úspěšně exprimována. Identita exprimovaného proteinu byla potvrzena pomocí MALDI MS/MS spektrometrie. Hladina exprese byla sledována u pěti klonů, z nichž se jako nejvíce produktivní ukázal klon TrCB2-4, jehož exprimovaný protein – cathepsin B2 byl následně purifikován v několika krocích. Po zahuštění centrifugací a odsolení média s exprimovaným proteinem pomocí dialýzy byl finálně cathepsin B2 přečištěn na FPLC katexové koloně.

Získaný rekombinantní enzym bude využit k přípravě monospecifických myších a kachních protilátek a pro funkční a biochemickou charakterizaci peptidasy.

IZOLACE A CHARAKTERIZACE LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

IVANA DOLEŽÍLKOVÁ^a, MARTINA MACKOVÁ^a, TOMÁŠ MACEK^b a TEREZA NEUBAEROVÁ^a

^a*Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, Praha 6, 166 28,* ^b*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6*
dolezili@vscht.cz

Důsledkem toho, že rostliny jsou častým cílem různých patogenních organismů, vyvinul se u nich účinný obranný systém, který má buď zabránit či eliminovat poškození způsobená např. viry, bakteriemi, houbami nebo hmyzem. V první řadě jsou to látky proteinové a peptidové povahy:

lectiny, proteiny inaktivující ribosomy, chitinasy, proteasy, defensiny, peroxidasy, peptidy na bázi ubiquitinu, ribonukleasy a peptidy s vysokým obsahem argininu a glutamátu. Další skupiny tvoří vedle látek organické povahy, zahrnující sloučeniny fenolické, nenasycené laktony, saponiny a dieny, rovněž dusíkaté látky a peroxid vodíku¹. Během posledních 15 let byla v mnoha rostlinách identifikována řada proteinů a peptidů s antimikrobiálními účinky. Antimikrobiální peptidy představují různorodou skupinu nízkomolekulárních sloučenin s různou sekvencí, délkou a strukturou. Vykazují aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů zahrnující G⁺ a G⁻ bakterie, protozoa, kvasinky, plísně a viry. U některých peptidů byl pozorován také inhibiční účinek na nádorové buňky. Proto se antimikrobiální peptidy považují za ideální kandidáty pro vývoj nových léků proti obtížně léčitelným infekcím a několik málo zástupců bylo účinných rovněž proti patogenům způsobující sexuální přenosné infekce včetně HIV/HSV².

Tato práce je zaměřena na izolaci a charakterizaci látek, především pak krátkých peptidů s antimikrobiálním a antifungálním účinkem z rostlinného materiálu. Některé z látek jsou indukovány specifickými biotickými nebo abiotickými faktory, jiné jsou vytvářeny konstitutivně. Rozličné typy antimikrobiálních látek byly získány z hmyzu, z různých částí rostlin (semen, listů, kořenů a květů) nebo mezibuněčných tekutin. Antimikrobiální peptidy byly izolovány v několika krocích srážením bílkovinných frakcí a reverzní HPLC a charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami: UV-VIS spektroskopii, SDS-PAGE elektroforézou a hmotnostní spektrometrií. Byla testována antibakteriální a antifungální aktivita s cílem prokázat účinnost a vhodnou koncentraci. Jako testovací modely byly použity patogenní a potenciálně patogenní bakterie: G⁻: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium rhizogenes*; G⁺: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumillus*, *Arthrobacter ureafaciens*. V případě testování antifungální aktivity byly použity plísně: *Fusarium culmorum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus terreus* a *Alternaria sp.* Metodicky byly použity rychlá screeningová metoda na agaru a metoda využívající přístroj Bioscreen, kde je monitorován růst bakterií v závislosti na době inkubace. Z rostlinného materiálu se podařilo izolovat frakci z listů *Nicotiana tabacum*, která působila inhibičně na houby *Cladosporium herbarum* a *Alternaria sp.*

Autoři děkují grantové podpoře GA ČR 203/05/0832.

LITERATURA

1. Wong J. H., Ng T. B.: Peptides 26, 1120 (2005).
2. Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: Int. J. Antimicrob. Agents 24, 536 (2004).

THE ENVIRONMENTAL POLLUTANT 3-NITROBENZANTHRONE AND ITS HUMAN METABOLITE 3-AMINOBENZANTHRONE INDUCE THEIR ACTIVATING ENZYMES IN RATS

HELENA DRAČÍNSKÁ^a, VOLKER M. ARLT^b,
and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 12843 Prague 2, Czech Republic; ^bSection of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom; helili@centrum.cz

The suspected human carcinogen 3-nitrobenzanthrone (3-NBA) is one of the most mutagenic nitroaromatic compounds identified in diesel exhaust and airborne particulate matter. A major metabolite of 3-NBA, 3-aminobenzanthrone (3-ABA), was detected in the urine of salt mining workers occupationally exposed to diesel emissions. Both 3-NBA and 3-ABA were investigated for their ability to induce biotransformation enzymes in rat liver and for the influence of such induction on formation of DNA adduct by these compounds. Rats were treated intraperitoneally with 0.4, 4 or 40 mg/kg body weight of 3-NBA or 3-ABA. When hepatic cytosolic fractions from rats treated with 40 mg/kg body weight of 3-NBA or 3-ABA were incubated with 3-NBA, DNA adduct formation, measured by 32P-postlabelling analysis, was 10-fold higher than in incubations with cytosols of control rats. The increase in 3-NBA-derived DNA adduct formation corresponded with a dose-dependent increase in protein expression and enzymatic activity of the major phase I enzyme activating 3-NBA in human and rat livers, NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)². Incubations of 3-ABA with hepatic microsomes of rats treated with 3-NBA or 3-ABA (40 mg/kg body weight) led to an up to 12-fold increase in 3-ABA-derived DNA adduct formation compared to controls. This observed stimulation of DNA adduct formation by both compounds was attributed to their potential to induce protein expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and/or -1A2 (CYP1A1/2), the major enzymes responsible for 3-ABA activation in human and rat livers³. In addition, experiments on modulation of mRNA expression by the studied compounds, analyzed by real-time PCR, showed the increased mRNA expression of hepatic CYP1A1 and NQO1 after treatment of rats with 40 mg 3-NBA/kg body weight. Collectively, these results demonstrate for the first time that by induction of hepatic NQO1 and CYP1A1/2, both 3-NBA and 3-ABA increase their enzymatic activation to reactive DNA adduct forming species, thereby enhancing their own genotoxic potential.

This work was supported by Grant Agency of Czech Republic (grant 303/05/2195).

REFERENCES

1. Arlt V. M.: Mutagenesis 20, 399 (2005).
2. Arlt V. M., Stiborová M., Henderson C. J., Osborne M. R., Bieler C. A., Frei E., Martínek V., Sopko B., Wolf C. R., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Cancer Res. 65, 2644 (2005).
3. Arlt V. M., Hewer A., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Stiborová M.: Chem. Res. Toxicol. 17, 1092 (2004).

PŘÍSPĚVEK KE STUDIU MECHANISMU ÚČINKU PROTINÁDOROVÉHO LÉČIVA ELIPTICINU

MARTIN DRAČÍNSKÝ^a, JAN SEJBAL^a a OBIS CASTAÑO^b

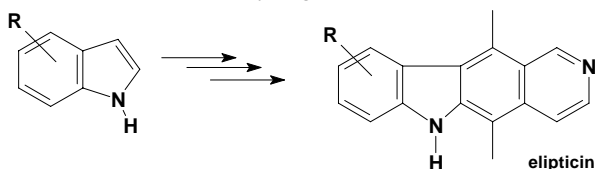
^aKatedra organické chemie PČF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bDepartamento de química física, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Španělsko
martindraca@yahoo.com

Elipticin a jeho deriváty (zejména 9-hydroxyderiváty) jsou protinádorová léčiva¹. Dosud není znám mechanismus jejich působení, silná vazba na DNA (zejména interkalace) je však nutnou podmínkou jejich účinku². V této práci byla studována syntéza elipticinu a jeho interakce s DNA pomocí teoretických výpočtů a pomocí NMR experimentů.

Syntéza elipticinu a jeho derivátů vycházela z vhodně substituovaného indolu. V pěti reakčních krocích byl získán čistý elipticin v celkovém výtěžku 12 %. Během celé reakční sekvence nebylo nutné použít chromatografické čištění. Díky syntéze některých derivátů elipticinu se podařilo ověřit strukturu produktů metabolismu elipticinu.

Výpočetní chemie je v poslední době stále oblíbenější metoda pro studium chování biomolekul a jejich interakcí s ligandy. Velmi rozšířené jsou takzvané empirické potenciály (silová pole), které jsou součástí programů pro molekulové modelování (AMBER, HyperChem, ...) a jsou používány i pro studium interkalace do DNA. V této práci byly výsledky získané pomocí empirických potenciálů porovnávány s výpočty *ab initio* a bylo zjištěno, že empirické potenciály jsou vhodné pro odhad interakčních energií mezi interkalátory a bázemi DNA, ale nejsou schopny správně zjistit vzájemné prostorové uspořádání v těchto komplexech.

Jinou možností, jak studovat interakce biomolekul, například DNA a proteinů, s malými molekulami (ligandy) je NMR spektroskopie³. Použití technik NOESY umožňuje zjištění třidimenzionální struktury molekul v roztoku za fyziologických podmínek (pH, iontová síla)^{4,5}. V této práci byly studovány interakce derivátů elipticinu s duplexy oligonukleotidů. Roztoky oligonukleotidů byly titrovány elipticinem a byly sledovány změny ¹H NMR spekter způsobené přidávkou interkalátoru. Bylo zjištěno, že elipticin tvoří s oligonukleotidy komplexy, jejichž střední doba života se pohybuje v řádu milisekund, geometrie komplexů odpovídá interkalaci. Elipticin také mění stabilitu dvoušroubovicové struktury oligonukleotidů.



LITERATURA

1. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Savcier J.M.: *Mol. Pharm.* 42, 590 (1992).
2. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1(1987).

3. Feigon J., Denny W. A., Leupin W., Kearns D. R.: *J. Med. Chem.* 27, 450 (1984).
4. Fedè A., Labhardt A., Bannwarth W., Leupin W.: *Biochemistry* 30, 11377 (1991).
5. Gao X., Patel D. J.: *Biochemistry* 28, 751 (1989).

ROLE OF MICROTUBULES NETWORK IN AhR-DEPENDENT CYP1A1 EXPRESSION IN HepG2 CELLS AND PRIMARY RAT HEPATOCYTES

ZDENĚK DVOŘÁK, RADIM VRZAL, and MARTIN MODRIANSKÝ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Cytochrome P450 (CYP) 1A1 is responsible for production of carcinogenic reactive metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons such as benzo[a]pyrene but recent developments indicate its apparent role in cell cycle progression. Expression of CYP1A1 is subject to regulation by aryl hydrocarbon receptor (AhR). We show that induction of CYP1A1 in HepG2 cells and primary rat hepatocytes by tetrachloro-*p*-dibenzodioxin (TCDD) is restricted by colchicine and nocodazole. Both compounds decrease CYP1A1 mRNA, protein, and activity levels in HepG2 cells and mRNA level in primary rat hepatocytes. Neither compound significantly affected [3H]-TCDD binding to AhR, thus their effect on AhR transcriptional activity proceeds via indirect means. For colchicine and nocodazole, well-known microtubule interfering agents, we also assessed their effects on microtubules integrity in both cell types under investigation. Colchicine and nocodazole disrupt cytoskeleton integrity with differential potency depending on cell type. The observed inhibition of AhR transcriptional activity by colchicine and nocodazole can be associated with G2/M cell cycle arrest in HepG2 cells, as demonstrated by Myt1 protein hyperphosphorylation and FACS analysis. However, in primary rat hepatocytes cytoskeleton disruption is independent of cell cycle while displaying the same influence on AhR-dependent gene transcription. In our view, this is evidence in favor of modulatory role of cytoskeleton in AhR-dependent expression¹.

This research was supported by grant MSM 6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by grant GACR 303/04/P074 from the Grant Agency of the Czech Republic.

LITERATURA

1. Dvořák Z., Vrzal R., Ulrichová J., Pascussi J.M., Maurel P., Modrianský M.: *Curr. Drug Metab.* in press (2006).

BIOTRANSFORMACE MONOTERPENICKÝCH SMĚSÍ POMOCÍ *IN VITRO* KULTURY *PICEA ABIES***MARCELA DVOŘÁKOVÁ^a, IRENA VALTEROVÁ^b
a TOMÁŠ VANĚK^b**^a *Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, Praha 2;*^b *Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, Praha 6*

Biotransformace monoterpenu je ekologicky šetrná metoda používaná k přípravě produktů, které se často využívají v potravinářství či parfumerii. Často nahrazuje klasickou organickou syntézou, neboť s její pomocí lze snadněji dosáhnout stereo- i regiospecifických produktů a navíc lze tyto produkty považovat za produkty přírodní, které jsou v daných průmyslových odvětvích velmi žádané.

Naše studie se zabývá biotransformací monoterpenní směsi, terpentýnu, pomocí *in vitro* kultury *P. abies*. Cílem práce byla identifikace produktů biotransformace a vyhodnocení závislosti relativního zastoupení produktů ve směsi v průběhu biotransformace pro různé výchozí koncentrace terpentýnu.

Bylo zjištěno, že hlavní produkty biotransformace terpentýnu odpovídají produktům biotransformace jeho jednotlivých složek^{1,2} (viz Schéma 1). Terpentýn je tedy možné použít pro biotransformaci směsi monoterpenu bez jejího předchozího dělení na jednotlivé složky a zároveň získat řadu cenných produktů v jediném biotransformačním kroku.

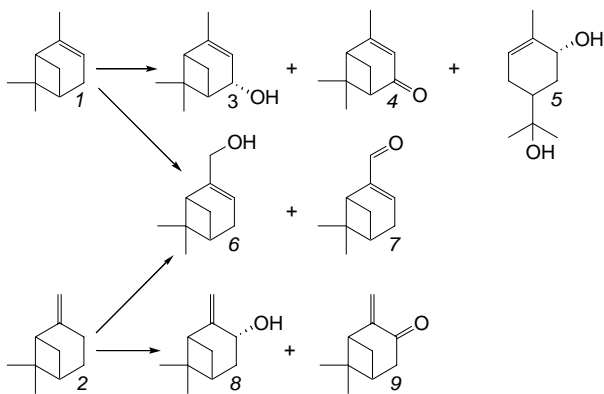


Schéma 1: Hlavní složky terpentýnu: α-pinen (1), β-pinen (2), a hlavní produkty jeho biotransformace: *trans*-verbenol (3), verbenon (4), *trans*-sobrerol (5), myrtenol (6), myrtenal (7), *trans*-pinokarveol (8), pinokarvon (9)

Studie byla podporována projektem COST 926.10

LITERATURA

- Lindmark-Henriksson M., Isaksson D., Sjödin K., Högberg H.-E., Vaněk T., Valterová I.: *J. Nat. Prod.* 66, 337 (2003).

- Lindmark-Henriksson M., Isaksson D., Vaněk T., Valterová I., Högberg H.-E., Sjödin K.: *J. Biotechnol.* 107, 173 (2004).

CtBP-1/ BARS-50 INTERACTS DIRECTLY WITH BASSOON AND PICCOLO, WHICH ARE ESSENTIAL FOR ITS SYNAPTIC RECRUITMENT**ANNA FEJTOVA^a, WILKO D. ALTROCK^a, BRITTA QUALMANN^a, MICHAEL KESSELS^a, SUSANNE TOM DIECK, STEFAN H. GERBER^a, THOMAS C. SÜDHOF^a, and ECKART D. GUNDELINGER^a**^a*Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburg, Germany,*^b*Department of Cardiology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany;* ^c*Howard Hughes Medical Institute, The Center for Basic Neuroscience and Department of Molecular Genetics, UT SW medical Center, Dallas, TX 75390, USA*

Neurotransmitter release is restricted to a specialized region of the presynaptic plasma membrane – the active zone. The cytoskeletal matrix at the active zone (CAZ) is thought to play a fundamental role in the organization of synaptic vesicle cycle, the definition of neurotransmitter release sites and their precise alignment with the postsynaptic neuroreception apparatus. Bassoon (Bsn) and Piccolo (Pclo) are related CAZ-specific proteins. They are thought to act as scaffolding proteins that organize components of the exocytic and endocytic machineries at the active zone. In a yeast-two-hybrid screen for potential binding partners, we observed a direct interaction of Bsn with the C-terminal binding protein 1/Brefeldin A-ADP-ribosylation substrate of 50 kDa (CtBP1/ BARS-50). CtBP1/BARS-50 was independently identified as a nuclear transcriptional co-repressor regulating several transcription factors, and in addition as a cytoplasmic, Golgi-associated protein involved in the Golgi structure maintenance and in the membrane transport processes. Although the binding site of CtBP-1/BARS-50 is located outside of the characterized Bsn/Pclo homology domains, we could also confirm its binding to Pclo. CtBP-1/BARS-50 is expressed in mammalian brain and co-localizes with Bsn and Pclo in young and mature cultured hippocampal neurons. To assess the role of Bsn and Pclo in synaptic targeting of CtBP-1/BARS-50 we used hippocampal primary cultures from mice lacking either Bsn or Pclo or both. Whereas the synaptic localization of CtBP-1/BARS-50 is normal in neurons from single mutant animals, it is completely disrupted in neurons lacking both genes. The synaptic targeting of CtBP-1/BARS-50 can be restored by expression of GFP-tagged Bsn. Mice lacking either Bsn or Pclo are viable while double mutants die within few hours after birth. This suggests a partially redundant function of Pclo and Bsn including the recruitment of common interaction partners to the CAZ. CtBP-1/BARS-50 is the first example of this type of proteins and a detailed analysis of its function may help to understand the serious phenotype of double mutant mice and in turn the molecular functions of Bsn and Pclo.

Supported by the DFG; A.F. was recipient of a fellowship from the Swiss National Foundation.

ANALÝZA STRUKTURNÍCH A FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ TEPLOTNĚ ZÁVISLÝCH MUTANTŮ p53 V KVASINKÁCH

DIANA GROCHOVÁ^a, JANA VAŇKOVÁ^b, BARBORA RAVČUKOVÁ^b, MILUŠKA SVITÁKOVÁ^a a JANA ŠMARDOVÁ^a

^aÚstav patologie, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno;

^bOddělení lékařské genetiky, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00

Brno

diana.groch@gmail.com

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který zajišťuje odpověď buňky na buněčný stres a poškození DNA tím, že aktivuje expresi řady cílových genů. Výsledkem této aktivace je ovlivnění regulace důležitých buněčných procesů jako je apoptóza nebo zástava buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že u více než poloviny všech lidských nádorů se nachází mutace v genu p53. Většina těchto mutací se vyskytuje v DNA vazebné doméně proteinu p53 a ovlivňuje tak jeho sekvenčně specifickou DNA vazebnou aktivitu.

Pro analýzu statutu p53 v nádorové tkáni se využívá řada technik, mezi něž patří funkční analýza separovaných alel v kvasinkách FASAY (*functional analysis of separated alleles in yeast*). Je to citlivá, semikvantitativní metoda, která na základě zbarvení kvasinkových kolonií exprimujících lidský protein p53 rozeznává kolonie obsahující funkční protein p53 (bílé kolonie) od kolonií s nefunkční formou proteinu p53 (červené kolonie). Tato metoda také umožňuje rozeznat mutace, které vedou pouze k částečné inaktivaci proteinu p53, např. teplotně senzitivní mutace (růžové kolonie).

Pomocí metody FASAY jsme analyzovali status proteinu p53 u různých typů nádorů. Identifikovali jsme 22 různých teplotně závislých mutací, kde většina z nich (91%) spadá do DNA vazebné domény proteinu p53. U těchto 22 teplotně-závislých p53 mutantů jsme dále analyzovali jejich funkční vlastnosti: na základě zbarvení kvasinkových kolonií jsme studovali transaktivační schopnosti jednotlivých mutantů p53 ve vztahu k teplotě kultivace a k sekvenci různých responzivních elementů. Zjistili jsme, že jednotliví teplotně závislí p53 mutanti se liší mírou své teplotní závislosti, tj. liší se teplotou, při které dochází k plnému nebo alespoň částečnému obnovení jejich transaktivační schopnosti. Většina teplotně závislých mutantů se také liší mírou své aktivity na různých typech promotorů, mají takzvaně diskriminující povahu.

Pro studium konformačních vlastností jednotlivých p53 mutantů jsme využili konformačně specifických protilátek PAb1620 a PAb240 (v lidských buňkách preferenčně rozeznávají standardní - nedenaturovanou respektive mutantní - denaturovanou formu proteinu p53). Provedli jsme imunoprecipitaci proteinu p53 exprimovaného v kva-

sinkách při třech různých teplotách a dále jsme ověřovali, zda metoda FASAY může být využita při testování schopnosti radio- a chemoprotektivní látky Amifostin reaktivovat transkripční funkci mutantů p53.

Detailnější analýza funkčních a strukturních vlastností mutantů p53 a jejich podrobná stratifikace mohou být užitečné pro lepší pochopení účinků specifických mutantů na procesy vedoucí k transformaci nádorové buňky a také při navrhování potenciálních terapeutik obnovujících funkci proteinu p53.

Tato práce je podporována grantem NR/8068-3 IGA MZ ČR.

NUKLEOFILNÍ ADICE NA PROTOBERBERINOVÝ A BENZOFENANTHRIDINOVÝ SKELET

LENKA GRÝCOVÁ, DAGMAR HULOVÁ, STANISLAV STANDARA a RADEK MAREK*

Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita; ILBIT-A4, Kamenice 5,

625 00 Brno

baracek@chemi.muni.cz, rmarek@chemi.muni.cz

Kvarterní protoberberinové (KPA) a benzo[*c*]fenanthridinové (KBA) alkaloidy patří mezi isochinolinové alkaloidy a jsou součástí velké skupiny sekundárních metabolitů. KPA se vyznačují značnou biologickou aktivitou. Interagují s nukleovými kyselinami a proteiny, vykazují řadu účinků na organismus, např. antibakteriální, antimalarické nebo cytotoxické.

Základem KPA je 5,6-dihydrobenzo[*a,g*]chinoliniový systém (*I*) s modifikacemi nejčastěji v polohách 2,3,9 a 10 a KBA 5-methylbenzo[*c*]fenanthridiniový systém (*III*) se substitucí v polohách 2,3,7 a 8. KPA i KBA jsou charakteristické polární iminiovou skupinou C=N⁺ a její citlivostí na nukleofilní atak. V takovém případě dochází ke vzniku 8- (*II*) resp. 6- (*IV*) substituovaných derivátů (viz Schéma 1 a 2).

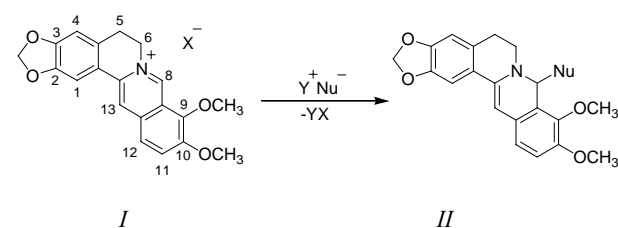


Schéma 1

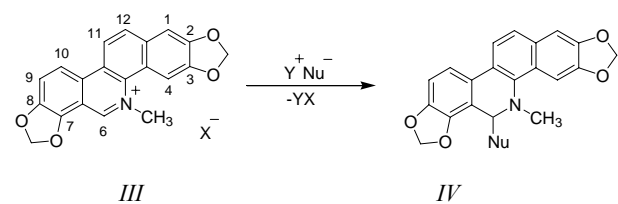


Schéma 2

Studium reakce isochinolinových alkaloidů s dusíkatými nukleofily napomáhá lepšímu porozumění interakce alkaloidu s dusíkatou bází nukleových kyselin.

Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 525/04/0017.

LITERATURA

1. Shamma M.: *The isoquinoline alkaloids*, Academic press, New York, London 1972.
2. Marek R., Sečkářová P., Hulová D., Marek J., Dostál J., Sklenář V.: *J. Nat. Prod.* 66, 481 (2003).

VYUŽITÍ AXIÁLNĚ CHIRÁLNÍCH KARBAMÁTŮ A KARBONÁTŮ PRO STANOVENÍ ABSOLUTNÍ KONFIGURACE AMINŮ A ALKOHOLŮ METODOU ¹H NMR

PETR HARTVICH^a a LUDVÍK STREINZ^b

^aBiologické centrum Akademie věd ČR, Entomologický ústav, Laboratoř analytické biochemie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^bÚstav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Oddělení přírodních látek, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
hartvich@entu.cas.cz

Byl syntetizován soubor axiálně chirálních chloroformiátů (derivátů 1,1'-bi(2-naftolu)), ze kterých následně byl reakcí s chirálními aminy připraven set diastereoisomerních karbamátů, jež byly dále studovány metodou ¹H NMR. Podobně byl připraven reakcí chloroformiátů s alkoholy set diastereoisomerních karbonátů. Byla zjištěna jednoznačná korelace mezi navrženým prostorovým modelem (podpořeným výpočty *in silico*) a naměřenými rozdíly chemických posunů diastereoisomerních derivátů v ¹H NMR spektrech. Dalším vynikajícím výsledkem je hodnota Δppm studovaných funkčních skupin pohybujících se běžně mezi 0,1-0,4 ppm, naměřené maximum je Δppm = 0,72. K jednoznačné interpretaci výsledků výrazně přispívá značná konformační rigidita derivátů. Hlavní výhody nové metody proti zavedeným činidlům (např. Mosherova kyselina) jsou zejména: mimořádné rozdíly chemických posunů a jednoznačná predikce spektrálního chování studovaného derivátu, stejně jako vynikající reaktivita a dobrá syntetická a ekonomická přístupnost obou enantiomerů činidel.

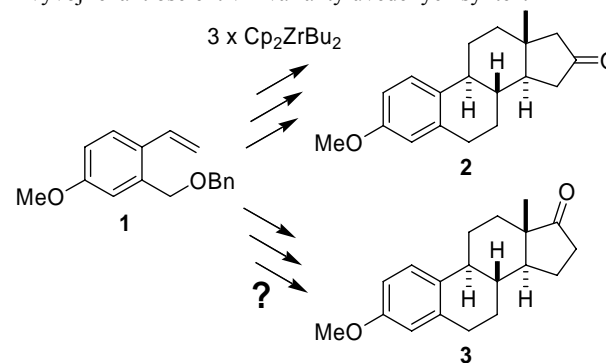
MODULÁRNÍ SYNTÉZA STEROIDŮ S AROMATICKÝM A-KRUHEM

PAVEL HERRMANN^{a,b} a MARTIN KOTORA^{a,b}

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^b Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
herrmann@uochb.cas.cz

Cílem projektu je vyvinout jednoduchou a jednotnou syntetickou metodiku pro přípravu polycyklických přírodních sloučenin (isoprenoidů). Naše strategie je založena na opakovaném použití jednoho činidla za různých reakčních podmínek. Tímto činidlem je dibutylzirkonocen (Negishiho činidlo), který reaguje s různými substráty za vzniku stabilních organozirkoničitých sloučenin, které mohou být dále využity k tvorbě C-C vazeb¹⁻⁴.

Schůdnost této strategie byla demonstrována na syntéze derivátů estronu. Například steroid **2**, (±)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-16-on, byl připraven ve třech krocích ze snadno dostupného styrenu **1**. Každý krok je založen na použití Negishiho činidla za vzniku organozirkoničité sloučeniny. Tyto meziproducty jsou následně „*in situ*“ transmetalovány katalytickým množstvím CuCl na organomědné sloučeniny, které pak reagují s různými elektrofilů. Ve výsledku pak dochází k postupné výstavbě celého steroidního skeletu. Dále budou diskutovány syntetické aspekty celé syntézy a jejich možnosti a limity aplikace pro přípravu (±)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-onu **3**. V neposlední řadě budou uvedeny výsledky směřující k vývoji enantioselektivní varianty uvedených syntéz.



Projekt byl financován z Centra pro nová antivirotika a anti-neoplastika MŠMT (Projekt č. 1M6138896301) a grantem 322/2005/B-CH/PrF GAUK.

LITERATURA

1. Negishi E., v: *Comprehensive Organic Synthesis*, Eds Trost B. M., Paquette L. A., Vol. 5, p. 1163. Pergamon, 1991.
2. Takahashi T., Kotora M., Kasai K.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 2693.
3. *Titanium and Zirconium in Organic Synthesis*, Ed. Marek, I.; Wiley-VCH, Weinheim 2002.
4. Ikeuchi Y., Taguchi T., Hanzawa Y. *J. Org. Chem.* 70, 756 (2005).

SINGLE HEPTAHELICAL DOMAIN IS TURNED ON UPON ACTIVATION OF A DIMERIC METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS

VERONIKA HLAVACKOVA, LAURENT PREZEAU, JEAN-PHILIPPE PIN, and JAROSLAV BLAHOS

Department of Molecular Pharmacology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic and Department of Molecular Pharmacology, Laboratory of Functional Genomic, CNRS unite propre de Recherche 2580, Montpellier, France

The metabotropic glutamate (mGlu) receptors are G-protein-coupled receptors (GPCRs) that exist and function as homodimers composed of two identical subunits covalently bound in the extracellular domain. The relevance of dimerization of these receptors in respect to activation of the transmembrane heptahelical domain (HD) of each subunit upon full receptor activation is of particular interest. We constructed several chimerical receptors in which quality control of GABA_B receptor heterodimerization and cell-surface expression was used. This allowed us to measure G-protein coupling efficacy of dimeric mGlu receptors in which only one subunit bears specific mutations. Single mutation in the third intracellular loop is known to fully prevent G-protein activation when present in both subunits. We show, that when present only in a single subunit per dimer, this mutation decreases coupling efficacy. In contrast when a single HD has engineered binding site for allosteric inhibitor and is blocked in its inactive state by such compound, no decrease in receptor activity is observed. In a receptor dimer in which the same subunit binds the negative modulator and is also mutated in its i3 loop, the compound enhances agonist-induced activity. We propose, that this phenomenon reflects a 'better' activation of the adjacent HD. Our data are in agreement with a model in which a single HD is turned on upon activation of homodimeric receptors. Complementary with these results are data obtained using positive allosteric modulators in experiments with similar settings. Here the most interesting finding is that occupation of a single HD is enough for full enhancement effect.

Situation of asymmetric functioning of mGlu receptors corresponds to findings on GABA_B receptor activation process.

This work was supported by: Grant Agency of Czech Republic (301/03/1183, 301/03/H095, 204/05/0920), Grant Agency of Czech Academy of Science (KJB5039402), AVOZ50390512.

DIFFERENCES IN CELL CYCLE REGULATION AFTER PLATINUM DERIVATIVES TREATMENT IN SENSITIVE AND CISPLATIN RESISTANT OVARIAN CANCER CELL LINES

VIKTOR HORVÁTH^a, KAREL SOUČEK^a, LENKA ŠVIHÁLKOVÁ-ŠINDLEROVÁ^a, JIŘINA HOFMANOVÁ^a, PETR SOVA^b, and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^bPLIVA-Lachema a.s., Karásek 1, 621 33 Brno
horvath@ibp.cz

Cisplatin is one of the most potent antitumour agents which display high efficiency in the treatment of ovarian cancer. However, cisplatin is active in a limited range of cancer types, and its effects are often decreased due to intrinsic or acquired resistance. LA-12 (currently under the 1st phase of clinical evaluation) is a novel octahedral platinum(IV) complex containing a bulky hydrophobic ligand – adamantylamine. In our previous studies^{1,2} we showed that LA-12 was able to overcome both the acquired and the intrinsic cisplatin resistance. In addition, we investigated the effects of LA-12 on cytotoxic parameters of ovarian cancer cell lines with different sensitivity to cisplatin - A2780 (cisplatin sensitive), A2780cis (with acquired cisplatin resistance) and SK-OV-3 (with intrinsic resistance to cisplatin), and compared them with the effects caused by cisplatin. Interestingly, we found the differences in cell cycle perturbation after 24 h cisplatin or LA-12 sustained treatment. Activation of cell cycle checkpoints is a general cellular response after exposure to cytotoxic agents. Therefore we characterize in more detail several signal transduction pathways that are activated in response to exposure to the DNA damage-inducing agents such as studied platinum-based compounds.

Exposure to LA-12 resulted in accumulation of A2780 and A2780cis cells in S phase, while cisplatin caused G2/M arrest in sensitive and S phase arrest in resistant cells after 24 h of treatment. Detailed simultaneous flow cytometric analysis of cell cycle distribution and DNA synthesis revealed that cisplatin in A2780 cells primarily caused transient S-phase arrest as LA-12, but this arrest was shifted to G2/M at later time points (24 h). Moreover, at 24 h we detected decreased cdk-2-associated kinase activity using *in vitro* kinase assay. Western blot analysis indicated a concentration-dependent accumulation of p53 protein which is implicated modulation of cell cycle, as the result of cellular response to DNA damage. Equitoxic LA-12 (IC₅₀) and cisplatin (IC₅₀) concentrations increased p53 protein levels already after 6 h of treatment followed by increasing of p21^{waf1} levels at 12-24 h time points in studied cell lines, both significantly higher after cisplatin treatment. In the present study, we expanded our investigations to examine the effects of equitoxic concentrations of LA-12 or cisplatin in A2780 and A2780cis cells on the protein expression of either p53-targeted genes that have been shown to be important in the cellular response to DNA damage including Bax, Gadd45, Mdm2 or cell cycle regulatory genes such as Cyclin A, Cyclin B1 or cdk-2.

Supported by the IGA grant No. IQS500040507 of the Academy of Sciences of the Czech Republic and by the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, Contract No. PZ-Z2/29, "New Medicines for Cancer Therapy"

REFERENCES

- Horváth V., Blanářová O., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Fedoročko P., Kozubík A.: Gynecologic Oncology, in press (2006).

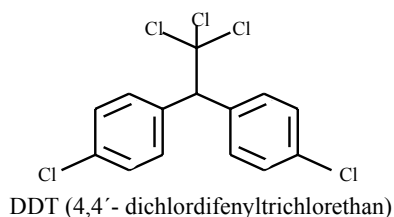
2. Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A., Turánek J.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 373 (2005)

VÝVOJ ENZYMOVÉHO BIOSENZORU PRO DETEKCI CHLOROVANÝCH PESTICIDŮ

JAN HRADECKÝ^a, RADKA MIKELOVÁ^b, ZBYNĚK PROKOP^c, LIBUŠE TRNKOVÁ^b, JIŘÍ DAMBORSKÝ^c, VOJTĚCH ADAM^{a,d} a RENĚ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ^bKatedra teoretické a fyzikální chemie, a ^dKatedra analytické chemie P5F MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cLoschmidovy laboratoře Kamenice 5/4A, 625 00 Brno
univerzita.janhradecky@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

Chlorované pesticidy, jako například deriváty DDT, hexachlorbenzenu a řada dalších byly velmi hojně užívány v ochraně rostlin. Je známo, že rezidua těchto pesticidů se v živočišném i lidském organismu ukládají do tukové tkáně, a z ní mohou přecházet do vajec ptáků nebo mateřského mléka savců. Navíc ve větších koncentracích pak mohou způsobovat nádorová onemocnění či neplodnost. Základní rozdělení pesticidů je určeno podle cílové skupiny organismů. Dále členíme pesticidy podle obsahu jedné či více účinných látek. Z chemického hlediska účinná látka může být jak anorganického, tak organického původu. Používání anorganických pesticidů se omezuje, protože kontaminují životní prostředí. Avšak organické pesticidy jsou stále velmi hojně využívány v ochraně rostlin. Jsou to většinou organofosforové, organochlorové a karbamátové sloučeniny. Působí velmi intenzivně na celý organismus a většinou dlouhodobě.



Proto je potřebné vyvíjet jednoduché a přesné nástroje k detekci takových chemických sloučenin^{1,2}. Námí navržený senzor je založený na detekci chloridů na uhlíkové pastové elektrodě anebo elektrodě ze skelného uhlíku, jak ve stacionárním, tak průtokovém systému. V prostředí je koncentrace chlorovaných uhlovodíků velmi nízká, nižší než jsme efektivně schopni změřit na samostatné uhlíkové elektrodě (10^{-6} M). Pro dosažení lepší senzitivity a selektivity bylo možné uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovat přidávkou dusičnanu stříbrného. Modifikační elektrody byl limit detekce chloridů snížen až na koncentraci 10^{-8} M. Takto vytvořenou metodu bylo nutné převést do praxe a navrhnout biosenzor. Toho jsme mohli dosáhnout díky další modifikaci uhlíkové elektrody, tentokrát enzymem dehalogenasou

bakterie *Pseudomonas paucimobilis*. Dehalogenasy byly popsány jako enzymy schopné odštěpovat z halogenovaných uhlovodíků právě halogen. Takto uvolněný halogen je možné analyzovat námi vypracovanou elektroanalytickou metodikou. Sledovali jsme štěpení modelového chlorovaného uhlovodíku (1-chlorhexan). Na základě našich výsledků bylo možné dehalogenasy využít pro navržení nového biosenzoru k detekci chlorovaných pesticidů³.

Práce na tomto projektu byla podporována grantem: GAČR 525/04/P132.

LITERATURA

1. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejduš B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1167 (2005).
2. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
3. Hradecky J., Mikelova R., Prokop Z., Trnkova L., Damborsky J., Adam V., Petrlva J., Kizek R.: *MendelNet05 Agro*, 61 (2005).

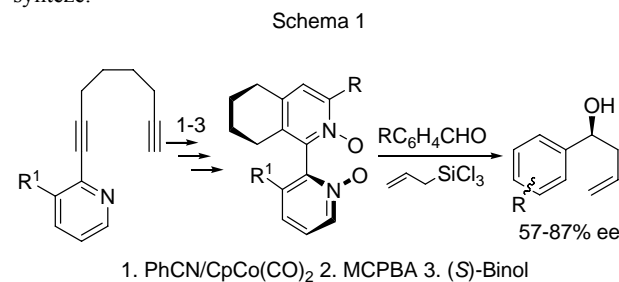
NESYMETRICKY SUBSTITUOVANÉ BIPYRIDIN-*N,N*-DIOXIDY V ORGANOKATALÝZE

RADIM HRDINA^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
radimhrdina@email.cz, kotora@natur.cuni.cz

Homogenní enantioselektivní katalýza směřuje v posledních letech k používání katalytických systémů neobsahujících sloučeniny přechodných kovů. Zájem o tuto oblast je podmíněn hlavně ekologickými a ekonomickými důvody. Pozornost je zaměřena na tzv. organokatalyzátory, což jsou chirální organické molekuly schopné katalyzovat různé reakce. Jednou ze skupin takových sloučenin jsou pyridin-*N*-oxidy resp. bipyridin-*N,N*-dioxidy, sloužící v enantioselektivní katalýze jako chirální Lewisovy báze¹.

Cílem naší práce je vyvinout jednoduchou metodu vedoucí k opticky čistým sloučeninám typu bipyridin-*N,N*-dioxid (Schéma 1) a otestovat jejich využití v organické syntéze.



Příprava těchto látek byla založena na [2+2+2] cyklotrimerizaci pyridyldiinu s nitrily² katalyzované CpCo(CO)₂. Tímto způsobem byla připravena celá řada sloučenin, z nichž byly vybrány pro další použití ty, u kterých se dala předpokládat vysoká racemizační bariera. Tyto bipyridiny byly následně oxidovány na příslušné dioxidy. Čisté enantiomery byly získány kokrystalizací s *S*-potažmo *R*-Binolem. Katalytická aktivita a enantioselektivita nových chirálních nesymetricky substituovaných dioxidů byla testována v Sakurai-Hosomiho reakci (adici allylsilanů na karbonylové sloučeniny). Jako modelové látky byly vybrány substituované benzaldehydy. Dosazené výsledky jsou velice slibné: katalyzátory mají TON větší než 100 i při -78 °C a enantioselektivita se pohybuje v rozmezí 57-87 % ee v závislosti na použitém aldehydu.

LITERATURA

1. Chelucci G., Murineddu G., Pinna G. A.: *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 1373 (2004).
2. Hrdina R., Stará I.G., Dufková L., Scott M., Císařová I., Kotora M.: *Tetrahedron* 62, 968 (2006).

STUDIUM HOMEBOXOVÝCH GENŮ SLAKOVODNÍ MEDÚZY *CRASPEDACUSTA SOWERBYI*

MILUŠE HROUDOVÁ, ČESTMÍR VLČEK, HYNEK STRNAD, ZDENĚK KREJČÍK a VÁCLAV PAČES

*Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky,
Flemingovo náměstí 2, 16637 Praha 6
hroudova@img.cas.cz.*

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (Cnidaria), který se v posledních letech stal předmětem intenzivního studia v oblasti molekulární genetiky a vývojové biologie. Rozsáhlý genom žahavců kontrastující s jednoduchou stavbou jejich těl je v mnoha ohledech podobnější genomům vyšších obratlovců, včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších živočichů (*Drosophila*, *Ceanorhabditis*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny kódující ve většině případů transkripční faktory. Jejich struktura je silně konzervována napříč celou živočišnou říší. V raných stádiích vývoje žahavce se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, dále na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů, jsou součástí významných signálních drah.

V naší práci jsme se zaměřili na některé méně časté rodiny homeoboxových genů (SIX, POU a LIM). Na základě specifické analýzy (HMM analýza) databází průběžných sekvenčních dat (TRACE data) příbuzných žahavců byly navrženy degenerované primery na příslušné specifické domény jednotlivých rodin. Metodou PCR byly získány genové fragmenty, které byly ověřeny sekvenací a metodou RACE byly následně prodlouženy na celé hledané geny. Bylo identifikováno několik zástupců homeoboxových rodin SIX a POU a provedeno porovnání s některými dalšími

žahavci a vyššími živočichy. Tato práce bude dále pokračovat testováním transkripce jednotlivých genů v různých tkáních dospělých jedinců i některých vývojových stádií metodou in situ hybridizace. Dále se zaměříme na identifikaci a studium dalších homeoboxových genů.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

ANALÝZA PRIMÁRNÍCH INTERAKCÍ HOSTITEL - PATOGEN

ROMAN HRSTKA^a, ZUZANA KROČOVÁ^b, BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^a a JIRÍ STULÍK^b

^a*Masarykův onkologický ústav, Oddělení experimentální a onkologické patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno;*

^b*Univerzita obrany, Ústav molekulární patologie, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové*

Francisella tularensis je vysoce virulentní fakultativně anaerobní bakterie způsobující zoonózy u řady savců. Přestože byla nedávno dokončena sekvenace genomu *F. tularensis*, mechanismy virulence a intracelulárního přežívání tohoto patogena zůstávají z velké části stále neznámé.

Po infekci myších makrofágů bylo možné pozorovat kontinuální množení tohoto mikroorganismu, dokud nedošlo ke zhroucení celého buněčného aparátu. Bylo prokázáno, že v raných fázích infekce, přibližně po šesti hodinách, dochází k indukci apoptózy. Naopak v pozdějších časových intervalech infekce, asi po třiceti hodinách, byly u buněk pozorovány první známky nekrózy.

Nicméně právě v souvislosti s indukcí apoptózy docházelo překvapivě k aktivaci p42/p44 MAPK a naopak k inhibici p38 MAPK. Vzhledem ke zdánlivě nelogičnosti těchto procesů byla provedena analýza genové exprese příslušných signálních drah. Bylo zjištěno, že po infekci dochází k významnému nárůstu exprese genů navozujících autofagii, pro jejíž iniciaci je právě aktivace p42/p44 MAPK zásadní. Tato hypotéza byla následně potvrzena na základě konverze MAP-LC3-I na MAPLC3-II a především pak pomocí elektronové a konfokální mikroskopie.

LITERATURA

1. Hrstka R., Vojtěšek B.: *Voj. Zdrav. Listy* 71, 29 (2002).
2. Hrstka R., Stulík J. a Vojtěšek B.: *ELSO Conference, Dresden, 20-24 September 2003.*
3. Hrstka R., Stulík J., Vojtěšek B.: *Microbes Infect.* 4, 619 (2005).

ŘÍZENÍ STEREOSELEKTIVITY ENZYMU FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝMI PARAMETRY

RADKA CHALOUPKOVÁ, ZBYNĚK PROKOP, MONIKA STRAKOVÁ, TOMÁŠ MOZGA a JIRÍ DAMBORSKÝ

*Loschmidovy laboratoře, Masarykova univerzita, Kamenice 5/A4, 625 00 Brno
jiri@chemi.muni.cz*

Využitelnost enzymů k produkci vysoce čistých chemikálií v průmyslových procesech vyžaduje splnění celé řady kritérií. Uvažujeme-li aplikace v asymetrických biosyntézách, pak jedním z významných kritérií je enantioselektivita. Mnohé enzymy nejsou schopny při fyziologických podmínkách produkovat látky vysoké stereochemické čistoty. Manipulace s fyzikálně-chemickými parametry může představovat atraktivní způsob pro dosažení požadované úrovně kontroly a řízení stereochemie enzymové katalyzovaných reakcí. V této práci byl studován vliv teploty a pH na strukturální stabilitu, aktivitu a enantioselektivitu enzymu. Jako modelový enzym byla vybrána halogenalkandehalogenasa DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (cit.¹). DbjA vykazuje novou substrátovou specifitu¹ a je současně prvním enzymem z rodiny halogenalkandehalogenas s potvrzenou enantioselektivitou. Vysokou enantioselektivitu vykazoval tento enzym k vybraným β -substituovaným bromovaným alkanům a bromovaným esterům².

Aktivita, enantioselektivita a konformační chování DbjA byly studovány při různé teplotě a pH. Konformační změny enzymu byly sledovány pomocí CD spektroskopie. Zjištěná teplota tání (T_m) byla $47,3 \pm 0,2$ °C. Ze strukturálního hlediska vykazoval studovaný enzym velkou toleranci ke změně pH. Jeho sekundární struktura nebyla ovlivněna v rozsahu pH 5,3–10,3. V silně kyselém prostředí (pH < 5,3) docházelo k agregaci proteinu, zatímco v silně alkalické prostředí (pH > 10,3) enzym zaujímal neuspořádanou konformaci. Teplotní a pH optima DbjA byla stanovena aktivním měřením se substrátem 1-iodhexanem. Maximální aktivita enzymu byla detekována při 50 °C a pH 9,7. Nejvyšší enantioselektivita DbjA s 2-brompentanem byla naměřena při teplotě 20 °C. Zatímco vliv pH na enantioselektivní rozlišení 2-brompentanu studovaným enzymem nebyl zjištěn, teplota významně ovlivňovala enantioselektivitu DbjA. Snížení teploty z 50 na 20 °C zvýšilo enantioselektivitu DbjA třináctkrát. Na základě naměřené teplotní závislosti enantioselektivity byla vypočtena racemická teplota spolu s diferenčními aktivačními parametry entalpií a entropií pro dehalogenaci 2-brompentanu. Zjištěná racemická teplota byla 85,6 °C, $\Delta_{R-S}\Delta H$ byla -69,5 kJ/mol a $\Delta_{R-S}\Delta S$ byla 0,2 kJ/mol. Enzym DbjA preferenčně katalyzoval entalpicky zvýhodněný (*R*)-enantiomer 2-brompentanu.

Tato pozorování demonstrují, že halogenalkandehalogenasa DbjA má vysokou aktivitu a strukturální stabilitu v širokém rozmezí pH. Kromě toho může být enantioselektivita DbjA vůči vybraným substrátům vylepšena snížením reakční teploty. Fyzikálně-chemické parametry proto představují významný a velmi snadný způsob pro modelování katalytických vlastností enzymů využitelných v biotechnologiích.

LITERATURA

- Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K., Tsuda M., Damborský J., Nagata Y.: *App. Environ. Microbiol.* 71, 4372 (2005).

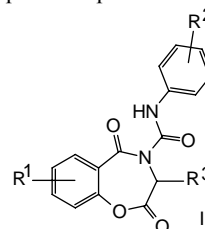
- Prokop Z., Sato Y., Mozga T., Natsume R., Janssen D. B., Tsuda M., Nagata Y., Senda T., Damborský J.: *Nature Biol. Chem.*, předloženo k publikaci.

NOVÉ SEDMIČLENNÉ CYKLY JAKO PRODUKTY A MEZIPRODUKTY ESTERIFIKACE SALICYLANILIDŮ

A. IMRAMOVSKÝ, J. VINŠOVÁ a F. J. MONREAL

*Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
imramovsky@faf.cuni.cz*

Salicylanilidy patří mezi antibakteriální látky s vysokou antimykobakteriální aktivitou vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, ale také některým atypickým kmenům, vůči nimž jsou běžná antituberkulotika méně účinná či neúčinná^{1,2}. Pro biologický účinek je nezbytná fenolická hydroxyskupina, která je pravděpodobně zodpovědná za rozpojení oxidativní fosforylace. Naše snaha o její esterifikaci aminokyselinou vede k nové skupině biologicky aktivních látek typu proléčiv, u kterých zůstane zachována vysoká aktivita, zlepší se rozpustnost a sníží toxicita.



Při přípravě esterů aminokyselin s neúčinnějšími salicylanilidy byly zjištěny nečekané cyklizace za vzniku zcela nových sedmičleenných *ortho*-kondenzovaných heterocyklů – substituovaných 3,4-dihydro-benzo[*f*][1,4]-oxazepin-2,5-dionů I. Tyto typy sloučenin nejsou v literatuře dosud popsány, nebyla nalezena ani jejich zjednodušená struktura.

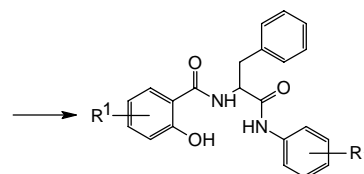
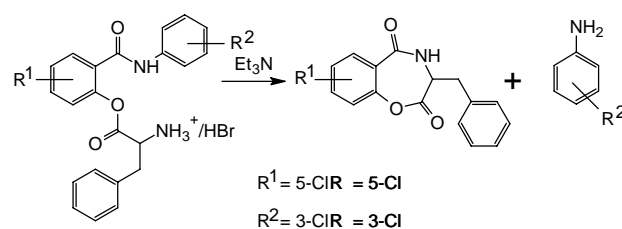


Schéma 1

Jejich vznik byl prokázán při esterifikaci některých salicylanilidů s Z-Gly a Z-L-Ala, hrají však také roli při přesmyku uvolněné aminoskupiny např. esteru fenylalaninu se salicylanilidem (schéma 1), kdy se v rychlém sledu reakcí molekula přeskupí za vzniku diamidu II, jehož struktura byla potvrzena na základě 2D experimentů (GHSQC a GHMQC). NMR, MS. Volný fenolický hydroxyl byl dokázán Emersonovou a Gibbssovou reakcí. K čištění meziproduktů a finálních produktů byl s úspěchem použit Chromatotron, Model 7924T, který je vysoce účinnou a rozpouštědla šetřící chromatografickou metodou.

Príspevek vznikl za finanční podpory FRVŠ 151/2006, MSM 0021620822 a IGA MZd 1A/8238-3.

LITERATURA

1. Vinšová J., Imramovský A: Ces. Slov. Farm. 53, 294 (2004).
2. Waisser K, Bureš O., Hol7 P., Kune3 J., a kol. :Arch Pharm. 336, 53 (2003).

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF STYRENE OXIDE ADDUCTS WITH AMINO ACIDS IN HUMAN GLOBIN

MICHAL JÁGR, JAROSLAV MRÁZ, KAREL CTIBOR, VLADIMÍR STRÁNSKÝ, and MARTIN POSPÍŠIL

National Institute of Public Health, Šrobárova 48,
100 42 Prague 10
michaljagr@centrum.cz

Styrene, an important monomer used in plastics industry, is metabolized to a genotoxic intermediate styrene-7,8-oxide (SO). Besides extensive detoxification through the enzyme-mediated hydrolysis, a minor part of SO can produce stable covalent adducts at various nucleophilic sites in the body, e.g. with DNA or proteins. In blood protein globin, the amino acids reported to form adducts with SO are Cys, His, Asp, Glu, N-terminal Val, Lys, and Tyr. However, several SO adduct species are commonly detected for each amino acid because of simultaneous formation of both 2-hydroxy-1-phenylethyl (21HPE) and 2-hydroxy-2-phenylethyl (22HPE) regioisomers, combined with the diastereomerism due to the chiral properties of SO. Additionally, binding of SO to His can occur via N π or N τ in the imidazol ring of His.

The main aim of our study was to identify major isomers of the SO adducts with Cys, Lys, and His in human globin. For reference purposes, the synthetic standards were prepared. The (*S*)- and (*R*)- SO enantiomers were reacted with Cys or N α -protected Lys and His. Following deprotection and purification on a silica gel column, the individual isomers were separated by semi-preparative HPLC and characterized using GC/MS, HPLC/MS, and 1H-NMR. Human globin incubated with a 100-fold molar excess of SO was hydrolyzed with pronase. Released amino acids and adducts were then derivatized by a tert-butylidimethylsilyl reagent, and analyzed by GC-MS. The

most abundant regioisomers were 21HPE in Cys-SO and Lys-SO, and N τ -22HPE in His-SO. All remaining regioisomers were also detected. The diastereomers were not resolved by GC, however, some pairs could be separated by HPLC. The most abundant SO adducts can serve as potential biomarkers of the exposure to styrene.

This study was supported by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, grant NJ/7387-3.

REFERENCES

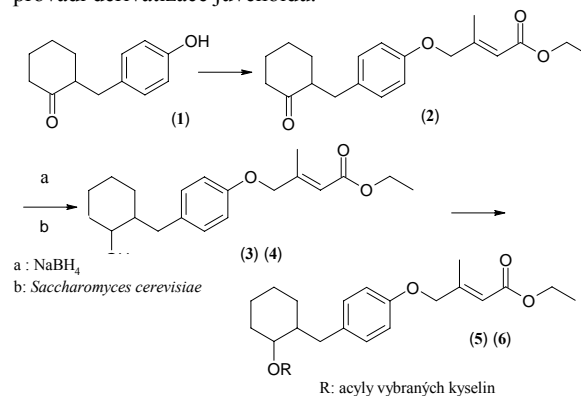
1. Kaur S., Hollander D., Haas R., Burlingame A.L.: J. Biol. Chem. 264, 16981 (1989).
2. Basile A., Ferranti P., Mamone G., Manco I., Pocsfalvi G., Malorni A., Acampora A., Sannolo N.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 871 (2002).
3. Mráz J., Jágr M., Chvalová D., Šimek P., Nohová H., Šmigolová P.: *Sixth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health, Heidelberg, Germany, September 6-8, Book of abstracts, pg. 122 (2004).*
4. Campbell J. B.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 1983, 1213.

ESTERY VYBRANÝCH MASTNÝCH KYSELIN A BIOLOGICKY AKTIVNÍCH ALKOHOLŮ JAKO MOŽNÉ HORMONOGENNÍ LÁTKY PŘI REGULACI HMYZÍCH ŠKŮDCŮ

**ONDŘEJ JURČEK^a, JITKA MORAVCOVÁ^a
a ZDENĚK WIMMER^b**

^aVŠCHT, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5,
160 28 Praha 6; ^bÚOCHB AV ČR, Oddělení přírodních
látek, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Práce se týká syntézy analogů juvenilních hormonů (juvenoidů), biologicky aktivních sloučenin, které mohou mít vliv na morfologii a fyziologii vybraných druhů hmyzu a mohou účinně a ekologicky snížit hustotu populací hmyzích škůdců. Za účelem modifikace vlastností juvenoidní molekuly (protrahovaný účinek, možnost aplikace do organismu společně s potravou apod.) se v další fázi syntézy provádí derivatizace juvenoidu.



V tomto výzkumu jsme se zaměřili na esterifikace vybranými mastnými kyselinami. Vzniklé estery (juvenogeny) je možné považovat za aplikační formy analogů juvenilních hormonů. V trávicím traktu hmyzu, při perorálním podání, dochází k rozštěpení esterové vazby a k pomalému uvolňování analogu juvenilního hormonu do organismu. Výchozím meziproduktem syntézy juvenoidů této série je 2-(4-hydroxybenzyl)-1-cyklohexanon (1), který postupem naznačeným ve Schématu 1 poskytl isomerní juvenoidy (3) a (4), které byly v posledním reakčním kroku transformovány v juvenogenní estery (5) a (6).

Připravené estery byly testovány v laboratořích na svou biologickou účinnost a výsledky byly porovnány mezi sebou.

COST projekt D29.001 (MŠMT).

FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ LIGANDY NMDA RECEPTORU

**VOJTĚCH KAPRAS^{a,b}, HANA CHODOUNSKÁ^a
a LADISLAV VYKLIČKÝ, Jr.^c**

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bPřírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^cFyziologický ústav, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
kapras@uochb.cas.cz

Procesy v centrální nervové soustavě jsou posledních několik let předmětem četných studií. Ve středu pozornosti stojí synaptické receptory a jejich vlastnosti, z chemického hlediska zvláště pak neuroaktivní látky¹. Naše práce se zaměřuje na syntézu polárních derivátů neurosteroidů ovlivňujících aktivitu NMDA receptoru, speciálně pak na vztah mezi zkoumaným steroidem a vazebným místem².

Pro popis vazebného místa jsou nezbytné fluorescenčně značené syntetické deriváty. Jejich příprava je cílem předkládané práce. Na základě námi dříve zjištěných strukturně-aktivitních závislostí byly deriváty nativních neurosteroidů, substituované v polohách 7, 17 a 21, v dalším postupu uvažovány jako fyziologicky neúčinné. Naše pozornost se zaměřila na substituci v poloze 3 a 11 steroidního skeletu, neboť substituenty v těchto polohách neodporují vazbě steroid-receptor.

Nejlépe je prostudována vazba fluorescenčních značek na aminoskupinu substrátu³. Proto jsme jako modelové sloučeniny zvolili steroidní konjugáty s aminokyselinami.

Byly připraveny fluorescenčně značené sloučeniny a ověřena jejich aktivita na NMDA receptoru.

Grant: GAAV ČR IAA4055305, výzkumný záměr Z4 0550506

LITERATURA

1. Dorda, M., Vlček, K., Chodounská, H., Vyklický, L. Jr.: *Psychiatrie, Supplementum* 3, 5 (2001).
2. Abdrachmanova, G., Chodounská, H., Vyklický, L. Jr.: *Eur. J. Neurosci.* 14, 495 (2001).

3. Gustav Akk, Hong-Jin Shu, Cunde Wang, Joe Henry Steinbach, Charles F. Zorumski, Douglas F. Covey, Steven Mennerick: *J. Neurosci.* 25, 11605 (2005).

CHARACTERIZATION OF *TRICHOBIKHARZIA REGENTI* CERCARIAL PEPTIDASES

**MARTIN KAŠNÝ^a, LIBOR MIKEŠ^a, KATEŘINA DOLEČKOVÁ^a, STEPHANIE FERRET-BERNARD^b,
and PETR HORÁK^a**

^aDepartment of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic,

^bDepartment of Biology (Area 5), The University of York, P.O. Box 373, YO10 5YW, York. U.K.

Proteolytical enzymes (peptidases) are essential for the life cycle of many trematode species and other parasites¹. Peptidases of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* represent a key factor in the disruption of outer squamous layer of the skin during the invasion into their host (ducks). After penetration the larve (schistosomula), uniquely among the schistosomes, migrates through the peripheral and central nervous system (spinal cord, brain and olfactorial nerves) to the nasal area where adults lay eggs². Although the *T. regenti* parasites can complete their life cycle only in a bird, their cercariae are able to invade mammals including man and survive for a limited period of time³. Repeated invasion can stimulate an allergic reaction in man, which is manifested as cercarial dermatitis⁴.

Using ZAP cDNA library from sporocyst (*T. regenti* snail larvae stage) and employing PCR the full-length *T. regenti* cathepsin B1 (cysteine peptidase) was amplified. By DCG-O4 - irreversible cysteine peptidase affinity probe we identified a 33 kDa protein, probably cathepsin B1 too. The predominant cysteine peptidase activity in *T. regenti* cercariae was detected with the panel of fluorogenic synthetic peptidyl amidomethylcoumarin substrates and specific inhibitors. Major proteins from *T. regenti* cercarial extracts were analyzed by mass spectrometry methods (MALDI TOF/TOF). Recorded results were continually compared with human trematode *Schistosoma mansoni* (causes parasitic disease - schistosomiasis) and some significantly similar biochemical and functional characteristics of peptidases were observed. Based on this study we disclose the possibility to use non-human specie *T. regenti* as an alternative laboratory model in development of new chemotherapeutics or vaccine against *S. mansoni* trematodes.

The work was supported by Collaborative Research Initiative Grant (University of York, UK - Charles University, CZ), Wellcome Trust. POST DOC grant (no.524/04/P082), Grant agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Dalton J.P., Brindley P.J.: v: *Adv. Trematode Biol.* 1997, 265.
2. Hrádková K., Horák P.: *J. Helminthol.* 2002, 76.

3. Kouřilová P., Syruček M., Kolářová L.: Parasitol. Res. 2004, 93.
4. Horák P., Kolářová L., Adema C.M.: Adv. Parasitol. 2002, 52.

A RECOMBINANT MAIZE β -GLUCOSIDASE RETARGETED TO THE VACUOLE REVEALS THAT THE VACUOLE IS THE STORAGE ORGANELLE FOR t-ZEATIN-O-GLUCOSIDE

NAGAVALLI S. KIRAN^{a,b,c}, EVA BENKOVÁ-FRIMLOVÁ^{b*}, ALENA REKOVÁ^b, JIŘÍ MALBECK^d, and BŘETISLAV BRZBOHATÝ^{b,c}

^aDept Functional Genomics Proteomics, Masaryk University, CZ-611 37 Brno, CR; ^bInstit. Biophysics AS CR, CZ-612 65, Brno, CR; ^cDepart Mol. Biol. Radiobiol., Mendel University of Agriculture and Forestry, CZ-613 00 Brno, CR; ^dInst. Exp. Botany AS CR, CZ-165 02 Prague, CR. *Present Address: Centre for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

Cytokinins (CKs), N⁶-substituted adenines, are a class of plant hormones with the ability to trigger cell division in conjunction with auxin in tissue culture. They are also involved in regulating a wide range of developmental processes such as chloroplast differentiation, nutrient assimilation and translocation, seed germination, leaf expansion, flowering and senescence. CKs bearing a hydroxylated isoprenoid substituent are called zeatin-type CKs after trans-zeatin (6-[4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylamino]purine), the most abundant naturally-occurring CK.

CKs in plant cells are distributed among the various sub-cellular compartments in a manner that is as yet poorly understood. It is known that t-zeatin-O-glucoside (ZOG) occurs transiently in chloroplasts and is enriched in vacuoles of *Chenopodium rubrum* when cell cultures are supplied with labelled CK.

A molecular tool for exploring the regulation of the intracellular metabolic conversions of CKs requires that the following two conditions be satisfied:

- a) The tool disrupts normal metabolism in a tractable fashion, e.g., by releasing active hormone from a transient "store" of inactive conjugates.
- b) Transgenic plants are available that express the tool in different sub-cellular locations.

A β -glucosidase, Zm-p60.1, was isolated from maize coleoptiles and shown to release active CK from its storage forms, and was subsequently shown to be localized to the plastid. Using recombinant DNA technology, the cDNA encoding the wild-type enzyme (with the native plastid-targeting signal peptide) was modified so that the recombinant version was localised to the vacuole. Transgenic plants over-expressing this re-targeted version were constructed and thus the above two conditions were satisfied.

The results presented show that cytokinin metabolism is disrupted in the transgenic plants. The differing location of the enzyme in the two variants disrupts CK metabolism in

different ways. We also present evidence, for the first time from intact plants, that the terminal storage organelle for ZOG is the vacuole.

Supported by grants from the Ministry of Education of the Czech Republic (Nos. MSM 143100008 and LN00A081), the AS CR (AVOZ50040507), the GA AS CR (No. IAA600380507 and IAA600040612).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGICKÝ VÝZNAM, AEROBNÍCH FOTOSYNTETICKÝCH BAKTERIÍ

MICHAL KOBLÍŽEK^{a,b}, MICHAL MAŠÍN^{a,b} a ONDŘEJ PRÁŠIL^{a,b}

^aMikrobiologický ústav AV ČR, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň; ^bÚstav fyzikální biologie JČU, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

Nedávný objev přítomnosti aerobních fotosyntetických bakterií v tropickém Pacifiku vzbudil silný zájem o tuto skupinu mikroorganismů. Následná studie prokázala, že v oligotrofních vodách severovýchodního Tichého oceánu tvoří tyto organismy kolem 10 % mikrobiálního společenstva. Aerobní fotosyntetické bakterie představují malou podskupinu Proteobakterií, obsahují fotosyntetická reakční centra tvořená bakteriochlorofylem a na rozdíl od svých blízkých příbuzných purpurových bakterií jsou striktně aerobní.

Přítomnost fotosyntetických bakterií jsme sledovali v různých lokalitách světového oceánu pomocí unikátního vysoce citlivého fluorometru, který byl vyvinut ve spolupráci s firmou Photon Systems Instruments s.r.o. Brno. V oligotrofních oblastech jižního Tichého oceánu (transekt Velikonoční ostrov - Concepción, Chile) se množství bakteriochlorofylu pohybovalo od 0,5-1 pM. Podobné výsledky jsme zaznamenali i v Atlantickém oceánu, kde byl zmapován poledníkový transekt z Kapského města (Jižní Afrika) do Falmouth (Velká Británie). Ftoheterotrofní bakterie jsou přítomny v povrchové vrstvě do 200 m v celé studované části Atlantiku, tj. od nízkých do středních zeměpisných šířek. V oligotrofních oblastech se množství bakteriochlorofylu pohybovalo mezi 0,5-2 pM, v bohatých oblastech severního Atlantiku se obsah zvýšil až na 6 pM.

Fotosyntetické bakterie byly též registrovány v eutrofním Baltském moři. V této oblasti podléhá množství fotosyntetických bakterií výrazným sezónním výkyvům s ročním maximem v květnu, s přibližně měsíčním zpožděním za jarním maximem fytoplanktonu. Množství ftoheterotrofní pak s nástupem podzimu pozvolna klesá a je téměř zanedbatelné v zimě.

Kolem 40 kmenů ftoheterotrofních bakterií bylo vyizolováno z různých oblastí světového oceánu. Na základě sekvenace genů 16S ribozomální podjednotky byly vyizolované kmeny zařazeny do třech základních rodů Roseobacter, Erythrobacter a Citromicrobium náležejících do skupiny α -Proteobakterií. Izolát Erythrobacter sp. NAP1 byl napraven k celkové sekvenaci genomu, kterou provedl Ventrův Institut metodou shotgun. Předběžná manuální anotace potvrdila přítomnost genů pro bakteriální reakční

centra, geny pro asimilaci CO₂ či fixaci dusíku však nalezeny nebyly. To odpovídá faktu, že získané kmeny nejsou schopny čistě autotrofního růstu a vyžadují přítomnost organického substrátu. Pomocí současného měření respirace a fotosyntézy bylo zjištěno, že tyto organismy mohou částečně nahrazovat energii oxidativní fosforylace pomocí fotofosforylace. Fotosyntetická reakční centra tak slouží jako alternativní zdroj ATP. Tato metabolická strategie je zřejmě výhodná v mořském ekosystému charakteristickém omezenými zdroji živin. Fotosyntetické bakterie tvoří 1-10 % veškerých mořských bakterií, což signalizuje jejich významnou roli v mořském uhlíkovém cyklu.

LITERATURA

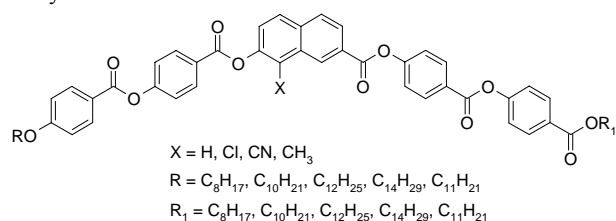
1. Koblížek M., Beja O., Bidigare R. R., Christensen S., Benitez-Nelson B., Vetriani C., Kolber M. K., Falkowski P. G., Kolber Z. S.: Arch. Microbiol. 180, 327 (2003).
2. Koblížek M., Egiert-Stoň J., Sagan S., Kolber Z. S., Falkowski P. G.: FEMS Microbiol. Ecol. 51, 353 (2005).
3. Kolber Z. S., Plumley F. G., Lang A. S., Beatty J. T., Blankenship R. E., VanDover C. L., Vetriani C., Koblížek M., Rathgeber C., Falkowski P. G.: Science 292, 2492 (2001).

DESIGN, SYNTÉZA A STUDIUM MESOMORFNÍCH VLASTNOSTÍ LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ NA BÁZI DERIVÁTŮ 7-HYDROXYNAFTALEN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY

MICHAL KOHOUT^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav Akademie věd ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
michal.kohout@email.cz

Studium lomených kapalných krystalů prochází bouřlivým rozvojem. Nedávno jsme v této oblasti zavedli nový typ centrálního jádra a využili jej pro syntézu nových typů kapalně-krytalických materiálů¹⁻³. Cílem této práce bylo připravit nové typy nesymetrických lomených kapalných krystalů odvozených od 7-hydroxynafalen-2-karboxylové kyseliny (Obr. 1) a studovat jejich mesomorfní chování pomocí DSC, studiemi textur a rentgenostrukturní analýzou.



Obr. 1

Budou diskutovány vlastnosti nově připravených a dosud nepopsaných derivátů centrálního jádra dále pak rozdíly způsobené záměnou centrálního jádra, vliv substituce tohoto jádra a délky postranních řetězců na celkové změny v mesomorfním chování jednotlivých kapalných krystalů v připravených seriích nových látek.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM223100001).

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weisslog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst. 32, 1151, (2005).
3. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst. 33, 41 (2006).

OBRANNÉ REAKCE *BRASSICA NAPUS* NA HOUBOVÝ PATOGEN *LEPTOSPHERAERIA MACULANS*

BARBORA KORBELOVÁ^{a,b}, JÓSEF FODOR^c, KÁROLY BÓKA^d, LENKA BURKETOVÁ^a a OLGA VALENTOVÁ^b

^aÚstav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, ČR, ^bÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 160 28 Praha 6, ČR, ^cDepartment of Plant Anatomy, Eötvös Loránd University, Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/C, Maďarsko, ^dPlant Protection Institute of the Hungarian Academy of Science, Budapest 1022, Herman Ottó út 15, Maďarsko
korbelova@ueb.cas.cz

Cílem této práce je studium obranných reakcí *Brassica napus* na houbového patogena *Leptosphaeria maculans*. *L. maculans* způsobující fomovou hnilobu je nejzávažnější a nejrozšířenější patogen rostlin rodu *Brassica*, zejména *B. napus* a *B. rapa*. V této práci jsou použity dva izoláty *L. maculans* – virulentní a avirulentní.

Během obranných reakcí na patogena dochází k tvorbě kalózy, která je stanovena spektrofotometrickou a mikroskopickou metodou pomocí specifického barvení anilínovou modří. Virulentní izolát vyvolává v rostlinách vyšší akumulaci kalózy než izolát avirulentní. Při mikroskopickém pozorování je patrné, že virulentní izolát *L. maculans* prorůstá děložním listem, zatímco avirulentní izolát je lokalizován v blízkosti místa inokulace. Dalším způsobem obrany *B. napus* proti patogenu je produkce reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je stanoven spektrofotometrickou metodou pomocí xylenolové oranže *in vitro* a specifickým barvením 3,3'-diaminobenzidinem (DAB) *in situ*. U rostlin infikovaných avirulentním izolátem *L. maculans* je tvorba peroxidu vodíku rychlejší než v případě infekce virulentním izolátem. Barvení

pomocí DAB ukazuje, že peroxid vodíku je lokalizován v děložním listu v blízkosti hyf *L. maculans*. V infikovaných rostlinách dochází k indukci PR-proteinů. Tato indukce je sledována molekulárně-biologickými metodami pomocí exprese PR1 a PR2 genů. Expres PR genů je hodnocena pomocí RT-PCR. V infikovaných rostlinách je exprese genů PR1 a PR2 vyšší než v kontrolních rostlinách.

Získané výsledky rozšiřují dosavadní poznatky o obranné odpovědi *B. napus* při kompatibilní a inkompatibilní interakci s *L. maculans*.

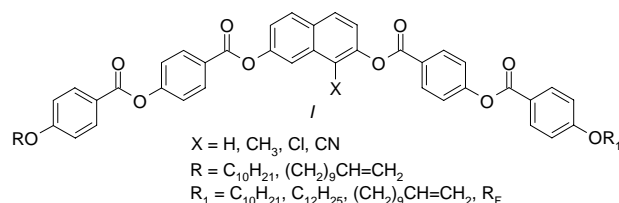
Tato práce je podporována granty MŠMT KONTAKT CZ-4 a MŠMT 1P05ME825.

SYNTÉZA A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH LOMENÝCH KAPALNĚ KRYSALICKÝCH MATERIÁLŮ

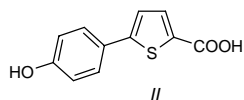
ANNA KOVÁŘOVÁ^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bFyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
kovarova@vscht.cz

V posledních letech jsme připravili řadu látek odvozených od 1-substituovaných naftalen-2,7-diolů, které vykazovaly různé typy mesofází^{1,2}. Z naměřených výsledků je zřejmé, že zavedení tohoto centrálního jádra je velmi perspektivní, a proto se nadále zabýváme syntézou molekul odvozených od tohoto jádra. Tato práce pojednává o syntéze a fyzikálních vlastnostech nesymetrických kapalně krystalických monomerů³ a dále pak látek s parciálně perfluorovaným koncovým řetězcem I.



Dále se zabýváme přípravou nové série látek, jejichž centrální jádro je odvozeno od thiofen-2-karboxylové kyseliny II.



Mesomorfní chování nových látek bylo studováno pomocí DSC, studií textur a rentgenostrukturní analýzou.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM 223100001).

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weissflog W., Diele S., Pelzl G.: *J. Mater. Chem.* 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: *Liq. Cryst.* 32, 1151 (2005).
3. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: *Liq. Cryst.* 33, 41 (2006).

STANOVENÍ EXPRESNÍCH PROFILŮ U PACIENTŮ S MYELOYDYSPLASTICKÝM SYNDROMEM (MDS)

A. KRÁČMAROVÁ, H. BRUCHOVÁ, J. ČERMÁK a R. BRDIČKA

ÚHKT, U Nemocnice 2, 128 20 Praha 2
alzbeta.kracmarova@uhkt.cz

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu onemocnění neefektivní hematopoézy, která postihují kmenové buňky kostní dřeně. Charakteristickými projevy MDS jsou dysplázie v několika vývojových řadách, periferní cytopenie a zvýšené riziko leukemické transformace, neboť přibližně u 1/3 všech diagnostikovaných pacientů dochází k přechodu MDS v akutní myeloidní leukemii (AML). MDS postihuje zvláště starší populaci, přičemž incidence tohoto onemocnění je odhadována v intervalu 3.5-10/100 000. Jediným přístupem umožňujícím vyléčení pacienta nadále zůstává alogenní transplantace kmenových buněk. Široké spektrum klinických, morfolo- gických a genetických projevů se stalo základem pro pozdější rozlišení jednotlivých podtypů (FAB či WHO klasifikace).

Etiologie a kompletní genetické pozadí MDS nejsou doposud uspokojivě vysvětleny, přičemž právě biočipové technologie usnadňují řešení těchto otázek, díky možnosti současného testování (kvalitativní i kvantitativní) velkého počtu genů v rámci jednoho vzorku. Stejně jako v případě jiných maligních onemocnění je zvláštní pozornost soustředěna zejména na stanovení expresních profilů onkogenů, tumor-supresorových a genů regulujících buněčný cyklus^{1,2,3}.

Vyšetřovaný soubor zahrnoval celkem 12 pacientů s MDS v době stanovení diagnózy (3 pacienti s RA/5q-, 3 pacienti s RCMD, 3 pacienti s RAEB II a 3 pacienti s RAEB-T) a 1 pacienta se sekundární AML transformované z MDS. Pro stanovení expresních profilů byly použity nylonové membrány Atlas Human Cancer cDNA Arrays (Clontech) s 588 sondami pro geny, které se mohou účastnit nádorové transformace buňky. Z leukocytů periferní krve pacientů byla izolována celková RNA, která byla posléze reverzní transkripcí převedena na komplementární DNA (cDNA) a současně radioaktivně naznačena pomocí α -32P [dATP]. Detekované expresní profily pacientů byly porovnány s expresním profilem kontrolního směšného vzorku, který obsahoval materiál od zdravých jedinců různých věkových skupin. Dvojnásobné zvýšení či snížení

hadiny příslušné mRNA bylo při komparativních analýzách považováno za signifikantní.

U většiny pacientů s MDS byl zaznamenán pokles v expresi 10 genů: junB, casper, CRAF1, c-fms, XRCC1, zyxin+zyxin-2, MMP9, PDGFA, interleukin-13 a RPSA. Změny expresních hladin některých genů úzce korelovaly s příslušným subtypem MDS. Obecně bylo pozorováno, že expresní profily pacientů v počátečních stádiích MDS, tedy refrakterní anémie (RA) a refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD), vykazovaly méně odchylek od kontrolního vzorku než pacienti s pokročilejšími subtypy MDS jako jsou refrakterní anémie s excesem blastů 2 (RAEB II) a refrakterní anémie v transformaci do AML (RAEB-T). Hladiny exprimovaných genů, které byly detekované u pacienta se sekundární AML transformované z MDS, měly velmi podobný charakter jako u pacientů s RAEB-T.

Podpořeno: VZ MZ ČR 0002373602.

LITERATURA

- Hofmann W.K., Vos S., Komor M., Hoelzer D., Wachsmann W., Koeffler H.P.: *Blood* 100, 3553 (2002).
- Miyazato A., Ueno S., Ohmine K., Ueda M., Yoshida K., Yamashita Y., Kaneko T., Mori M., Kirito K., Toshima M., Nakamura Y., Saito K., Kano Y., Furusawa S., Ozawa K., Mano H.: *Blood* 98, 422 (2001).
- Pellagatti A., Esoof N., Watkins F., Langford C.F., Vetrie D., Campbell L.J., Fidler C., Cavenagh J.D., Eagleton H., Gordon P., Woodcock B., Pushkaran B., Kwan M., Wainscoat J.S., Boulwood J.: *Brit. J. Haematol.* 2004, 125.

TRIGLYCERIDY EXTRAHOVANÉ Z TUKOVÝCH TĚLES ČMELÁKŮ

EDITA KRAFKOVÁ, JOSEF CVAČKA, JIŘÍ KINDL, OLDŘICH HOVORKA, PAVEL JIROŠ a IRENA VALTEROVÁ

ÚOCHB AV ČR Praha, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
krafkova@uochb.cas.cz

Z předchozího výzkumu¹ vyplynulo, že existuje určitá podobnost mezi složením alifatických látek v samčích značkovacích feromonech² a zastoupením mastných kyselin (včetně od nich odvozených látek) v jejich tukových tělesech. Pomocí různých chromatografických metod bylo tedy analyzováno složení tukových těles samečů u vybraných druhů čmeláků a pačmeláků (*Bombus pratorum*, *B. silvarum*, *B. subterraneus*, *Psithyrus bohemicus*, *P. rupestris*).

Tkáňový extrakt byl nejprve rozdělen na tenké vrstvy, odkud byly vybrány a zpracovány pouze triacylglyceroly (TAG). Připravené vzorky byly analyzovány metodou LC/MS s chemickou ionizací za atmosférického tlaku³. Pro lepší separaci TAG byla optimalizována metoda s nevodným chromatografickým systémem. Byly použity dvě reverzní kolony C18 (15 cm a 30 cm dlouhé) zapojené do série⁴.

Kvůli lepší citlivosti pro některé molekulární ionty TAG byla použita postkolonová derivatizace amonnými ionty. V tukových tělesech čmeláků se hojně vykytují triacylglyceroly obsahující šestnácti a osmnáctiuhlíkové kyseliny, a to nejčastěji následující: OLnO, PLnO, PoPoO, PoPoP, POO nebo OOO (kde Ln je linolenová kyselina, O je olejová kyselina, P je palmitová kyselina a Po je palmitolejová kyselina). Mimo to obsahují tuková tělesa čmeláků ještě množství triacylglycerolů s dvanácti, čtrnácti a víceuhlíkatými kyselinami, jejichž zastoupení se u různých druhů liší. Zcela jedinečným se z hlediska TAG ukázal být druh *B. pratorum*, který má velké množství triacylglycerolů obsahujících kyselinu (26:2). Což ukazuje na možnou souvislost se složením feromonu v labiální žláze, kde se vyskytuje pentakosa-7,17-dien.

Vzorky TAG byly dále transesterifikovány a pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých mastných kyselin byla použita metoda GC/MS. Výsledky těchto analýz potvrdily nejhojnější zastoupení šestnácti a osmnáctiuhlíkových mastných kyselin v čmeláčích triacylglycerolech. Ve většině vzorků převládá kyselina olejová. Analýza mastných kyselin pomocí GC/MS dále pomohla upřesnit některé sporné výsledky.

Složení mastných kyselin i triacylglycerolů se zdá být druhově specifické, mezi jedinci stejného druhu existují jen malé rozdíly. Mezi jednotlivými druhy pak existují rozdíly ve výskytu, množství a míry nasycenosti triacylglycerolů.

Práce byla provedena za podpory Grantové agentury AV ČR (grant číslo A4055403 a výzkumného záměru číslo Z4 055 905).

LITERATURA

- Jiroš P., Luxová A., Valterová I.: *Chem. Listy* 98, 1017 (2004).
- Luxová A., Valterová I., Stránský K., Hovorka O., Svatoš A.: *Chemoecology* 13, 81 (2003).
- Cvačka J., Hovorka O., Jiroš P., Kindl J., Stránský K., Valterová I.: *J. Chromatogr., A* 1101, 226 (2006).
- Holčapek M., Lisa M., Jandera P., Kabátová N.: *J. Sep. Sci.* 28, 1315 (2005).

DEHYDROGENASY METABOLISMU KORTIKOSTERONU U KUŘAT

M. KUČKA^{a,b}, J. BRYNDOVÁ^a, K. MAZANCOVÁ^a, P. KLUSOŇOVÁ^{a,b}, I. MIKŠÍK^a a J. PÁCHA^a

^aFyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha 4
^bPřírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2

Ve mineralokortikoidních tkáních (ledviny, tlusté střevo aj.), hydroxysteroid dehydrogenasy (HSD) chrání tyto tkáně před vysokou koncentrací glukokortikoidů (GK). Zabezpečují tak specifitu účinku aldosteronu přes jinak nespecifický mineralokortikoidní receptor. Naopak, jiné HSD lokálně zvyšují koncentraci aktivních glukokortikoidů a tak výsledná koncentrace aktivních steroidů ve tkáních je spíše závislá na aktivitě těchto enzymů než na jejich plazmatické koncentraci. K inaktivaci kortikosteronu v buňce dochází oxidací na uhlíku

C11 nebo redukci na C20 a je výsledkem aktivit enzymů 11 β -hydroxysteroid dehydrogenasy isoformy 2 (11 β HSD2) a 20-hydroxysteroid dehydrogenasy (20HSD). Zvýšení lokální koncentrace GK je závislé na aktivitě 11 β HSD isoformy 1 (11 β HSD1). V našich experimentech jsme sledovali lokalizaci těchto enzymů v ptačích tkáních a za využití internetové kuřecí EST databázi a alignment programů jsme sestrojili mRNA sekvenci kuřecího enzymu 20HSD. Získanou sekvenci jsme rekombinantně exprimovali a protein dále purifikovali a podrobili analýze jeho enzymové aktivity. Řezy kuřecích tkání (ledviny, tlusté střevo) metabolizovaly kortikosteron na 20-dihydrokortikosteron a z menší části na 11-dehydro-20-dihydrokortikosteron; játra metabolizovala kortikosteron výhradně na 20-dihydrokortikosteron. Při použití progesteronu jako substrátu řezy kuřecích tkání redukovaly progesteron jen na 20 β -dihydroprogesteron a redukce substrátu byla dependentní na kofaktoru NADPH. Pomocí internetové EST databáze a alignment programů jsme *in silico* sestrojili mRNA sekvenci kuřecího enzymu 20 β HSD a porovnali ji se známými sekvencemi u savčích druhů (75 % sekvenční homologie). Sekvence byla vložena do bakteriálního expresního vektoru pET-15b a rekombinantně exprimovaná v *E. coli* (BL21). Fúzní protein, který byl od cytosolárních proteinů oddělen pomocí Ni-NTA purifikačního systému, metabolizoval kortikosteron na uhlíku C20 na neaktivní 20 β -dihydrokortikosteron. Purifikovaný protein vykazoval NADPH kofaktorovou specifitu a kinetické vlastnosti podobné vlastnostem savčí 20 β HSD. Kvantitativní RT-PCR potvrdila distribuci tohoto enzymu v kuřecích tkáních s nejvyšší expresí mRNA pro 20 β HSD v tlustém střevě a ledvině. Zdá se, že enzym 20 β HSD svojí aktivitou ochraňuje buňky kuřecích tkání před vysokými koncentracemi glukokortikoidů a gestagenů a to zamezením vazby těchto steroidů na nespecifický mineralokortikoidní receptor.

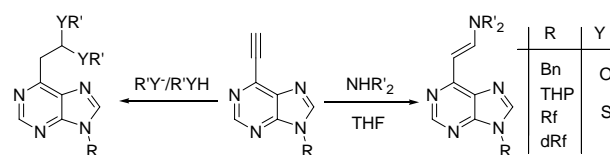
SYNTÉZA FUNKCIONALIZOVANÝCH 6-(ALKYL)PURINŮ NUKLEOFILNÍ ADICÍ NA 6-VINYL NEBO 6-ETHYNYLPURINY

MARTIN KUCHAR a **MICHAL HOCEK**

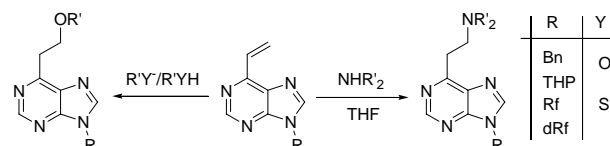
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
Kuchar@uochb.cas.cz

Puriny, substituované v poloze 6, vykazují široké spektrum biologické aktivity¹. Známe jsou antimykobakteriální, antibakteriální a cytotoxické vlastnosti 9-benzyl-6-arylpurinů. Zatím se ale stále málo ví o biologické aktivitě purinů, které mají v poloze 6 funkcionalizované substituenty. Jako vhodná metoda k jejich přípravě se ukázala nukleofilní adice na dvojnou nebo trojnou vazbu²⁻⁴.

Nukleofilní adice primárních a sekundárních aminů na trojnou vazbu vede za laboratorní teploty k příslušným enaminům. Adicí alkoholů a thiolů za katalýzy malým množstvím příslušného alkoholátu (thiolátu) na trojnou vazbu získáme acetal, resp. dithioacetal.



V případě adice *N*-nukleofilů na vinylní puriny jsme za laboratorní teploty získali sérii aminů. Adice alkoholů a thiolů vedla k etherům a sulfidům. Kyselým odstraněním THP chránících skupin jsme získali volné báze.



Tato vypracovaná metodika dosahuje dobrých výtěžků a byla úspěšně použita k syntéze řady nových látek.

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 0506, který byl podporovaný MŠMT "Centrum Nová antivirologika a antineoplastika" 1M0508 a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autoři děkují Dr. Votrubovi za testování biologické aktivity a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

LITERATURA

- (a) Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: *J. Med. Chem.* **43**, 181 (2000).
(b) Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **66**, 483 (2001).
(c) Hocek M., Holý A., Dvořáková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **67**, 325. 2002
- Øverås A. T., Bakkestuen A. K., Gundersen L. L., Rise F.: *Scan. Chem. Acta* **54**, 1116 (1997).
- Liu F., Dalhus B., Gundersen L. L., Rise F.: *Scan. Chem. Acta*, **53**, 269 (1999).
- (a) Kawasaki T., Nagatsugi F., Ali Md. M., Maeda M., Sugiyama K., Hori K., Sasaki S.: *J. Org. Chem.* **70**, 14 (2005).
(b) Nagatsugi F., Kawasaki T., Usui D., Maeda M., Sasaki S.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6753 (1999).

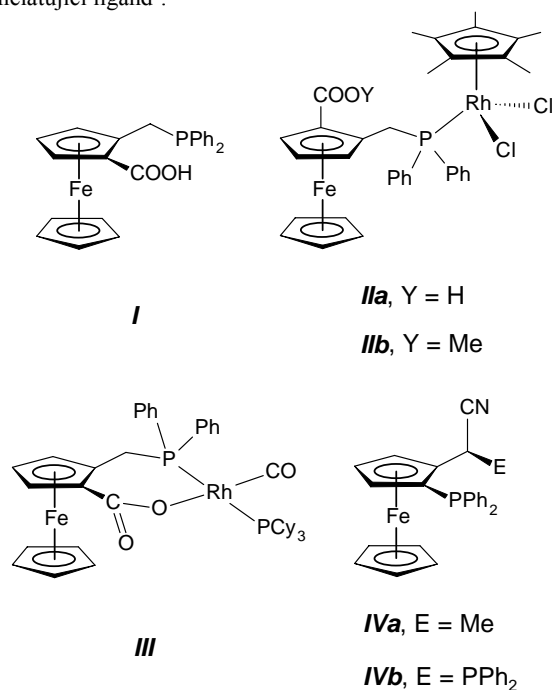
PŘÍPRAVA, CHARAKTERIZACE A KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH FERROCENOVÝCH FOSFINKARBOXYLOVÝCH KYSELIN

MARTIN LAMAČ,* **IVANA CÍSAŘOVÁ** a **PETR ŠTĚPNÍČKA**

Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlovy, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
lamacm@volny.cz

Fosfinové ligandy obsahující ferrocenový skelet byly v nedávné minulosti úspěšně využity v oblasti katalýzy organických reakcí¹ a další rozvoj aplikací této skupiny látek lze ještě očekávat. V rámci našeho výzkumu jsme se zaměřili na studium chemie ferrocenových fosfinkarboxylových

kyselin², zvláště s ohledem na strukturní rysy jejich koordinačních sloučenin. Aktuálním výsledkem naší práce je příprava racemické 2-[(difenylfosfino)methyl]ferrocenkarboxylové kyseliny (I), izomerní k dříve připravené [2-(difenylfosfino)ferrocenyl]octové kyselině³. Dále byly připraveny modelové komplexy troj- a jednomocného rhodia. Jedná se o komplexy $[\text{RhCl}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{RL-}\kappa\text{P})]$ (R = H: IIa, R = Me: IIb), kde HL označuje P-monodentátní kyselinu I a MeL její methylester, a dále o komplex $[\text{Rh}(\text{CO})(\text{L-}\kappa\text{O,P})(\text{PCy}_3)]$ (III), ve kterém se fosfinkarboxylát L- koordinuje jako O,P-chelatační ligand⁴.



Obr. 1

V současné době se zabýváme syntézou opticky čistých chirálních ferrocenových fosfinkarboxylových kyselin. V průběhu těchto pokusů bylo zjištěno, že α -alkylace racemického [2-(difenylfosfino)ferrocenyl]acetonitrilu probíhá s vysokou stereoselektivitou za vzniku produktů typu IV.5. Popsaná reakce představuje alternativní přístup v syntéze chirálních ferrocenových derivátů.

LITERATURA

- (a) Togni A., Hayashi T. (ed): *Ferrocenes – Homogenous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*. VCH, Weinheim 1995. (b) Colacot T. J.: *Chem. Rev.* 103, 3101 (2003).
- Štěpnička P.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3787.
- Štěpnička P., Císařová I.: *Organometallics* 22, 1728 (2003).
- Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: *J. Organomet. Chem.* 690, 4285 (2005).
- Lamač M., Štěpnička P.: *Inorg. Chem. Commun.*, v tisku (2006).

INDUCTION OF EXPRESSION OF NAG-1/MIC-1/GDF-15 IN PROSTATE AND COLON EPITHELIAL CELLS USING NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

EVA LINCOVÁ^{a,b}, KAREL SOUČEK^a, VIKTOR HORVÁTH^a, JIŘINA HOFMANOVÁ^a, and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Brno, 612 65; ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno

Colon and prostate cancer are leading cause of cancer death in the Western world. Antitumorigenic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are well established in several types of cancer disease. However, mechanisms driving these processes are not known in all details. Finding the biomolecular mechanisms associated with effects of NSAIDs in prostate and colon cancer is an important endeavor, and potentially will lead to novel treatment strategies. It has been shown that some effects of NSAIDs are independent on inhibition of activity of cyclooxygenases. Induction of NAG-1/MIC-1/GDF-15, gene from transforming growth factor- β superfamily is associated with pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects of some NSAIDs.

In our study, we compared effects of selected NSAIDs on induction of NAG-1 protein in several cancer and non-cancerous prostate and colon epithelial cell lines. We found significant differences in response to treatment by NSAIDs and induction of NAG-1 protein between individual cell lines. Generally, only cells with intact p53 function were able to induce expression of NAG-1 protein after treatment by NSAIDs. This observation correlates with property of NSAIDs to inhibit proliferation and induce apoptosis in p53-null cell lines. Function of NAG-1 protein in effects of NSAIDs was proofed using NAG-1 siRNA in selected cell lines. Our observation showed importance of p53 status in sensitivity to anti-proliferative and pro-apoptotic effects of NSAIDs.

Supported by Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, contract No. Pz-Z2/29 and IGA AV ČR IQS500040507.

HUMAN CARBONIC ANHYDRASE

P. MADER^a, J. BRYNDA^a, V. KRÁL^a, P. ŘEZÁČOVÁ^{a,b}, R. ŠTOURAČOVÁ^{a,c}, M. FÁBRY^a, J. ZÁVADA^a, Z. ZÁVADOVÁ^a, L. RULÍŠEK^d, M. KOŽÍŠEK^d, and J. SEDLÁČEK^a

^aInst. of Molecular Genetics, Flemingovo 2, CZ-166 37 Praha 6; ^bUT SW Med. Ctr, 5323 Harry Hines Blvd, Dallas, Texas 75390; ^cUC at Denver, Health Sciences Ctr, 4200 E. Ninth Ave. Denver, CO 80262; ^dInst. of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo 2, CZ-166 37 Praha 6 mader@img.cas.cz

Among fourteen human carbonic anhydrases, only the CA IX isoform is strongly associated with certain types of cancer. A unique structural feature of CA IX is its extra component - the proteoglycan-like (PG) segment, located at the amino terminus of the molecule. Conceivably, this segment could be of relevance for oncogenesis, therefore it deserves a more detailed investigation.

The PG amino acid sequence [Q16790; gi:5915865] comprises 59 residues:
SSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLE

A remarkable feature of the PG segment of the CA IX molecule is a high content of dicarboxylic amino acids (27 D + E out of total 59 residues) and a low content of basic ones (4 R + K). Most of the dicarboxylic amino acids are grouped in four identical repeats of the motif GEEDLP (bold) and in its three modified versions. The epitope peptide used in this study (underlined) seems to be an adequate structural representation of the protein antigen since predictions show lack of any secondary structure in the PG domain. Abnormal expression of CA IX in various commonly occurring carcinomas suggests its involvement in oncogenic pathways. CA IX is also a cell adhesion molecule (CAM) that can mediate attachment of cells to non adhesive solid support¹. For a secondary structure-lacking, flexible peptide it might be intuitively expected that such ligand would adopt a complementary shape and undergo stabilization in the complex with its cognate antibody: this would be accompanied with a loss of the conformational freedom and with an unfavorable entropy contribution, measurable with microcalorimetry methods. We show here that upon the epitope peptide binding a substantial structural re-arrangement occurs also in one of the antibody hypervariable loops and that the accompanying local stabilization can be traced in comparisons of the crystal structures of the free and complexed antibody. Somewhat unexpectedly, all substantial 3D structural transitions occur in the hypervariable loops other than those that form counterparts of the epitope dicarboxylic amino acid residues and that provide for major enthalpy contributions.

REFERENCES

1. J. Závada, Z. Zavadová, J. Pastorek, Z. Biesová, J. Ježek, J. Velek: Br. J. Cancer. 82, 1808 (2000).

PROCARYOTIC EXPRESSION OF THE NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 AND USE OF THE PROTEIN IN ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME IN PIGS

ZUZANA MARČEKOVÁ^a, EVA KOSINOVÁ^b, IVAN PŠIKAL^b, and PETER ŠEBO^a

^aInstitute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague; ^bVeterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32 Brno

Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is now a well-established disease of swine herds, causing important economic losses in many European countries, North America and Asia. PMWS is linked to the emergence of a new porcine circovirus type 2 (PCV2) that is a small non-enveloped circular single-stranded DNA virus in the Circoviridae family. PCV2 has two major open reading frames (ORFs). ORF1 encodes the viral replicase and is less variable, while ORF2 encodes the viral capsid protein (Cap) and displays a higher rate of variation. This implies that ORF2 may determine the type-specific features of PCV2. Simple and reliable diagnostic methods are sorely needed for detection of PCV2-specific antibodies and monitoring of PCV2 infection. In this study, we aim to develop a modified direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of PCV2 using the recombinant capsid protein Cap as an antigen. The cap gene was cloned using an E. coli expression vector yielding Cap protein fused to a C-terminal 6xHIS affinity tag (Cap-6xHIS). Unfortunately, however, no expression was observed. It is shown that lack of expression of Cap-6xHIS was due to rare codon usage in 5' portion of cap gene encoding an arginine rich N-terminal sequence MTYPRRRYRRRRHRPRSHLG. When this sequence was deleted, the final Cap Δ 20aa-6xHIS protein was produced at high levels. The purified truncated protein has been successfully used to develop an ELISA (Δ CapELISA) for serological detection of PCV2 infection in pig farms. Comparison of the Δ CapELISA with commercially available SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking shows a higher sensitivity of the Δ CapELISA.

ANALÝZA INTERAKCÍ RODIČOVSKÝCH GENOMŮ MEZIDRUHOVÉHO HYBRIDA *S. LATIFOLIA* x *S. VISCOSA* NA CYTOGENETICKÉ ÚROVNI

MICHAELA MARKOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav, AV ČR, Brno

Rod *Silene* L. z čeledi *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité) představuje jedinečný systém pro studium determinace pohlaví a evoluce pohlavních chromozomů u rostlin, neboť do tohoto rodu patří druhy s rozličnými strategiemi determinace pohlaví. Dioecie (dvoudomost) se zde objevila v období před 8–24 milióny let, zatímco u savců již před 300 milióny let. Je zde tedy možno studovat raná stádia evoluce pohlavních chromozomů. Tento rod je také velmi vhodný pro konstrukci mezidruhových hybridů a to zejména proto, že všechny dvoudomé druhy zde mají stejný počet chromozomů ($2n=24$). Dvoudomá *S. latifolia* byla opylena *in planta* hermafroditní *S. viscosa* za účelem studia interakce rodičovských genomů.

Metoda GISH (genomic *in situ* hybridization) umožnila jednoznačně rozlišit rodičovskou příslušnost chromozomů v hybridu. V interfázi zůstávají rodičovské genomy separovány a tvoří domény. Mitóza probíhá bez aberací, což svědčí o stabilitě hybridního genomu. Podrobnější analýza

chromozomů pomocí FISH sond ukázala, že hybrid má striktně aditivní charakter a nedochází u něj k žádným přestavbám. Repetitivní sekvence X43.1, izolovaná z *S. latifolia*, se u *S. viscosa* nenachází a je tedy zřejmě druhově specifická. Studovala jsem také lokalizaci markeru DD44, který je u *S. latifolia* vázán na pohlavní chromozomy. Byly nalezeny signály v genomu *S. viscosa*, a také na jednom autozomu pocházejícím z *S. viscosa* v hybridovi. Dle všeobecně uznávané teorie evoluce pohlavních chromozomů, se tyto vyvinuly z páru autozomů. Zde se tedy nabízí velmi zajímavá otázka, zda je tento autozom *S. viscosa* evolučním příbuzným pohlavních chromozomů. Jsou chromozomy *S. latifolia* schopné párovat se v meióze se svými homeology u *S. viscosa*? Případně párování chromozomu X s jeho homeologem by umožnilo přímo studovat rozsah homologie a událostí vedoucí ke vzniku pohlavních chromozomů (delece, inverze, duplikace ...)

Podrobná cytogenetická analýza odhalila nepravidelný průběh meiózy. Zvláště v anafázi I a anafázi II dochází ke vzniku četných opožděných chromozomů a můstků. Zjistila jsem, že chromozomy *S. latifolia* a *S. viscosa* se již při meióze téměř nejsou schopny párovat. Tyto chromozomy zřejmě v průběhu evolučních změn divergovaly natolik od svého společného předka, že zde již není možné na cytogenetické úrovni párování analyzovat. Neschopnost synapse chromozomů může být způsobena také rozdílem ve velikosti rodičovských genomů. Chromozom X je asi dvakrát větší než průměrný autozom *S. viscosa*. GISH a FISH dokumentují, že právě chromozom X se na můstcích podílí velmi často. Skutečnost, že se chromozom X ze *S. latifolia* v hybridu vůbec nepáruje, znemožnila prozatím potvrzení existence jeho homeologa u *S. viscosa*. Pro vyřešení této otázky bude třeba izolovat další pohlavně vázané markery, použitelné o obou druhů. Hybrid *S. latifolia* x *S. viscosa* bude nadále využíván také pro studium evoluce repetitivních DNA sekvencí.

Tento výzkum byl podporován Grantovou agenturou ČR (204/05/H505 a 521/05/2076).

ANALÝZA EXPRESE P53-SIGNÁLNÍCH GENŮ U MALIGNÍCH BLASTŮ PO PŮSOBENÍ METHOTREXÁTU

EVA MICHALOVÁ^a, JAROSLAV ŠTĚRBA^{a,c}, SOŇA BABČANOVÁ^a, KATEŘINA KRÍVÁNKOVÁ^a, DALIBOR VALÍK^b a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^b

^aMasarykův onkologický ústav, Oddělení patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno; ^bMasarykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno; ^cFakultní nemocnice Brno, Klinika dětské onkologie, Černopolní 9, 663 62 Brno

Methotrexát je nejčastěji používaným antifolátem při léčbě pacientů s akutní leukémií. Působí jako silný inhibitor enzymu dihydrofolátreduktasy podílejícího se na regulaci metabolismu folátů v buňce, což vede k celkovému snížení syntézy DNA. Vlastní mechanismus odpovědi leukemických

buněk na „high-dose“ terapii methotrexátem však není doposud zcela objasněn.

Z kostní dřeně pacientů s akutní leukémií byly izolovány naivní blasty a kultivovány s methotrexátem 24 hodin *ex vivo*. Byla provedena imunocytochemická analýza p53 a pomocí techniky cDNA GEArray byly sledovány změny exprese p53-signálních genů u pacientů trpících ALL a AML.

U všech pacientů bylo možné pozorovat zvýšenou expresi řady proapoptických genů např. BBC3 či BAX a naopak velmi nízkou hladinu, případně pokles exprese BCL2. U dané skupiny pacientů byla pozorována pouze bazální transkripční aktivita TP53 a ani vlivem methotrexátu se výrazně neměnila. Naproti tomu docházelo k významným změnám v expresi genu kódujícího protein MDM2 negativně regulující endogenní hladinu p53. Působením methotrexátu rostla u většiny pacientů exprese genů, jejichž produkty navozují zástavu buněčného cyklu: p21Waf1/Cip1, p16ink4 a MTBP. Ze skupiny genů kódujících produkty schopné modifikovat p53 byly prokázány vysoké hladiny exprese CSNK1A1, JNKK2, SIRT1 či HIPK2. Změny exprese po vystavení buněk methotrexátu byly detekovány i u řady transkripčních faktorů či vazebných proteinů (SP1, p300). U každého pacienta byly zaznamenány výrazné změny exprese i u dalších genů, avšak tyto změny měly spíše individuální charakter.

Z výsledků studie vyplývá, že methotrexát navozuje u maligních blastů změny v expresi řady p53-signálních genů. Nicméně byla detekována značná míra variability v transkripční aktivitě jak při porovnání expresních profilů v rámci jednotlivých typů leukémie, tak i u pacientů se stejnou diagnózou. Přesto se podařilo nalézt několik kandidátních genů, které by mohly hrát významnou úlohu při objasnění mechanismu buněčné odpovědi na působení cytostatika.

Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR No. NR8338-3/2005 a MZO 000209805.

DEGENERACE NEURONÁLNÍCH BUNĚK HIPPOCAMPU PO PERINATÁLNÍ EXPOZICI ALKOHOLU

M. MILOTOVÁ

Fyziologický ústav 1.LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha 2

Experiment směřuje k objasnění vlivu ethanolu, jako neurotoxické látky, na vývoj populací neuronálních a gliálních buněk v hippocampu. Tato studie by mohla přispět k objasnění poškození mozku v perinatálním období.

V tomto experimentu jsme podávali 20 % roztok ethanolu, p.o., březím samicím laboratorních potkanů typu Wistar. Účinná látka byla aplikována denně, od prvního dne březosti (21 dnů) do odstavení mláďat (28.den). Mláďata tak byla vystavena prenatální i postnatální expozici ethanolu. 35. den postnatálního vývoje byla mláďata transoatálně perfundována (neutrálním roztokem paraformaldehydu) v hluboké thiopentalové narkóze, jejich mozky vyjmuty a zpracovány

na kryostat. Následně byly řezy obarveny kombinací DNA barvení Hoechst (Sigma-Aldrich) a Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.). Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu AX 70 s epifluorescencí.

U zvířat, která byla transortálně perfundována 35. den postnatálního vývoje, jsme se především zaměřili na morfolo- gické změny v oblastech hippocampu: CA1 a CA3 a na oblast dorzálního a ventrálního listu gyrus dentatus. Ve všech oblastech bylo možné pozorovat skupiny stále degenerujících buněk. Dále jsme tu identifikovali buňky s jemně granulovanými jádry a velké množství gliie.

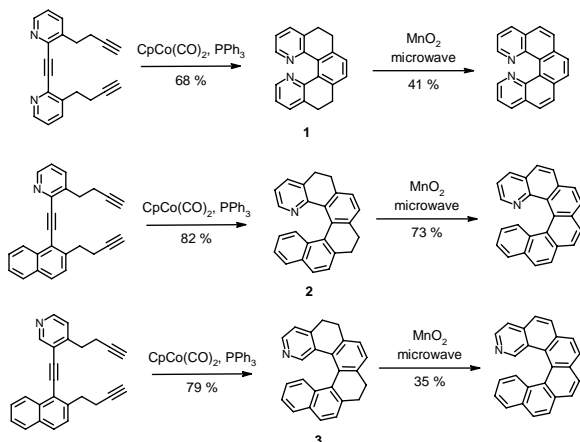
U 35-ti denních zvířat, která byla vystavena prenatalní a postnatální expozici 20 %-ního ethanolu, byly v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v obou listech gyrus dentatus jasně patrné morfolo- gické změny neuronálních a gliálních buněk. Pozoruhodné bylo zjištění, že i týden od poslední expozice alkoholu, zde bylo možné pozorovat ještě degenerující buňky, což svědčí o nastartování určitého procesu, pravděpodobně apoptózy. Apoptickému mechanismu zániku neuronálních a gliálních buněk by nasvědčovala i identifi- kace buněk s jemně segmentovanými jádry, což je jeden z hlavních znaků apoptózy. V ostatních oblastech hippocampu bylo také možné pozorovat morfolo- gické změny neuronálních a gliálních buněk.

SYNTHESIS OF FULLY AROMATIC AZAHELICENES

JIŘÍ MÍŠEK, FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ*, IVO STARÝ*, and DAVID ŠAMAN

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6
misek@uochb.cas.cz*

Azahelicenes and their derivatives have been rather rare although they might find interesting applications in various branches of chemistry. As the presence of nitrogen usually disqualifies the photodehydrocyclization approach¹⁻², we have developed an alternative route using intramolecular [2+2+2] cycloisomerization³⁻⁵ of heteroaromatic triynes under Co(I) or Ni(0) catalysis.



Using this novel approach, we have prepared tetrahydroazahelicenes 1-3. For the final dehydrogenation step, routine methods have proved to be unsuccessful. Therefore, we have developed a new protocol based on microwave-assisted MnO_2 oxidation. It has provided a direct access to a series of fully aromatic azahelicenes.

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Reg. No. 203/06/1792), Ministry of Industry and Trade/Zentiva (Reg. No. FI-IM/073), and Ministry of Education, Youth and Sports (Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems, Reg. No. LC05A57).

LITERATURA

1. Murguly E., McDonald R., Branda N. R.: *Org. Lett.* 2, 3169 (2000).
2. Martin R. H., Deblecker M.: *Tetrahedron Lett.* 10, 3597 (1969).
3. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 13, 2547 (2005).
4. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* 68, 5193 (2003).
5. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9175 (2002).

OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA V LISTECH TABÁKU SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ CYTOKININOXIDASY/DEHYDROGENASY BĚHEM STÁRNUTÍ

ZUZANA MÝTINOVÁ^{a,b}, NAĎA WILHELMOVÁ^b, VÁCLAV MOTYKA^c, DANIEL HASEL^b, JIŘÍ MALBECK^c a PETR DOBREV^c

^aUniverzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bÚstav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6; ^cÚstav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 00 Praha 6 – Lysolaje

Během stárnutí se v buňkách tvoří reaktivní formy kyslíku (ROS-reactive oxygen species). Primárním zdrojem jejich produkce jsou chloroplasty, ve kterých jsou také viditelné první symptomy. Předpokládá se, že ROS významně přispívají k spuštění senescence, poslední fáze stárnutí. Tyto volné radikály napadají biomakromolekuly a tím ničí buněčné kompartmenty a způsobují tak oxidační stres a následné poškození. Udržení hladiny ROS je v rostlinách zajištěno prostřednictvím antioxidačního systému (enzymatického a neenzymatického). Senescence je také regulovaná fytohormony, např. cytokininy, které jsou považovány za inhibitory senescence. Jedna z možností regulace obsahu cytokininů je nevratná degradace katalyzovaná cytokininoxidasou / dehydrogenasou.

Sledovali jsme fotosyntetickou účinnost, oxidační poškození proteinů a antioxidační ochranu (enzymatickou i neenzymatickou) u listů transgenního tabáku se zvýšenou

expresi cytokininoxidasou/dehydrogenasou (CKX)1 s různým stářím. Transgenní rostliny vykazovaly zvýšenou aktivitu CKX a tudíž snížený obsah cytokininů. Nárůst aktivity CKX způsobil i změnu fenotypu. Rostliny byly nižší, keříčkovitého vzhledu, měly méně listů, ty byly menší a tlustší. Kořenový systém transgenních rostlin byl vyvinutější. Pomocí parametrů kinetiky fluorescence chlorofylu jsme zjistili, že fotosyntetický aparát transgenních rostlin v nejstarších listech byl mnohem méně poškozen ve srovnání s kontrolami. Obsah rozpustných proteinů byl ve starých listech vyšší než tomu bylo u kontrol a oxidační poškození těchto proteinů bylo nižší v celé rostlině. Transgenní rostliny vykazovaly vyšší obsah chlorofylu ve všech listových patrech. Antioxidační ochrana představovaná β -karotenem a xantofylovými pigmenty byla v transgenních rostlinách zvýšená. Nárůst aktivity glutathionreduktasy oproti kontrole byl pozorován v celé transgenní rostlině, aktivita superoxidodismutasy byla zvýšena jen v mladých listech, aktivita askorbatperoxidasy ve starých listech a aktivita katalasy byla v mladých listech snížena.

Přestože transgenní rostliny měly nižší obsah cytokininů, nebyly u nich pozorovány projevy senescence na rozdíl od kontrolních rostlin. Nelze tedy zcela vyloučit existenci vztahu mezi zvýšenou aktivitou CKX a lepší antioxidační obranou a ochranou fotosyntetického aparátu.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného GA ČR (č. 522/03/0312 a č. 206/03/0313.)

LITERATURA

1. Werner T., Motyka V., Strand M., Schmölling T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98,10487 (2001).

IN VITRO INFLUENCE OF GLIVEC AND OTHER TYROSINE KINASE INHIBITORS ON PRIMARY CML CELLS

EVA OTÁHALOVÁ, HANA KLAMOVÁ, CEDRIK HAŠKOVEC, and JANA MORAVCOVÁ

*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic
eva.otahalova@uhkt.cz*

The first choice treatment of chronic myeloid leukemia (CML) is Glivec (imatinib mesylate, STI571). However, patients resistant to Glivec exist. The resistance can be caused by mutations in the ATP-binding site, BCR-ABL amplification, or involvement of other protein kinases who take over the role of BCR-ABL in the CML pathogenesis¹.

In our study we tested 40 CML patients before and during Glivec therapy (3–20 months after the first dose). Before the therapy we implemented an *in vitro* short term cultivation (24–48 hours) of the primary cells with Glivec (1 and 10 μ M) and other inhibitors of protein kinases. Namely we used PP2 (selective inhibition of Src family), Herbimycin A (inhibition of Src family, PDGF and c-ABL), JAK Inhibitor I (inhibition of JAKs), AG 490 (inhibition of JAK family and EGFR), Wortmannin (inhibition of PI3-kinase,

MAP kinases and PDGF) and PD 98059 (inhibition of MAP kinases). The effect of inhibitors was characterized by cell vitality monitoring, proliferation (expression of the proliferative marker Ki67) and expression of BCR-ABL and WT1 genes. Gene expression was measured by real-time RT-PCR. Protein levels were monitored by Western blotting.

According to the expression of WT1 after *in vitro* cultivation of primary cells with Glivec the monitored patients were divided into two groups:

1. RESPONDERS: In the case of 33 patients (83 %) the Glivec induction led to cell vitality deterioration, monitored genes down-regulation (to 30 % of the original expression in non-affected cells on average). All patients from this group clinically responded to Glivec therapy well. All of them reached complete hematologic response within 4 weeks after the first dose, 10 of them complete cytogenetic remission for the present.

2. NON-RESPONDERS: In the case of the 7 remnant monitored patients (17 %) only a slight gene down-regulation (to 90 % of the original expression in non-affected cells) was observed. The phenomenon of cell vitality deterioration and monitored genes down-regulation was here attained after cultivation with inhibitors of Src family kinases (PP2, Herbimycin A). These patients did not respond to Glivec therapy, 3 of them died so far. We observed increased number of BCR-ABL copies and accessory chromosomal changes.

Our results suggest that in some cases of Glivec resistant patients the role of BCR-ABL in the CML pathogenesis could be supplanted by Src kinases. Further monitoring of the involved patients is necessary to determine the suitability of this approach for clinical practice.

This study was supported by grant NR/8758 - 3 IGA MZCR.

REFERENCES

1. Donato N.J., Wu J.Y., Albitar M.: Blood 98, 770a (2001).

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NADPH-DEPENDENT PHENOL HYDROXYLASE FROM YEAST *CANDIDA TROPICALIS*

JAN PÁČA and MARIE STIBOROVÁ

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2
jan.paca@volny.cz*

Phenol is an aromatic pollutant present in wide variety wastewaters. *Candida tropicalis* can use phenol as the sole carbon and energy source. The first step of the aerobic degradation pathways of phenol in yeast involves its hydroxylation to catechol. Catechol can undergo fission either by an intradiol or an extradiol type of cleavage (*o*- or *m*-fission). There is very little known of the phenol-oxidizing enzymes in this microorganism. Cytosolic NADPH-dependent phenol 2-hydroxylase (EC 1.14.13.7) oxidizes phenol in various eukaryotic microorganisms. Here we proved, that this enzyme is responsible for the first step of

phenol degradation also in *C. tropicalis*. But information on this enzyme isolated from *C. tropicalis* is scarce.

We found that NADPH-dependent phenol hydroxylase is present in cytosolic subcellular fraction isolated from *C. tropicalis* grown on phenol as a carbon source. This enzyme is induced by phenol itself. The major metabolite formed from phenol by cytosolic NADPH-dependent phenolhydroxylase of *C. tropicalis* was characterized by UV/vis absorbance and mass spectroscopy as well as by the chromatographic properties on HPLC. The characteristics are identical to those of catechol. The enzyme was purified from the cytosolic fraction of *C. tropicalis* to homogeneity by the procedure consisting these steps: chromatography on DEAE-Sephrose, fractionation by polyethylene glycol 6000 and gel filtration on Sepharose 4B. NADPH-dependent phenolhydroxylase of *C. tropicalis* is a homotetramer having a molecular mass of 240 000. pH optimum of the enzyme lies at pH of 7.4-7.6. The results are the first report showing isolation and partial characterization of cytosolic NADPH-dependent phenol hydroxylase from yeast *C. tropicalis* capable of oxidation of phenol to catechol.

The work was financially supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant 303/05/2195).

tmRNA VE VÝVOJI STREPTOMYCET PRODUKUJÍCÍCH ANTIBIOTIKA

**PETRA PALEČKOVÁ, JAN BOBEK, JÜRGEN
FELSBERG a KAREL MIKULÍK**

MBÚ, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

Bakteriální tmRNA označovaná také jako SsrA, nebo 10Sa RNA má klíčovou úlohu v kontrole kvality proteosyntézy. Je to unikátní molekula s funkcí tRNA a mRNA v procesu označovaném jako *trans*-translace. Když ribosomy překládají 3' konec nekompletní mRNA nebo mRNA nemající stop kodon, na tRNA část tmRNA je přenesen alanin alanyl-tRNA syntetasou za vzniku alanyl-tmRNA. Alanin vstupuje do akceptorového(A) místa ribosomu, pak je spojen s nehotovým polypeptidovým řetězcem. To je signál pro translaci mRNA části tmRNA kodující specifický polypeptid, který rozeznává ATP-závislá proteinasa a pak je celý nehotový peptid degradován. Ribosomy jsou uvolněny z komplexu a mohou znovu vytvořit iniciační komplex. tmRNA kontrolní mechanismus nedegraduje pouze aberantní polypeptidy jednou vytvořené, ale brání vzniku aberantních polypeptidů rychlou eliminací poškozené mRNA. Bylo zjištěno, že funkční *trans*-translační systém je vyžadován pro přežití některých bakterií v přítomnosti antibiotik.

Dosud nebyla objasněna funkce tmRNA u streptomycet produkujících antibiotika interferující s proteosyntézou. Abychom objasnili význam tmRNA u producenta tetracyklinu *Streptomyces aureofaciens*, sledovali jsme rozdíl v hladinách tmRNA v průběhu vývoje buněk, které syntetizovaly tetracyklin a u buněk, kde změnou kultivačních podmínek tetracyklin nebyl produkován. Buňky produkující tetracyklin, dosahují maxima rychlosti proteosyntézy ve 24 h

kultivace. Zvýšení koncentrace tetracyklinu na 200 µg/ml je spojeno s rychlým poklesem rychlosti proteosyntézy; buňky akumulují ribosomální podjednotky a hladina tmRNA vzrůstá až do 48 h kultivace. Buňky, které neprodukují tetracyklin mají hladinu tmRNA o 30 % nižší, maximum rychlosti proteosyntézy je dosaženo ve 32 h (je asi o 40 % nižší než maximum u buněk syntetizujících tetracyklin) a nedochází k akumulaci ribosomálních podjednotek. Je známo, že tetracyklin interferuje s vazbou aminoacyl-tRNA na A-místo ribosomu. Zjistili jsme, že akumulace tetracyklinu je spojena i se zvýšením rychlosti syntézy ppGpp. Obsazení A-místa vede k poklesu syntézy stabilní RNA a tím lze vysvětlit i redukcí rychlosti translace o 80 % v pozdější fázi vývoje kultury, kdy dosahuje produkce tetracyklinu až 2000 µg/ml. Nadprodukce tetracyklinu vede ke vzniku tetracyklin-ribosomálních agregátů, které rychle sedimentují a jsou neaktivní při translaci. Naše výsledky nasvědčují, že vzrůst hladiny tmRNA v počátečních fázích biosyntézy tetracyklinu je spojen s uvolňováním ribosomů z aberantních komplexů. Sledovali jsme účinek subletálních koncentrací kiromycinu, chloramfenikolu, streptomycinu a tetracyklinu na hladinu tmRNA u *S. aureofaciens*. Zjistili jsme, že uvedená antibiotika zvyšují hladinu tmRNA. Streptomycety jsou půdní mikroorganismy, které jsou vystaveny různým změnám prostředí vyvolávající stres. My jsme sledovali účinek chladového a teplotního šoku na hladinu tmRNA. Zjistili jsme, že pokles teploty z 28 °C na 12 °C stimuluje maturaci prekursorové tmRNA a zvyšuje hladinu funkčně aktivní tmRNA. Teplotní šok z 28 °C na 37 °C vedl k výraznému poklesu tmRNA. Výsledky našich experimentů prokázaly, že *trans*-translační systém je důležitou součástí mechanismů umožňující přežití mikroorganismů ve stresových podmínkách.

VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ KADMIA NA MATURACI SOMATICKÝCH EMBRYJŮ SMRKU

**JIRÍ PETŘEK^a, DANIELA ŠIGUTOVÁ^a, JAN
VÍTEČEK^a, JITKA PETRLOVÁ^b, LADISLAV
HAVEL^a, JIRÍ BALOUN^a, VOJTĚCH ADAM^{b,c}
a RENÉ KIZEK^b**

^aÚstav biologie rostlin, ^bÚstav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kottlářská 2, 611 37 Brno
j.petrek@email.cz, kizek@sci.muni.cz

Somatická embryogeneze se stala velmi významnou metodou pro rychlé množení jehličnatých i listnatých stromů *in vitro*; umožňuje během krátkého časového období produkovat velká množství identických rostlin z malých explantátů. Celý proces somatické embryogeneze probíhá na živných médiích v laboratorních podmínkách a značně se podobá procesu vytváření zygotických embryí v semenech na stromech, zejména u konifer¹. Celý proces od odvození embryogenní kultury až po získání nových rostlin lze rozdělit do několika fází: indukce, proliferace a multiplikace základních embryonálních struktur (proembrya, raná

somatická embrya), maturace somatických embryí (SE) za pomoci abscisové kyseliny (ABA), desikace zralých SE, konverze desikovaných SE v rostlinky ("klíčení") a růst prvních jehlic, a nakonec převedení vyvinutých rostlinek do substrátu. Mezi takto vzniklými zárodky a zárodky zygotickými neexistuje výrazný rozdíl; právě pro tuto jejich podobnost můžeme kultury somatických embryí využít jako modelové kultury pro sledování vlivu těžkých kovů na embryogenezi.

V naší práci jsme studovali, jaký vliv má těžký kov (kadmium) na průběh maturace somatických embryí smrku. Sledovali jsme růst a životnost kultury, množství vytvořených zralých somatických embryí a také obsah thiolových sloučenin (glutathion a fytochelatin), kterými se kultura brání proti působení těžkých kovů. Použili jsme tři různé koncentrace kadmia (50, 250 a 500 $\mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$) a získané výsledky porovnali s variantou bez těžkého kovu. Pro experimenty byla vybrána kultura raných somatických embryí (RSE) smrku pichlavého^{2,3}. Pro stanovení růstu kultur byla využita optimalizovaná metoda analýzy obrazu. Ke stanovení životnosti buněk jsme využili tzv. „test dvojitého barvení“ založený na selektivní permeabilitě cytoplasmatické membrány. Kromě základních biologických parametrů (růst a životnost) byl zkoumán vliv kadmia na schopnost tvořit maturující (zrající) SE. Ze zjištěných poznatků jasně vyplynulo, že kadmium inhibuje tvorbu zralých SE. V průběhu experimentu byla dále sledována aktivita intracelulárních esteraz, kterou lze v tomto případě využít jako další marker životnosti buněk, a množství vytvořených obranných látek (thiolových sloučenin – glutathion, fytochelatin), jejichž syntézou se rostliny intenzivně brání proti působení těžkých kovů. Výsledná aktivita intracelulárních esteraz byla v korelaci s tvorbou thiolových sloučenin a klesala do čtvrtého týdne kultivace, poté naopak rostla, což souvisí s dozráváním SE⁴.

Práce na tomto projektu byla podporována grantem: GA ČR 525/04/P132.

LITERATURA

- Petek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 576 (2005).
- Petek J., Vacek J., Kizek R., Vitecek J., Havel L.: *Acta Phys. Plantarum* 26, 207 (2004).
- Vacek J., Petek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: *Bioelectrochemistry* 63, 347 (2004).
- Vitecek J., Adam V., Petek J., Babula P., Novotna P., Kizek R., Havel J.: *Chem. Listy* 99, 496 (2005).

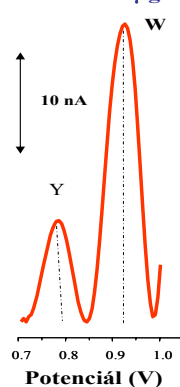
STUDIUM AVIDINU/STREPTAVIDINU V GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ROSTLINÁCH POMOCÍ VOLTAMETRICKÝCH A AMPEROMETRICKÝCH TECHNIK

JITKA PETRLOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}, LADISLAV HAVEL^c, KARL J. KRAMER^d a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, ^cÚstav biologie rostlin, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie, Masarykova univerzita, PŘF, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR, ^dGrain Marketing and Production Res. Ctr, Agricultural Res. Service, US Dept of Agriculture, Manhattan, KS 66502, USA jitap@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

Zabezpečení potravinářských surovin pro stále expandující lidskou populaci je hlavním cílem Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO). K dosažení tohoto cíle je nezbytné využít nových biotechnologických postupů. Navíc sledování kvality potravin je významnou prioritou Evropské unie a moderního potravinářského průmyslu. Pro výživu je využíváno několik málo rostlinných druhů, jako například ječmen (*Hordeum vulgare*), rýže (*Oryza sativa*),

Avidin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



slunečnice (*Helianthus annuus*), pšenice (*Triticum aestivum*) a kukuřice (*Zea mays*). Všechny tyto výše jmenované rostliny jsou předmětem zájmu genetických modifikací (GMO) za účelem získání výhodné vlastnosti. Je známo, že produkce kvalitních potravin je velmi často potlačena působením škodlivého a nežádoucího hmyzu^{1,2}. Nedávno se zjistilo, že avidin je toxický pro široké spektrum škůdců (motýly, brouci, a dvoukřídly hmyz). Z tohoto důvodu byl gen pro avidin přenesen do rostlin kukuřice. GMO kukuřice exprimují dobře avidin, avšak

studium intenzity exprese v různých pletivech rostliny je stále velmi obtížné. Z těchto důvodů je nezbytné vyvíjet specifické a jednoduché postupy pro detekci a kvantifikaci avidinu/streptavidinu v rostlinách. Navíc zvýšená poptávka a produkce o geneticky modifikovanými druhy rostlin přináší potřebu informovat zákazníka. Velmi vhodným nástrojem studia exprese avidinu mohou být elektrochemické senzory. V naší práci bylo elektrochemické měření provedeno na analyzátoru Autolab. Systém elektrod byl složen z uhlíkové pastové pracovní elektrody, Ag/AgCl/3 M KCl referenční elektrody a platinový drátek pomocné elektrody. Acetátový pufr (0,1 M CH_3COOH + 0,1 M CH_3COONa , pH 4,0) byl použit jako základní elektrolyt. Parametry pro adsorptivní transferové rozpouštěcí square wave voltametrii (AdTS SWV) byly následující: iniciační potenciál = 0,1 V, a potenciál = 1,3 V, amplituda = 25 mV, step potenciál = 5 mV, a frekvence = 200 Hz. Elektroanalytické stanovení umožnilo ultrasenzitivní analýzu avidin/streptavidinu v koncentraci nižší než 0,7 fM (3,2 zmol v 5 μl kapce) a 174 nM v extraktu semen transgeni kukuřice. Námí vypracovaná elektrochemická metoda byla dále využita pro stanovení avidinu i u jiných GMO (rýže a rostlina bramboru). Dále byla tato metoda ověřena při stanovení avidinu v několika rozdílných kukuřičných produktech dostupných v obchodní síti.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132.

LITERATURA

1. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejdus B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 1167 (2005).
2. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* **75**, 2663 (2003).

AlQ₃ KOMPLEXY S KONJUGOVANÝMI CHROMOFORY – PŘÍPRAVA, VLASTNOSTI A APLIKACE

RADEK POHL^a a PAVEL ANZENBACHER Jr.^b

^a*Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6;* ^b*Center for Photochemical Sciences, Bowling Green State, University, Bowling Green, Ohio 43403, USA*
pohl@uochb.cas.cz

Organické světlo emitující diody (OLEDy)¹ jsou zdroje světla různých vlnových délek pracující na principu elektroluminiscence pocházející z organické sloučeniny. Organickou sloučeninou může pak být jak nízkomolekulární látka – nejčastěji koordinační sloučenina nebo konjugovaný polymer. OLEDy jsou technologií budoucnosti² pro displeje, elektronický papír a různá další zobrazovací zařízení, protože mají oproti klasickým CRT obrazovkám nebo LCD displejům řadu předností, zejména malou spotřebu energie, vysoké rozlišení a kontrast. Jejich další důležitou předností je fakt, že jsou konstrukčně velmi tenké a ohebné.

Tato práce se zabývá laděním optických vlastností, zejména barvy emise, v aluminum tris(8-hydroxy-chinolinolátu (AlQ₃). AlQ₃ byl jednou z prvních sloučenin, u kterých byla zjištěna elektroluminiscence při nízkém napětí³. V naší studii jsme ladili energetický rozdíl HOMO-LUMO v 8-hydroxy-chinolinolátovém ligandu připojením elektronově chudých nebo elektronově bohatých aromatických nebo heteroaromatických konjugovaných substituentů^{4,5} v poloze 5. U připravených sloučenin byly studovány jejich optické vlastnosti, především vlnová délka emise a kvantový výtěžek. Byla také studována elektroluminiscence OLEDů zkonstruovaných z připravených sloučenin⁶.

LITERATURA

1. Kelly S. M.: *Flat Panel Displays: Advanced Organic Materials*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2000.
2. Felton M. J.: *Today's Chemist at Work* **10**, 30 (2001).
3. Tang C. W., VanSlyke S. A.: *Appl. Phys. Lett.* **51**, 913 (1987).
4. Pohl R., Anzenbacher P. Jr.: *Org. Lett.* **5**, 2769 (2003).
5. Pohl R., Montes V. A., Shinar J., Anzenbacher P. Jr.: *J. Org. Chem.* **69**, 1723 (2004).
6. Montes V. A., Li G., Pohl R., Shinar J., Anzenbacher P. Jr.: *Adv. Mater.* **16**, 2001 (2004).

AMPHIPHILIC CALIX[4]ARENES: IMPORTANT FACTORS FOR COMPLEXATION OF SMALL MOLECULES

MICHAELA POJAROVA^{a,b}, GENNADY A. ANANCHENKO^a, KONSTANTIN A. UDACHIN^a, JOHN A. RIPMEESTER^a, ANTHONY W. COLEMAN^c, and IVAN STIBOR^b

^a*NRC Steacie Institute for Molecular Sciences, National Research Council Canada, Sussex Dr. 100, KIA 0R6 Ottawa, Ontario, Canada;* ^b*Depart Org. Chem., VŠCHT, Technická 5, 166 00 Prague 6, Czech Republic;* ^c*Institut de Chimie et Biologie des Proteins, Lyon Cedex, France*

Calix[n]arenes represent a promising group of compounds which can be used for complexation of a variety of substances and these abilities can be improved by chemical modification of the host. The Friedel-Crafts acylation of the upper rim provides easy access to the so-called amphiphilic calix[n]arenes which are still able to complex small molecules and also to self-organize into solid lipid nanoparticles in water to serve as prospective carrier systems. In this work we studied the main factors leading to the formation of different types of inclusion complexes with various guest molecules, such as TEMPO¹, stilbene², dibenzylketone³, THF or dioxane⁴. The crystalline inclusion complexes were isolated from the solutions of calixarenes in liquid guest or in ethanol in the presence of guests and they were characterized by ¹³C CP-MAS NMR, TGA, DSC, powder and single-crystal XRD. It was found that the important factor for the complexation of small molecules is the length of the acyl chain and the presence of carbonyl group. The latter fixes the position of first two carbon atoms of acyl arm in the plane with phenyl ring and therefore improves the guest access to the calixarene pocket for the case of *p*-hexanoyl calix[4]arene. However, the increasing arm length diminishes the accessibility of the cavity due to strong van der Waals interactions with acyl arms of neighboring calixarenes in crystal lattice. Therefore, the higher calixarenes (starting with *p*-dodecanoyl) can build only self-included complexes where acyl arm of one molecule is included into the cavity of another molecule. In comparison to the *p*-acyl calix[4]arenes the *p*-*n*-alkyl calix[4]arenes can form only self-included complexes due to the absence of “directing” effect of C=O group.

This work was supported in part by the CNRS-NRC collaborative program.

REFERENCES

1. Ananchenko G. S., Pojarova M., Udachin K. A., Leek D. M., Coleman A. W., Ripmeester J. A.: *Chem. Commun.* **2006**, 386.
2. Ananchenko G.S., Udachin K.A., Ripmeester J.A., Jebors S., Shalgaldian P., Coleman A.W.: *Chem. Eur. J.* **12**, 2441 (2006).
3. Ananchenko G.S., Udachin K.A., Pojarova M., Dubes A., Ripmeester J.A., Perrier T., Coleman A.W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1585 (2006).

4. Ananchenko G. S., Udachin K. A., Pojarova M., Dubes A., Ripmeester J. A., Jebors S., Coleman A. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, submitted

THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE BINDS COVALENTLY TO DNA AFTER ITS ACTIVATION BY PEROXIDASES

JITKA POLJAKOVÁ^a, TOMÁŠ ECKSCHLAGER^b, EVA FREI^c, and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDept Biochem., Fac. Sci., Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; ^bClin. Paed. Haematol. Oncol., 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Úvalu 84, 150 00 Prague 5; ^cDept Mol. Toxicol., German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II and cytochrome P450 (CYP)-mediated formation of covalent DNA adducts. This agent and some its derivatives are used in the therapy of breast cancer and leukemia. This is the first report on the molecular mechanism of ellipticine oxidation by peroxidases (human myeloperoxidase, human and ovine cyclooxygenases, bovine lactoperoxidase, horseradish peroxidase) to species forming ellipticine-DNA adducts. The enzymatic systems present in the tumor cells mediate the activation of the antineoplastic agents to form two ellipticine-derived DNA adducts. Using NMR spectroscopy, the structures of two ellipticine metabolites were identified; the major product is the ellipticine dimer, in which the two ellipticine skeletons are connected via N6 of the pyrrole ring of one ellipticine molecule and C9 in the second one. The minor metabolite is ellipticine N2-oxide. Using ³²P postlabeling and [³H]-labeled ellipticine, we showed that ellipticine binds covalently to DNA after its activation by peroxidases. The DNA adduct pattern induced by ellipticine consisted of a cluster of up to four adducts. The two adducts are indistinguishable from the two major adducts generated between deoxyguanosine in DNA and either 13-hydroxy- or 12-hydroxyellipticine or in rats treated with ellipticine, or if ellipticine was activated with human hepatic and renal microsomes. The results presented here are the first characterization of the peroxidase-mediated oxidative metabolites of ellipticine and we have proposed species, two carbenium ions, ellipticine-13-ylium and ellipticine-12-ylium, as reactive species generating two major DNA adducts seen in vivo in rats treated with ellipticine.

Activation of ellipticine to a DNA binding species by peroxidases is an interesting finding in view of the compound's activity against human leukemia and other tumors like neuroblastoma cancer. The results obtained in this study might, moreover, be employed for development of new drugs utilizing in gene therapy and for tumor targeting.

Supported by the GACR (203/06/0329) and Ministry of Education of CR (grant MSM0021620813).

REFERENCES

1. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer* 107, 885 (2003).
2. 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).

SLEDOVÁNÍ RŮSTU CÉVNÍCH ENDOTHELIÁLNÍCH BUNĚK NA FIBRINOVÝCH VRSTVÁCH

TOMÁŠ RIEDEL, EDUARD BRYNDA, JAN EVANGELISTA DYR, ELENA FILOVÁ, JAROSLAV CHLUPÁČ a LUCIE BAČÁKOVÁ

Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2; Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6; Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

Poškozené cévy jsou běžně přemostěny syntetickými cévními protézami. Trombogenita povrchu může vést k ucpání protéz, obzvláště u protéz s malým průměrem. Povrchové modifikace, včetně osázení endoteliálními buňkami (EC), jsou prováděny pro zlepšení hemokompatibility. Fibrinové sítě se používají k utěsnění pletených cévních protéz aby se zabránilo krvácení. Fibrin současně vylepšuje adhezi a růst EC na cévních protézách¹.

V naší studii jsme kultivovali cévní endoteliální buňky na upraveném polystyrénovém povrchu dvourozměrnými fibrinovými strukturami (2DFb) a trojrozměrnými fibrinovými sítěmi (3DFb). 2DFb struktury byly připraveny opakovaným měněním roztoků fibrinogenu, trombinu a inhibitorů trombinu D-phenylalaninyl-L-prolyl-L-argininyl chloromethylketonu (PPACK) a hirudin. Různé typy fibrinových struktur jsme získali použitím různých koncentrací fibrinogenu v roztoku. 3DFb sítě na povrchu jsme připravili po adsorpci fibrinogenu, následně aktivaci trombinem a přidáním roztoku fibrinogenu s antithrombinem III a heparinem. 3DFb sítě v objemu jsme připravili nárůstem fibrinové sítě od povrchu bez použití inhibitorů trombinu. Morfologii fibrinových struktur a sítí jsme pozorovali transmisním elektronovým mikroskopem.

Kultivační médium bylo obohaceno aprotininem, inhibitorem fibrinolýzy. Čistý polystyrénový povrch bez předchozí úpravy byl použit jako kontrolní vzorek. V porovnání s tímto vzorkem bylo množství endoteliálních buněk 1 den po nasazení u všech vzorků vyšší. Nejsignifikantnější rozdíly v počtu buněk byly u objemových 3DFb vzorků, nicméně buňky na 2DFb lépe proliferovaly a po 7 dnech kultivace byl jejich počet stejný nebo u některých vzorků dokonce vyšší než u prostorových sítí. Imunocytochemické barvení alfa-v integrinu, který zprostředkovává interakci EC s fibrinogenem², a vinkulinu ukázalo dobře vyvinuté fokální adhezní plaky na EC rostoucích na všech fibrinových vrstvách. Většina EC byla pozitivně značena na přítomnost von Willebrandova faktoru,

důležitého markeru diferenciacie EC. Z těchto výsledků lze usuzovat, že chování buněk lze regulovat různou strukturou fibrinových sítí připevněných k povrchu.

Modifikace umělých cévních protéz těmito fibrinovými strukturami s případnou pre-kultivací EC na povrchu, by mohla být aplikována na cévních protézách před jejich zavedením do pacientova organismu.

LITERATURA

1. Cardon A., Chakfe N., Thaveau F., Gagnon E., Hartung O., Aillet S., Kerdiles Y., Dion Y.M., Kretz J.G., Doillon C.J.: *Ann. Vasc. Surg.* 14, 543 (2000).
2. Chen Yi-Ping, O'Toole T.E., Leong L., Liu B.Q., Diazgonzales F., Ginsberg M.H.: *Blood.* 86, 2606 (1995).

NIKOTIN ZMÍRNÍ DEGENERACI NEURONŮ HIPPOCAMPU VYVOLANOU PODÁNÍM KAINÁTU

V. RILJAK

Fyziologický ústav 1. LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha 2

Aplikace kainátu, analogu glutamátu, je celosvětově užívaný experimentální model lidské temporální epilepsie. Na experimentálních modelech řady jiných chorob (Parkinsonova choroba apod.) bylo prokázáno, že nikotin má nebo by mohl mít protektivní a léčebný potenciál. Tato látka je v posledních letech intenzivně studována, neboť její použití při terapii zmíněných chorob se zdá velmi slibné.

Cílem této práce bylo objasnit, zda centrální nervový systém (především hippocampus), projeví mírnější degenerativní změny v případě, že bude zvířatům před podáním kainátu aplikován nikotin.

Experiment byl prováděn na laboratorních potkanech kmene Wistar, stáří 35 dní. První skupině byl podán nikotin (Sigma) i.p. v dávce 1mg/kg. Druhé skupině byl podán kainát (Sigma) 10mg/kg. Třetí skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg a následně jim byl po 30 minutách podán kainát 10mg/kg (konvulsivní dávka). Čtvrté skupině byl podán fyziologický roztok v objemech odpovídajících látkám účinným. Dva dny po aplikaci byla zvířata transkardiálně perfundována neutrálním paraformaldehydem, jejich mozky obarveny jednak kombinací barvení Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.) a Hoechst (Sigma-Aldrich) (vyhodnocení rozsahu neurodegenerace) a jednak byly barveny na NADPH-diaforázu (NADPH-d), ke kvantifikaci nitrergního systému CNS.

Hippocampus zvířat, jimž byl před aplikací kainátu podán nikotin, vykazoval výrazně mírnější degenerativní změny, než hippocampus zvířat, kterým byl podán pouze kainát. Méně postiženy byly především oblasti CA1 a CA3 hippocampu. Kvantifikace NADPH-d pozitivních buněk ukázala signifikantní nárůst jejich denzity po aplikaci nikotinu a jejich výrazný úbytek po aplikaci kainátu. U skupiny, které byly podány obě látky došlo k signifikantnímu nárůstu denzity NADPH-d pozitivních buněk v CA1 oblasti hippocampu.

Zjištěný úbytek denzity NADPH-d pozitivních buněk u zvířat, kterým byl podán pouze kainát, je zřejmě způsoben excitotoxickými vlastnostmi kainátu, které mohou vyvolat zánik nervových buněk. Vzestup denzity NADPH-d pozitivních buněk u skupiny, které byl podán pouze nikotin, je možno vysvětlit změnou genové exprese nitric oxid syntázy a následným vzestupem rezistence CNS k další noxe (v našem případě kainátu). NADPH-d pozitivní buňky byly v řadě studií popsány jako relativně rezistentnější ve srovnání s populacemi jinými.

A NOVEL SELF-PROCESSING MODULE DERIVED FROM THE FRPC PROTEIN OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* FOR A SINGLE-STEP PURIFICATION OF FREE RECOMBINANT PROTEINS

LENKA SADÍLKOVÁ, RADIM OSIČKA, KATEŘINA PROCHÁZKOVÁ, IRENA LINHARTOVÁ, and PETER ŠEBO

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4

Purification of recombinant proteins to homogeneity is often a challenging process and typically requires several chromatographic steps that must be individually optimized for each protein of interest. To overcome this difficulty, a system that enables purification of free recombinant proteins in a single affinity chromatographic step has been developed. The system is based on a 250 amino acid residues long self-processing module of the FrpC protein of *Neisseria meningitidis* that is genetically fused at its C-terminus to an affinity tag enabling simple one-step purification and at its N-terminus to a protein of interest. Upon binding of the fusion protein to an affinity matrix and washing out of contaminating proteins, specific cleavage between amino acid residues Asp and Pro of the self-processing module is induced by calcium ions. This results in release of the free protein of interest, having only one extra amino acid residue (Asp) at its C-terminus. The self-processing module - affinity tag fusion partner remains trapped on the affinity matrix. This system has been successfully tested with several proteins of interest (adenylate cyclase, chloramphenicol acetyltransferase, β -galactosidase, maltose-binding protein, or glutathione-S-transferase) and two different affinity tags (chitin-binding domain, or poly-His).

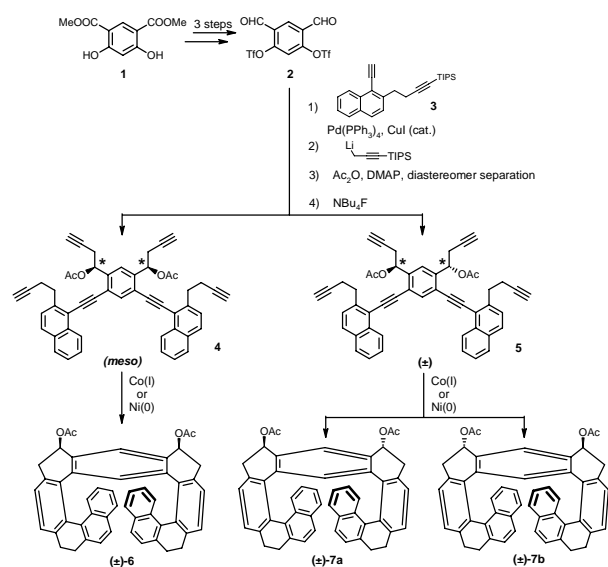
MODULAR SYNTHESIS OF FUNCTIONALISED [11]HELICENE-LIKE MOLECULES

PETR SEHNAL, IVO STARÝ*, IRENA G. STARÁ, ZUZANA ALEXANDROVÁ, and DAVID ŠAMAN

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6; sehnal@uochb.cas.cz

We have developed a novel approach to higher functionalised helical scaffolds¹ utilizing double [2+2+2] cycloisomerization^{2,3} of aromatic molecules containing six acetylene units mediated by Co(I) and Ni(0) complexes.

The synthesis utilises building block **2** readily available from the known diester **1**. Further 3 synthetic steps provide a 1:1 mixture of diastereoisomeric diacetates easily separable by column chromatography. Desilylation gives the key hexaynes **4** and **5**, respectively. Achiral hexayne **4** cyclises to a racemate of helical compound **6**. Hexayne **5** is itself a *d,l*-pair and its cyclisation leads to a preferential formation of one of the two possible diastereoisomeric helical compounds **7a** or **7b** with up to 85:15 selectivity. Further synthetic modifications of the helical diacetates are in progress.



Supported by the Grant Agency of CR (No. 203/06/1792), Ministry of Industry and Trade/Zentiva (No. FI-IM/073), and Ministry of Education, Youth and Sports (Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems, No. LC05A57).

LITERATURA

1. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšínský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 13, 2547 (2005).
2. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* 68, 5193 (2003).
3. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9175 (2002).

FUNKČNÍ ANALÝZA MUTACÍ V GENU BRCA1: HIT & FIX METODA

EVA SCHOLZOVÁ a ZDENĚK KLEIBL

Ústav Biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK,
U Nemocnice 5, 128 53 Praha 2

Mutace v genu BRCA1 (Breast Cancer 1; OMIM 113705) jsou zodpovědný za více jak 90 % dědičných karcinomů prsu a/nebo ovária. Funkční charakteristika mutací odhalených během screeningu ohrožené populace žen¹ je nutná k přesnému posouzení rizika vzniku nádoru. Metody funkční analýzy mutovaného genu zvýšením jeho exprese za použití konvenčních plazmidů neumožňují rekapitulaci fyziologických regulací *in vivo* a ve svém důsledku mohou vést k zavádějícím výsledkům.

Konstrukce mutací v systému BAC (Bacterial Artificial Chromosome) zaručuje expresi zvoleného genu ve fyziologických hladinách a se zachováním *in vivo* regulací. Společně s metodou RNA interference tvoří versatilní systém umožňující funkční analýzu mutací v genu BRCA1.

Na základě výsledků mutační analýzy populace žen ohrožených dědičným karcinomem prsu/ovária¹ jsme vybrali mutace v genu BRCA1 (c.181T>G, c.1747A>T, c.3700_3704del5, c.5266dupC) pro funkční analýzu. Konstrukce mutací v BAC byla zprostředkována rekombinačním systémem bakteriofága λ. Pomocí tzv. „hit & fix“ metody² bylo možné efektivně získat i BAC s tak jemnými mutacemi v genu BRCA1, které jsme pro funkční analýzu vybrali.

V prvním kroku se zamění v BAC cca 20 nukleotidů wild-type (wt) BRCA1 sekvence v okolí baze, kde se nachází daná mutace. K tomuto účelu se do bakterií vpraví denaturovaná lineární DNA, která je na obou koncích homologní k wt BRCA1 sekvenci alespoň v délce 80 nukleotidů a aktivuje se rekombinací. Po selekci pozitivních klonů jsou v druhém kroku tyto nukleotidy stejným postupem přeměněny zpět na originální sekvenci a současně je vpravena žádaná mutace. Jelikož je v každém kroku metody změněno více nukleotidů (cca 20), screening pomocí specifické PCR nebo hybridizace je velmi efektivní.

Otestovali jsme několik shRNA specifických proti genu BRCA1 a vytvořili klony buněčných linií karcinomem prsu exprimující tyto shRNA a snižující selektivně expresi wt BRCA1 mRNA. Klony s odstupňovanou expresí wt BRCA1 budou použity pro transfekci BAC nesoucího vybranou mutaci v BRCA1 genu a následnou funkční analýzu závislosti exprese mutované a wt BRCA1 formy *in vitro* v buněčných liniích karcinomu prsu.

Zavedení a optimalizace BAC/RNAi systému pro studium funkčních vlastností mutací v genu BRCA1 bude nadále využíváno pro funkční analýzu mutací v BRCA1 genu a odhad rizika vzniku karcinomu prsu/ovária u nosiček těchto mutací.

Projekt výzkumu byl podporován grantem IGA č. NR/8345-4.

LITERATURA

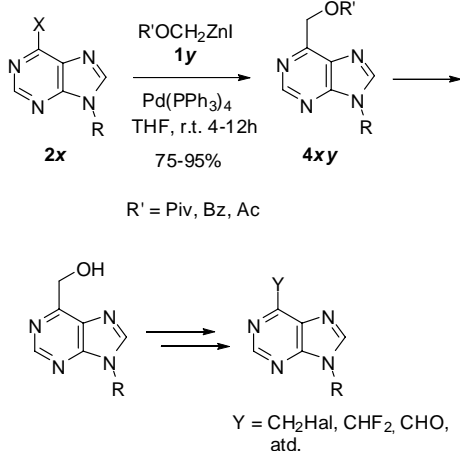
1. Pohlreich P., Zikan M., Stribrna J., Kleibl Z., Janatova M., Kotlas J., Zidovska J., Novotny J., Petruzcelka L., Szabo C., Matous B.: *Breast Cancer Res.* 7, R728 (2005).
2. Yang Y., Sharan S.K.: *Nucleic Acids Res.* 31, e80 (2003).

SYNTÉZA A TRANSFORMÁCIE (HYDROXYMETYL)PURÍNŮV

PETER ŠILHÁR a **MICHAL HOCEK**

Ústav organickej chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo
nám. 2, 166 10 Praha 6
silhar@uochb.cas.cz

6-Hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranozyl)purín, izolovaný z peniazovky škvrnitej (*Collybia maculata*), sa vyznačuje antifungálnymi, cytotoxickými a antivirálnymi (vesicular stomatitis virus) vlastnosťami. Hydroxymetylová skupina je navyše výhodná na ďalšie funkčné transformácie, čím sa otvára cesta k novým modifikovaným purínom nesúcim funkcionalizované substituenty.



Na základe týchto skutočností sme sa snažili vyvinúť novú, lepšiu metodiku na prípravu (hydroxymetyl)purínov. Uspeli sme použitím acyloxymetylzink iodidov **1y** v Negishiho Pd-katalyzovaných cross-coupling reakciách s príslušnými 6-halogenpurínmi **2x**. Spomenuté reakcie prebiehali hladko pri laboratórnej teplote za vzniku 6-(acyloxymetyl)purínov **4xy** vo veľmi dobrých výťažkoch. Pripravený 6-(hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranozyl)purín vykazuje vysokú cytostatickú aktivitu (IC₅₀=10 nM) a značný inhibičný efekt voči adenosín deamináze. Touto novou metódou je možné pripraviť 6-(hydroxymetyl), resp. 2-amino-6-(hydroxymetyl)purínové bázy a nukleozidy v dvoch až troch krokoch s dobrým celkovým výťažkom.

Z doterajšieho výskumu regioselektivity týchto reakcií s 2,6-dihalogenpurínmi je zrejme, že 6-(acyloxymetyl)-2-chloropuríny, resp. 2-(acyloxymetyl)-6-chloropuríny je možné pripraviť s vysokou regioselektivitou vo veľmi dobrom výťažku, čím sa otvára cesta prípravy 2,6-disubstituovaných purínov s rozdielnymi substituentami.

Ďalšie funkčné transformácie hydroxylovej skupiny, ako napríklad halogenácie, oxidácie a na ne nadväzujúce reakcie boli a sú predmetom nášho výskumu, ktorého výsledky budú tiež prezentované.

Táto práca je časťou výskumného projektu Z4 055 0506, ktorý bol podporovaný MŠMT "Centrum Nová antivirotika

a antineoplastika" IM0508 a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autori ďakujú Dr. Votrubovi za testovanie pripravených zlúčenín na cytostatickú aktivitu a inhibíciu adenosín deaminázy a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

CHARAKTERIZACE NOVÉ BUNĚČNÉ LINIE EM-G3 Z KARCINOMU PRSU POMOCÍ DVOJROZMĚRNÉ ELEKTROFORÉZY A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

KATEŘINA SMUTNÁ^{a,b}, **IRENA SELICHAROVÁ^a**, **KAREL UBIK^a**, **EVA MATOUŠKOVÁ^c**, **MARKÉTA BROŽOVÁ^c** a **JIŘÍ JIRÁČEK^a**

^aÚstav organickej chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra biochemie PřF UK, Hlavova 8, 128 40 Praha 2; ^cÚstav molekulární genetiky AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
smutna@uochb.cas.cz

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen. Ani přes neustálý rozvoj léčebných metod však nedošlo prozatím k zásadnímu zlomu v léčebných výsledcích. Ke studiu nádorů jsou v současné době využívány klasické proteomické postupy. Cílem proteomických analýz je často nalezení specifických proteinových markerů, které by mohly pomoci stanovit včasnou diagnózu a určit individuální léčbu pro pacientky s karcinomem prsu.

Proteomické studie karcinomů za pomoci dvojrozměrné elektroforézy mohou být prováděny buď přímo z nádorových biopsií, anebo srovnáváním buněčných kultur vypěstovaných z nádorových buněk. Model buněčných kultur je považován za výhodnější, protože současnými metodami nelze zcela věrohodně analyzovat tak komplexní materiál, jakým jsou biopsie.

V našem případě se podařilo získat zcela novou buněčnou linii EM-G3, izolovanou z primárního ductálního karcinomu prsu. Cílem této studie bylo porovnat proteinové složení této nové linie s proteiny z buněčné kultury vypěstované ze zdravé prsní tkáně (NME - normal mammary epithelia).

Proteiny extrahované z buněk byly analyzovány pomocí dvojrozměrné SDS-PAG elektroforézy. Následovala identifikace proteinových štěpů metodami MALDI-MS nebo ESI-MS/MS a porovnání takto získaných spekter s údaji v databázích. Tímto postupem byly identifikovány proteiny, které se vyskytují buď pouze v buněčné linii EM-G3 či pouze v NME buňkách a které by mohly být potenciálními nádorovými markery. Dále se nám podařilo prokázat, že nová buněčná linie EM-G3 je linií s progenitorovým charakterem, což znamená, že reprezentuje rannou fázi vývoje tumoru.

Tato práce byla podporována interním grantem MZd NR-8323-3 Prognostické faktory karcinomu prsu a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

VZNIK REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A DUSÍKU PŘI AKTIVACI KREVŇNÍCH DESTIČEK

**A. SOBOTKOVÁ^a, J. SUTTNAR^a, K. KNEŘOVÁ^b
a J. E. DYR^a**

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,
128 20 Praha 2; ^bVysoká škola chemicko-technologická,
Technická 5, 166 28 Praha 6

Krevní destičky se účastní celé řady procesů, které zahrnují interakci destiček s receptory endotelu, „rolování“ destiček po povrchu endotelu, adhezi, agregaci a finální tvorbu trombu. Vzhledem ke složitosti uvedených pochodů je zřejmé, že aktivační kaskáda destiček je velmi jemně regulována. V mnoha studiích se ukazuje, že jedním z regulátorů aktivace destiček mohou být reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Tyto látky jsou endogenního nebo exogenního původu¹.

Jedním z možných mechanismů ovlivnění aktivace destiček je působení reaktivních forem v systému fosfatasa/kinasa ve prospěch kinasové aktivity². Dále je možná přímá modifikace bílkovin účinkem ROS vedoucí k pozměnění jejich struktury a následně i jejich vlastností. Příkladem tohoto faktu je již popsána nitrace VASPU (vasodilator-sensitive phosphoprotein)³. Cílem této práce bylo izolovat, pokud možno identifikovat oxidačně modifikované bílkoviny, které vznikají při aktivaci krevních destiček různými agonisty.

Z krve zdravých dárců byly izolovány krevní destičky, které jsme v přítomnosti fibrinogenu aktivovali čtyřmi různými agonisty agregace (kolagen, trombin, TRAP, ADP). Sediment aktivovaných i neaktivovaných destiček byl lyzován roztokem dodecylsírany sodného (SDS), karbonyly vzniklé během aktivace byly označeny dinitrofenylhydrazinem. Dinitrofenylhydrazinové produkty karbonylovaných bílkovin i nitrované bílkoviny byly detegovány imunochemicky po jednorozměrné SDS-PAGE.

Pro lepší rozdělení bílkovin jsme dále použili metodu dvojrozměrné elektroforézy (1. směr izoelektrická fokuzace na immobilinových gelech, 2. směr SDS-PAGE) s následnou derivatizací na PVDF membráně. Některé zóny modifikovaných bílkovin byly podrobeny identifikaci hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF.

Pomocí imunochemické detekce proti DNP skupinám bylo v sedimentu destiček aktivovaných kolagenem nalezeno několik významných zón redukovaných i neredukovaných bílkovin obsahujících karbonyly.

Jednu z významných zón oxidačně modifikovaných bílkovin jsme identifikovali pomocí databáze Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot/). S 95 % pravděpodobností se jedná o cytoskeletární bílkovinu vinkulín. Tato bílkovina spolu s dalšími strukturálními látkami spolupracuje na reorganizaci cytoskeletonu během aktivace krevních destiček. Otázkou je, zda modifikace této bílkoviny při aktivaci kolagenem má fyziologický význam.

Tato práce vznikla díky podpoře grantů IGA NA/7616-3, VZ ÚHKT MZ02373601 a GAČR 303/03/0249.

LITERATURA

1. Krotz F., Sohn Y., Pohl U.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1988 (2004).
2. Finkel T.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248 (1998).
3. Sabetkar M., Low S. Y., Naseem K. M., Bruckdorfer K. R.: *Free Radic. Biol. Med.* 33, 728 (2002).

TUBULIN TYROSINE LIGASE EXPRESSION CORRESPONDS TO CHANGES IN THE TYROSINATION/DETYROSINATION STATUS OF α TUBULIN IN PROSTATE CANCER CELLS

**KAREL SOUČEK^{a,b}, ANH D. PHUNG^b, J. CHLOE
BULINSKI^c, RICHARD W. HARPER^b, MICHAEL
MCMANUS^f, and JASON P. EISERICH^{b,c,d}**

^aLab. Cytokinetics, Inst. Biophys., 612 65 Brno, CR. ^bDept Int. Med., ^cDept Physiol. Membr. Biol., and ^dCancer Ctr, School Med., U of California, Davis, CA 95616 USA. ^eDept Biol. Sci. Pathol. & Cell Biol., Columbia U, New York, NY 10027 USA. ^fDiabetes Ctr, U of California, San Francisco USA

Prostate cancer is the second cause of cancer death among men in the Western world. Defining the biomolecular changes associated with prostate cancer is an important endeavor, and potentially will lead to novel strategies for early diagnosis and treatment of prostate cancer. Microtubules play important roles in many aspects of cell function, and are targets for therapy in most forms of cancer, including prostate cancer.

Detyrosination/tyrosination of the C-terminus of α -tubulin is a unique posttranslational modification where the C-terminal tyrosine is cyclically removed by a carboxypeptidase and readded by a tubulin tyrosine ligase (TTL).

It has been shown that detyrosination/tyrosination cycle of α -tubulin is associated with progression through the cell cycle and is involved in cellular differentiation, the precise role of this posttranslational modification in cancer is not known.

Molecular profiling of multiple α -tubulin posttranslational modifications revealed several prostate cancer cell lines displaying decreased expression of tubulin tyrosine ligase protein that was associated with markedly increased elaboration of detyrosinated α -tubulin. Using lentiviral-mediated transfection of a vector expressing TTL siRNA we were able to stably suppress TTL protein expression and induce higher levels of detyrosinated α -tubulin in non-cancerous prostate epithelial cells. These results suggest that the dysregulated tubulin detyrosination/tyrosination cycle is caused by decreased expression of TTL. Our results demonstrate a useful tool for the study of function of this specific posttranslational modification of α -tubulin (detyrosination) that will aid in the elucidation of its role in cancer.

SYNTÉZA A CYTOTOXICKÉ ÚČINKY NĚKTERÝCH DERIVÁTŮ 3-HYDROXY-4(1H)-CHINOLONU

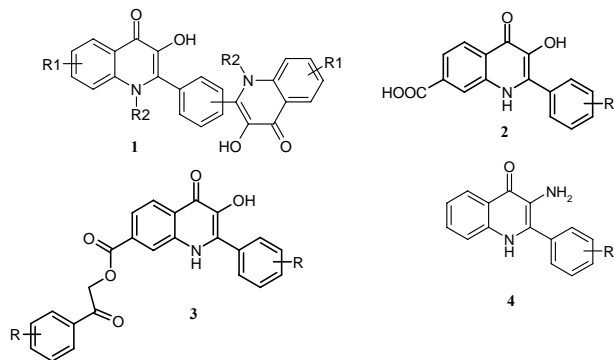
MIROSLAV SOURAL^a, JAN HLAVÁČ^a, PAVEL HRADIL^a a MARIÁN HAJDÚCH^b

^aKatedra organické chemie PřF Univerzity Palackého, Tř. Svobody 8, 77200 Olomouc; ^bLab. experimentální medicíny FN, Oddělení pediatrie a onkologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Puškinova 6, 775 20 Olomouc
souralm@seznam.cz

V posledních letech se naše pracoviště mimo jiné intenzivně věnuje syntéze a studiu biologické aktivity derivátů 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolonu. Tyto sloučeniny nebyly v minulosti blíže studovány, neboť existovaly pouze ojedinělé metody jejich přípravy. V polovině devadesátých let však byla objevena syntetická cesta vycházející z fenacylsterů anthranilových kyselin¹, která umožňuje přípravu celé řady těchto derivátů.

Sledované deriváty 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolonu jsou aza-analoga flavonolů – rozsáhlé skupiny přírodních látek s širokým spektrem biologických, mimo jiné i protinádorových účinků. Dosud jediná publikovaná práce zabývající se kancerostatickou aktivitou 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů prokázala účinnost chlorovaných derivátů na některých nádorových buněčných liniích².

V současné době je naše pozornost zaměřena mimo jiné na deriváty typu 1 obsahující dva 3-hydroxy-4(1H)-chinolonové skelety v jedné molekule a deriváty typu 2 a 3 substituované karboxylovou skupinou³. V rámci studia analogů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu byla rovněž vypracována syntetická cesta vedoucí k derivátům 3-amino-2-fenyl-4(1H)-chinolonu⁴.



Cytotoxicita připravených derivátů byla testována *in vitro* na pěti nádorových buněčných liniích (A549, K562, K562-Tax, CEM, CEM-DNRB), sledovány byly vztahy mezi strukturou a účinností.

Projekt je podporován grantem MSM6198959216 Ministerstva školství, mládeže a sportu České republiky.

LITERATURA

- Hradil P., Jirman J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 1357 (1995).

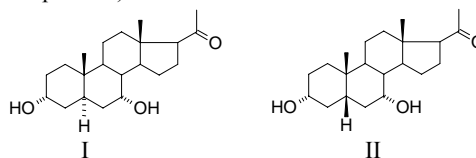
- Hradil P., Krejčí P., Hlaváč J., Wiedermannová I., Lyčka A., Bertolasi V.: J. Heterocyclic Chem. 41, 375 (2004).
- Soural M., Hlaváč J., Hradil P., Fryšová I., Hajdúch M., Bertolasi V., Maloň M.: Eur. J. Med. Chem. – v tisku
- Hradil P., Grepl M., Hlaváč J., Soural M., Maloň M., Bertolasi V.: J. Org. Chem. – v tisku

3 α ,7 α -DIHYDROXY-5 α -PREGNAN-20-ON A 3 α ,7 α -DIHYDROXY-5 β -PREGNAN-20-ON: SYNTÉZA A HYDROFILNÍ DERIVATIZACE

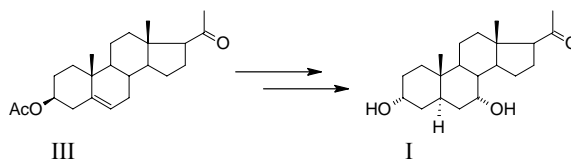
EVA ŠTASTNÁ^{a,b} a HANA CHODOUNSKÁ^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra organické a jaderné chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
stastna@uochb.cas.cz hchod@uochb.cas.cz

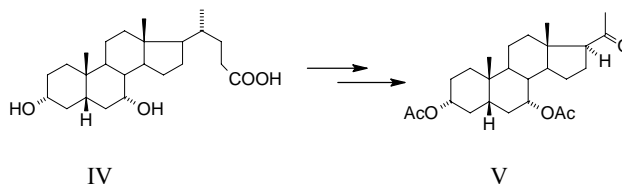
V rámci projektu, který se zabývá aktivitou NMDA receptoru, byly připraveny nové deriváty 3 α ,7 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-onu I a 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-onu II s předpokládanou biologickou aktivitou. Tato účinnost je podmíněna polární substituací v poloze C3 (např. sulfátovou skupinou^{1,2}).



3 α ,7 α -Dihydroxy-5 α -pregnan-20-on I byl získán vícestupňovou syntézou dle literatury³ z komerčně dostupného pregnenolonu acetátu (III).



Kyselina chenodeoxycholová IV byla transformována postupem uvedeným v literatuře⁴ na 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-on diacetát (V), který byl hydrolyzován na derivát II.



Deriváty I a II byly následně substituovány hydrofilními skupinami (např. sulfátovou, hemisukcinátovou a nikotinoylátovou) v poloze 3 a 7.

Práce byla provedena v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506, za podpory grantu GA AV IAA405305.

LITERATURA

1. Irwin R.P., Lin S., Rogawski M.A., Purdy R.H., Paul S.M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 677 (1994).
2. Horák M., Vlček K., Petrovič M., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: *J. Neurosci.* 24, 10318 (2004).
3. Chodounská H., Kasal A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 1543 (1998).
4. Dias J.R., Nassim B.: *Steroids* 35, 405 (1980).

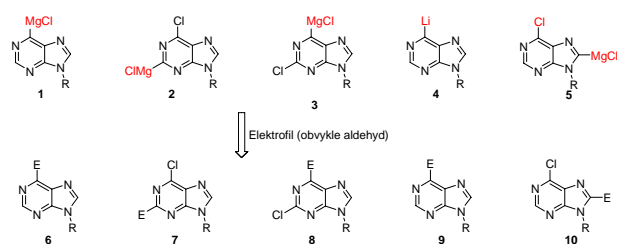
STECHEMETRICKÉ METALOVANÉ PURINY A JEJICH VYUŽITÍ V SYNTÉZE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

TOMÁŠ TOBRMAN a DALIMIL DVOŘÁK

Ústav organické chemie VŠCHT, Technická 5, Praha 6
tobrmant@vscht.cz

Purinové deriváty substituované v polohách 6 a 2 vykazují široké spektrum biologických aktivit. Například 6-aryl a 6-alkynylpuriny jsou známy jako cytostaticky aktivní látky¹, u 6-methylpurinu byla pozorována silná cytotoxicita². Roscovitin a další 2,6,9-trisubstituované puriny jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas³. Tyto vlastnosti vedou k syntéze nových derivátů purinu, které obsahují v poloze 2 a/nebo 6 různé funkční skupiny. V současné době jsou k tomuto účelu s výhodou používány postupy založené na stechiometrických nebo katalytických reakcích metalovaných purinů⁴.

Cílem naší práce je příprava a studium stechiometrických reakcí purinů metalovaných v poloze 2, 6 nebo 8 s různými elektrofilmi. Příprava metalovaných purinů¹⁻⁵ je založena na výměně halogen/kov reakcí odpovídajících jodpurinů s isopropylmagnesium chloridem nebo butyllithiem za různých podmínek. V závislosti na použitém činidle a reakčních podmínkách lze izolovat různé produkty. V případě purin-6-ylmagnesium chloridu **1** získáme reakcí s aldehydy sekundární alkoholy **6**, tedy látky které mohou působit jako inhibitory adenosin deaminázy. Magnesiané puriny **2** a **3** lze modifikovat v poloze 6 nebo 2 reakcí s elektrofilmi za vzniku 2,6-disubstituovaných derivátů **7** a **8**. Přítomnost atomu chloru u takto vzniklých produktech lze využít k další derivatizaci. Přitom vznikají 2,6,9-trisubstituované puriny strukturně podobné Olomoucínu a Roscovitinu.



Zajímavých výsledků bylo dosaženo při pokusu o stabilizaci lithia v poloze 6 purinového jádra. Podařilo se nám připravit purin-6-ylithium **4** (R = Li), které je termicky stabilnější než 6-lithiované 9-alkylpuriny **4** (R = alkyl), u kterých byla popsána migrace lithia do polohy 8 (cit.⁵). Reaktivita takto připraveného purinylithia **4** a dalších metalovaných purinů (např. **5**) bude rovněž diskutována.

Práce byly financovány Grantovou agenturou České republiky (Grant 4islo: 203/03/0035)

LITERATURA

1. Hocek M., Votruba I., Dvořáková H.: *Tetrahedron* 59, 607 (2003) a reference tam uvedené.
2. Montgomery J. A., Hewson K. J.: *J. Med. Chem.* 11, 48 (1968).
3. Meijer L., Raymond E.: *Acc. Chem. Res.* 36, 417 (2003).
4. Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 245.
5. Leonard N. J., Bryant J. D.: *J. Org. Chem.* 44, 4612 (1979).

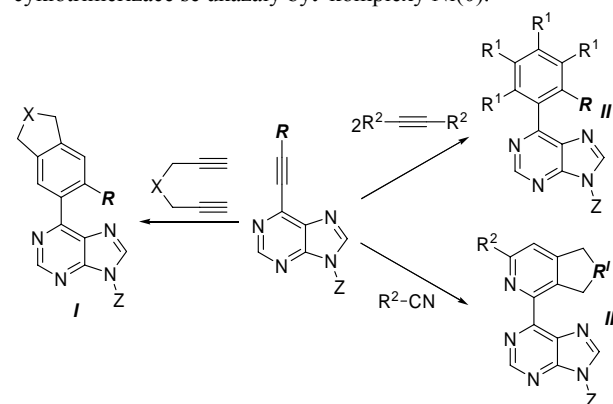
PŘÍPRAVA 6-ARYL- A 6-HETEROARYLPURINŮ [2+2+2]-CYKLOTRIMERIZACEMI

PAVEL TUREK^{a,b}, MARTIN KOTORA^{a,b} a MICHAL HOCEK^b

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
turpav@uochb.cas.cz; kotora@natur.cuni.cz

6-Arylpurinové báze a nukleosidy vykazují zajímavé biologické vlastnosti (cytostatická, antibakteriální a anti-myko-bakteriální aktivita).

Jedna z možných metod výstavby benzenového kruhu na purinech spočívá ve využití [2+2+2]-cyklotrimerizačních reakcí alkylnylpurinů s alkyny či diiny zprostředkovaných sloučeninami přechodných kovů. V první fázi jsme se zaměřili na přípravu 6-arylpurinů **I** kocyklotrimerizací 6-alkynylpurinů s α,ω -diiny. Jako nejaktivnější katalyzátory cyklotrimerizace se ukázaly být¹ komplexy Ni(0).



Pro přípravu 6-pentasubstituovaných arylpurinů **II** byla použita metoda založená na reakci zirkonacyklopentadienů s 6-alkynylpuriny² v přítomnosti stechiometrického množství komplexu $\text{NiBr}_2(\text{PPh}_3)_2$. Dalším cílem bylo vypracovat metodu pro přípravu 6-heteroaryluridů **III**. V tomto ohledu byl studován přístup založený na kocyklotrimerizaci 6-dinylpurinů s různými alkyl-, aryl- a heteroarylnitridy za katalýzy $\text{CpCo}(\text{CO})_2$. Tato reakce byla studována za různých reakčních podmínek (způsob iniciace katalyzátoru, teplota, vliv rozpouštědla). Vybrané připravené 6-aryl- a 6-heteroaryluridy byly testovány na cytostatickou aktivitu.

Tento projekt byl proveden za podpory grantu GA ČR (203/03/0035) a Centra pro nová antivirostatika a antineoplastika MŠMT (1M6138896301).

LITERATURA

1. Turek P., Kotora M., Hocek M., Císařová I.: *Tetrahedron Lett.* **44**, 785 (2003). Turek P., Kotora M., Tišlerová I., Hocek M., Votruba, I., Císařová I.: *J. Org. Chem.* **69**, 9224 (2004).
2. Turek P., Kotora M., Hocek M., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **70**, 339 (2005).

STUDIUM BAKTERIÁLNÍCH SYMBIONTŮ PŘI BIODEGRADACI POLYVINYLALKOHOLU

T. VÁCLAVKOVÁ, A. VLČKOVÁ, J. RŮŽIČKA, M. KOUTNÝ a M. COUFALÍKOVÁ

*Ústav technologie životního prostředí a chemie, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín
vaclavkova@ft.utb.cz*

Polyvinylalkohol (PVA) patří mezi široce užívané syntetické polymery, který je za určitých okolností biodegradabilní. Jak ukázaly dřívější práce některých autorů, při biodegradaci polyvinylalkoholu se velmi často uplatňují bakteriální symbiotické vztahy, v nichž jedna kultura produkuje enzymy potřebné pro rozklad PVA a druhá poskytuje určité růstové faktory pro onu kulturu první¹.

V této práci byla studována degradace PVA kulturou OT3 v symbiotickém vztahu s *Rhodococcus erythropolis*. Směsná kultura obou bakterií byla schopná rozložit PVA ze vstupní koncentrace 500 mg/l během 42 dnů cca z 80 %. Některé výsledky ukázaly, že charakter jejich symbiotického vztahu je odlišný od jiných, již popsáných, a proto byla uspořádána série pokusů degradací PVA pro objasnění faktoru symbiosy těchto kultur. Koncentrace PVA v pokusech byla měřena spektrofotometricky použitím Finleyho metody, založené na barevné reakci PVA s jódem v přítomnosti kyseliny borité. Výsledky ukázaly, že kultura OT3 je schopna degradace i v přítomnosti mrtvé biomasy *Rhodococcus erythropolis* (78,1 % degradace), z čehož bylo možné usuzovat, že *R. erythropolis* jí nedodává enzym, ale určitý růstový faktor. Protože k obdobným výsledkům vedl i přidavek inaktivní katalasy ke kultuře OT3 (70 % degradace), bylo možné usoudit, že oním faktorem symbiosy je některá aminokyselina nebo hem.

LITERATURA

1. Chiellini E., Corti A., Salvatore D., Solaro R.: *Prog. Polym. Sci.* **28**, 963 (2003).

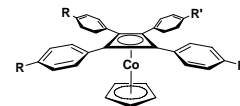
VYUŽITÍ KOBALTOVÝCH KOMPLEXŮ CYKLOBUTADIENU V MOLEKULOVÉ ELEKTRONICE

MICHAL VALÁŠEK^a a JOSEF MICHL^b

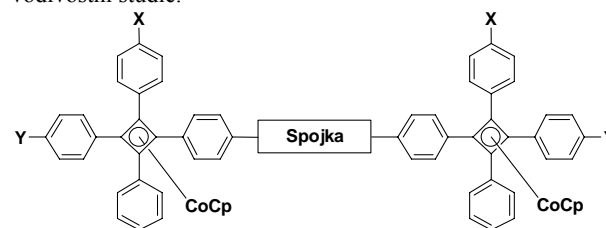
^a*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha*

^b*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.
michalvalasek@hotmail.com*

Dikarbonyl(η^5 -cyklopentadienyl)kobalt $[\text{CpCo}(\text{CO})_2]$ má velmi široké uplatnění v chemii organokovů v posledních 50-ti letech¹. Jednou z jeho reakcí je tvorba cyklobutadienových komplexů Rauschovou dimerizací tolanových derivátů². Tyto cyklobutadienové komplexy, díky své čtvercové symetrii, nacházejí široká uplatnění například v molekulové elektronice³ nebo materiálové chemii⁴.



Bude představena metoda ke konstrukci kobaltových komplexů substituovaných tetrafenylcyklobutadienů. Takto připravené sendvičové komplexy, mající vhodné funkční skupiny v *para* polohách na fenylu, byly navzájem propojeny pomocí Suzukiho kaplingu⁵. Propojení je buď přímé nebo přes "aktivní místa" (1,10-fenanthrolin, 2,2'-bipyridyl), čímž vznikají "molekulové izolátory" (bicyklo[1.1.1]pentany, 10-ti a 12-ti vrcholové *p*-karborany, bicyklo[2.2.2]oktan) pro vodivostní studie.



Y - H, SMe, S-*tert*-Bu, COOH, ...

X - TMS, I, ...

Spojka - Ph, bifenyl, "molekulové izolátory", 1,10-Fenanthrolin, ...

Také bude prezentována příprava samoskladného kobaltového komplexu zakončeného karboxylovými kyselinami, který má substituovaný cyklopentadienový kruh vykazující afinitu k povrchu rtuti. Dále bylo využito těchto elektrondonorních komplexů při konstrukci série „molekulových diod“.

Tento projekt byl financován z grantů GA UK 417/2004 a GA ČR 203/04/0921.

LITERATURA

1. Efraty. A.: Chem. Rev. 77, 691 (1977).
2. Rausch M. D., Genetti R. A.: J. Am. Chem. Soc. 89, 5502 (1967).
3. Zheng X., Mulcahy M. E., Horinek D., Galeotti F., Magnera T. F., Michl J.: J. Am. Chem. Soc. 126, 4540 (2004).
4. Bunz U. H. F.: Synlett 10, 1117 (1997).
5. Miyaura N., Suzuki A.: Chem. Rev. 95, 2457 (1995).

STRUCTURAL STUDIES OF LIGAND BINDING OF NATURAL KILLER CELL RECEPTOR, PROTEIN CD69

ONDREJ VANEK^a, PETR NOVAK^b, VLADIMIR KOPECKY^c, VLADIMIR KREN^b, JIRI BRYNDA^d a KAREL BEZOUSKA^{a,b}

^aDept Biochem., Fac. Sci., Charles Universit, Hlavova 8, 128 40 Prague 2; ^bInst. Microbiol., AS CR, Videnska 1083, 142 20 Prague 4; ^cInst. Phys., Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2; ^dInst. Mol. Genetics, AS CR, Flemingovo 2, 166 36 Prague 6

CD69 protein¹, an early activation antigen of human lymphocytes, is one of the most studied surface receptor molecules involved in tumour recognition by natural killer cells. Although there is certain knowledge about its function from immunological point of view, detailed structural description of target recognition by natural killer cells is missing, including identification of CD69 natural ligand. CD69 receptor belongs to a group of C-type lectin-like lymphocyte receptors and till now several types of possible ligands have been identified or proposed: calcium cation, various carbohydrate structures and even peptides. Crystal structures of carbohydrate recognition domain (CRD) of CD69 molecule have been already published^{2,3}, but crystallization conditions used does not favour ligand binding. In this work we present our structural approach to describe CD69 binding properties together with list of novel therapeutically interesting ligands identified by inhibition tests or equilibrium dialysis. After recombinant production and optimalization of in-vitro refolding of soluble CRD domain of CD69 protein, we analyzed its homogeneity by FT-ICR mass spectrometry and its secondary structure was determined by drop coating deposition Raman spectroscopy method⁴. Further, ligand binding was examined both by Raman spectroscopy and by protein crystallization. We tested several types of proposed CD69 ligands, from single monosaccharide ligand *N*-acetyl-D-glucosamine, to more complex structures, such as antenary oligosaccharides isolated from hen egg white protein ovomucoid, synthetic peptidomimetic ligands based on calixarene core, or heptapeptide ligand from mycobacterial heat shock protein hsp60, which all binds with high affinity to CRD domain of CD69 receptor. Although we found crystallization conditions at neutral pH necessary for ligand binding and we achieved high resolution crystal structures (the best at 1.8 Å), none of the ligand molecules were found in, except for calcium

cations, which were proven by anomalous scattering on synchrotron.

This work was supported by Ministry of Education of the Czech Republic No. MSM 0021620808, by Institutional Research Concept No. AVOZ 50200510, by Grant Agency of the Czech Republic No. 301/05/P567, and by Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic No. A5020403.

REFERENCES

1. Pavlicek J., Sopko B., Ettrich R., Kopecky V., Baumruk V., Man P., Havlicek V., Vrbacky M., Martinkova L., Kren V., Pospisil M., Bezouska K.: Biochemistry 42, 9295 (2003).
2. Natarajan K., Sawicki M. W., Margulies D. H., Mariuzza R. A.: Biochemistry 39, 14779 (2000).
3. Llera A. S., Viedma F., Sanchez-Madrid F., Tormo J.: J. Biol. Chem. 276, 7312 (2000).
4. Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson V. J., Ben-Amotz D.: Anal. Chem. 75, 5703 (2003).

ANTIMIKROBNÍ PROSTŘEDEK PRO OŠETŘOVÁNÍ OBUVI

PAVLÍNA VLTAVSKÁ, JAN RŮŽIČKA, RAHULA JANÍŠ a PETR HLAVÁČEK

Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Nám. T.G.M. 275, 762 72 Zlín
vltavska@ft.utb.cz

Vzhledem ke stále se zvyšujícímu procentu populace trpícímu mykotickými onemocněními je třeba vyvíjet a testovat nové protimikrobní látky. Mezinárodní statistiky uvádějí, že u každé třetí osoby se na nohou vyskytují mykomy¹ a je tedy nezbytné zaměřit se kromě léčby i na prevenci těchto stavů. Velkou roli může zejména u diabetiků sehrát nošení obuvi vybavené podšívkovými a stélkovými materiály s úpravami inhibujícími růst patogenních mikroorganismů (plísní, kvasinek i bakterií) a případně i omezujícími rozvoj saprofytických druhů.

V současné době chybí na našem trhu vhodné přípravky s žádoucími protimikrobními vlastnostmi a proto se náplní práce stalo ověření účinnosti přípravku na bázi monoacylglycerolu kyseliny kaprylové, u něhož již byla prokázána významná protimikrobní účinnost². Úprava podšívkových a stélkových materiálů uvedeným (navrženým) prostředkem byla testována agarovými testy, v nichž byla odolnost upravených vzorků sledována po jejich kontaminaci patogenní plísní *T. mentagrophytes*, patogenní kvasinkou *C. albicans*, saprofytickou plísní *A. niger* a bakteriemi *E. coli*, *K. pneumoniae* a *S. aureus*. Výsledky ukázaly, že úprava materiálů sice neinhibovala růst saprofytické plísně *A. niger*, avšak zcela zabránila rozvoji všech testovaných patogenních druhů mikroorganismů.

LITERATURA

1. Pierard G.: Dermatology 202, 220 (2001).

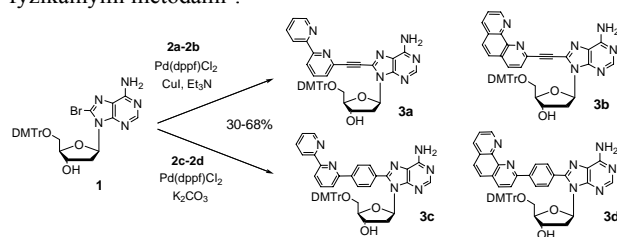
2. Motýl J.: *Testování antimykotických účinků monoacylglycerolů aplikovaných na podšívkové materiály*, Diplomová práce, FT UTB, Zlín, 2003.

SYNTEZA MODIFIKOVANÝCH NUKLEOZIDOV A OLIGONUKLEOTIDOV NESÚCÍCH BIPYRIDINOVÉ ALEBO FENANTROLINOVÉ LIGANDY

MILAN VRÁBEL a **MICHAL HOCEK**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
vrabel@uochb.cas.cz

Oligonukleotidy obsahujúce vo svojej štruktúre elektrochemický marker sú často používaným nástrojom v chemickej biológii alebo biofyzike (napr. pre štúdium: hybridizácie DNA, interakcií protein-nukleových kyselín, prenosu náboja)¹. Nukleobáza, značená elektrochemickým markerom, môže po zabudovaní do štruktúry DNA reflektovať elektrochemické zmeny detekovateľné fyzikálnymi metódami².



Vzhľadom na uvedené skutočnosti sme sa rozhodli pre syntézu modifikovaných nukleozidov nesúcich bipyridinové alebo fenantrolínové ligandy, ktoré môžu po komplexácii s prechodnými kovmi slúžiť ako elektrochemické markery.

Sonogashira cross-coupling reakciou etynylbipyridínu (**2a**) alebo etynylfenantrolínu (**2b**) s chráneným 8-bromodeoxyadenozínom (**1**) za katalýzy paládiom sme pripravili konjugáty (**3a**) a (**3b**) v dobrých výtázkoch. Suzuki cross-coupling reakcia pinakol esterov zodpovedajúcich boronových kyselín bipyridínu (**2c**) a fenantrolínu (**2d**) poskytla príslušné fenylénom premostené deriváty (**3c**) a (**3d**).

Etynylbipyridinový derivát (**3a**) bol po benzoylácii amino skupiny adenínu prevedený na *N,N*-diisopropylfosforamidát a následne zabudovaný pomocou štandardnej automatickej oligonukleotidovej syntézy do štruktúry oligonukleotidu vo výtážku 30 %.

Vzhľadom na uvedené výsledky sme sa v ďalšom kroku rozhodli pre prípravu modelových zlúčenín pre komplexačné reakcie s prechodnými kovmi. Výsledky tejto časti práce budú v prezentácii taktiež diskutované.

Táto práca je súčasťou EC Specific Targeted Research Project Control of Assembly and Charge Transport Dynamics of Immobilized DNA (CIDNA) a bola podporovaná Grantovou Agentúrou ČR (grant č. 203/03/0035). Autori ďakujú Dr. Pohlovi za meranie NMR spektier a Dr. Rosenbergovi za syntézu oligonukleotidu.

LITERATURA

- (a) Rist M., Amann N., Wagenknecht H. -A.: *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 2498. (b) Amann N., Pandurski E., Fiebig T., Wagenknecht H. -A.: *Chem. Eur. J.* 2002, 4877. (c) Graham D., Parkinson J. A., Brown T. : *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* 1998, 1131. (d) Catalanotti B., Galeone A., Mayol L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 2005. Reham A. I., Elkhair A., Netzel T.: *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* 2005, 85.
- Wagenknecht H. -A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 115, 2558; *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 2454.

TRANSFORMACE CHLORBENZOOVÝCH KYSELIN ROSTLINNÝMI TKÁŇOVÝMI KULTURAMI

BLANKA VRCHOTOVÁ^a, **M. MACKOVÁ^a**,
T. MACEK^b a **K. FRANČOVÁ^a**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
vrchotob@vscht.cz

V prírode se chlorbenzoové kyseliny mohou vyskytovat v důsledku použití herbicidů v zemědělství, jsou meziproduktem při výrobě některých barviv a léků a v neposlední řadě vznikají jako produkty horní bakteriální dráhy odbourávání polychlorovaných bifenylů. Jejich další osud a možnost odstranění z životního prostředí závisí na jejich koncentraci, struktuře a také na organismech vyskytujících se v daném ekosystému.

Bakteriální metabolismus chlorbenzoových kyselin je již poměrně dobře prostudován na rozdíl od rostlinného. Cílem mé práce je zjistit, zda jsou rostliny schopné transformovat chlorbenzoové kyseliny, určit produkty, které při tomto procesu vznikají a změřit toxicitu jednotlivých chlorbenzoových kyselin pro buňky vyšších rostlin.

Jako model byly vybrány rostlinné tkáňové kultury tří rostlinných druhů pěstované *in vitro*. Embryogenní morfoloicky diferencovaná kultura křenu selského (*Armoracia rusticana* K 54), kalusová kultura tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38) a diferencovaná kultura typu "hairy root" lilku černého (*Solanum nigrum* SNC 90), u kterých byla primárně prokázána schopnost degradace PCB.

Bylo prokázáno, že rostlinné buňky metabolizují chlorbenzoové kyseliny. Účinnost procesu je závislá podobně jako u mikroorganismů na množství a poloze chlorů v molekule chlorbenzoové kyseliny a použitém rostlinném druhu. Nejvyšší schopnost transformace (téměř 100 %) prokázaly buňky rostlinné tkáňové kultury lilku černého s 2-, 3-, 4-chlorbenzoovou kyselinou, 2,3-di-, 2,4-di-, 2,5-dichlorbenzoovou kyselinou a 2,3,5-trichlorbenzoovou kyselinou.

Analýza produktů transformace 2,4-dichlorobenzoové kyseliny buňkami kultury lilku černého prokázala vznik methylesteru 2,4-dichlorobenzoové kyseliny. Obdobně byl methylester nalezen i po transformaci 2,3-dichlorobenzoové kyseliny.

Měření toxicity jednotlivých chlorbenzoových kyselin na modelu diferencované kultury typu "hairy root" lilku černého prokázalo různou toxicitu pro buňky vyšších rostlin. Nejvyšší toxicita pro rostlinné buňky byla naměřena u chlorbenzoových kyselin s dvěma chlory a nejnižší s třemi chlory v molekule chlorbenzoové kyseliny.

Tato práce byla podporována granty GA ČR 203/06/0563 a MSM 6046137305

DIFFERENTIAL EFFECTS OF SELECTED NATURAL COMPOUNDS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY ON THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND NF- κ B IN HeLa CELLS

RADIM VRZAL and ZDENĚK DVOŘÁK

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

In this work we investigated the effects of natural compounds with anti-inflammatory activity (berberine, sanguinarine, chelerythrine and colchicine) on two important anti-inflammatory and pro-inflammatory players, i.e. glucocorticoid receptor (GR) and nuclear factor kappa B (NF- κ B), respectively¹.

Colchicine and berberine had no effect on the nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B and these compounds did not affect nuclear translocation of the GR as well. Colchicine caused rapid degradation of the GR protein. Sanguinarine and chelerythrine elicited the nuclear translocation of both p65 and GR. None of the tested compounds triggered GR and/or NF- κ B transcriptional activities, as monitored by reporter assays using HeLa cells transiently transfected with glucocorticoid response element (pGRE-LUC) and/or NF- κ B elements fused to luciferase gene (pNF- κ B-luc), respectively. The binding of 3H-labelled glucocorticoid to GR was significantly decreased by sanguinarine and chelerythrine.

In conclusion, structurally diverse natural antiflogistics displayed differential effects on GR and NF- κ B, the factors being often targets in the inflammatory combat.

This research was supported by grant MSM 6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by grant GACR 303/04/P074 from the Grant Agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Dvořák Z., Vrzal R., Maurel P., Ulrichová J.: Chem. Biol. Interact. 159, 117 (2006).

FUNCTION OF THE ANTI-APOPTOTIC Bcl-2 PROTEIN IS CHANGED BY POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION

EVA ZAHRADNÍČKOVÁ^a, JANA VAŇKOVÁ^b, VENDULA MACEČKOVÁ^a a JAN ŠMARDA^a

^aÚstav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bLaboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno
zahradka@sci.muni.cz

Linie monoblastů transformovaných onkogenem v-myb viru ptačí myeloblastózy (BM2) je vhodným modelem pro studium AML. V naší laboratoři ji využíváme pro analýzy molekulárních mechanismů proliferace, diferenciaci a apoptózy. Jedním z proteinů ovlivňujících průběh programované buněčné smrti je anti-apoptotický protein Bcl-2, který je v buňce lokalizován v membránách mitochondrií, ER nebo jádra. Předpokládá se, že jeho účinek je převážně důsledkem interakce s pro-apoptotickými proteiny, které jsou touto vazbou inaktivovány. Pro podrobnější studium funkce proteinu Bcl-2 jsme vytvořili derivát linie BM2 exprimující gen bcl-2. Neočekávaně jsme prokázali, že buňky BM2 se zvýšenou hladinou proteinu Bcl-2 (BM2Bcl2) vykazovaly již po 24 hodinách výrazně sníženou viabilitu, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jader a internukleozomové štěpení DNA. Westernovým přenosem jsme v buňkách BM2Bcl2 prokázali výskyt neobvyklých forem proteinu Bcl-2 o vyšší molekulové hmotnosti, jejichž přítomnost je zřejmě důsledkem posttranslačních modifikací. Výskyt těžších forem není specifický pouze pro linii BM2Bcl2, detekovali jsme je i ve fibroblastech QT6 a buňkách osteosarkomu Saos-2 po transfekci cDNA kódující Bcl-2. Fosfospecifickou protilátkou jsme prokázali, že se jedná o modifikaci fosforylací. Z imunoprecipitačních experimentů vyplývá, že hyperfosforylovaný protein Bcl-2 není schopen interakce se svými cílovými proteiny (např. Beclin-1) a proto zřejmě není schopen plnit svou anti-apoptotickou funkci.

Tato práce byla podporována granty 301/06/0036 Grantové agentury České republiky a MSM0021622415 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky.



SIGMA-ALDRICH

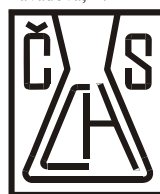


SIGMA-ALDRICH

SEZNAM AUTORŮ

Adam, Jan	373	Haškovec, Cedrik	398
Adam, Vojtěch	373, 384, 399, 400	Havel, Ladislav	399, 400
Alexandrová, Zuzana	403	Herrmann, Pavel	382
Altrock, Wilko D.	380	Hlavackova, Veronika	382
Ananchenko, Gennady A.	401	Hlaváč, Jan	407
Anzenbacher Jr., Pavel	401	Hlaváček, Petr	410
Arlt, Volker M.	378	Hocek, Michal	393, 405, 408, 411
Babčanová, Soňa	396	Hofmanová, Jiřina	383, 394
Bačáková, Lucie	402	Horák, Petr	377, 388
Baloun, Jiří	399	Horváth, Viktor	383, 394
Benková-Frimlová, Eva	389	Houska, Milan	374
Bezouska, Karel	410	Hovorka, Oldřich	392
Blahos, Jaroslav	382	Hradecký, Jan	384
Blašík, Ondřej	373	Hradil, Pavel	407
Bobek, Jan	399	Hrdina, Radim	384
Bohatá, Karolína	374	Hroudová, Miluše	385
Bóka, Károly	390	Hrstka, Roman	385
Brdička, R.	391	Hulová, Dagmar	381
Brožová, Markéta	405	Chaloupková, Radka	385
Bruchová, H.	391	Chlupáč, Jaroslav	402
Brychtová, Y.	374	Chodounská, Hana	388, 407
Brynda, Eduard	374, 402	Chumchalová, J.	374
Brynda, J.	394	Imberty, Anne	373
Brynda, Jiri	410	Imramovský, A.	386
Bryndová, J.	392	Jágr, Michal	387
Brzobohatý, Břetislav	389	Janiš, Rahula	410
Bukovská, Soňa	374	Jiráček, Jiří	376, 405
Bulinski, J. Chloe	406	Jiroš, Pavel	392
Burketová, Lenka	390	Jonáková, V.	376
Cankař, Petr	374	Jurček, Ondřej	387
Castaño, Obis	378	Kapras, Vojtěch	388
Cibulková, M.	376	Kašný, Martin	388
Ciencialová, Alice	376	Kessels, Michael	380
Císařová, Ivana	393	Kindl, Jiří	392
Coleman, Anthony W.	401	Kiran, Nagavalli S.	389
Coufalíková, M.	409	Kizek, René	373, 384, 399, 400
Ctibor, Karel	387	Klamová, Hana	398
Cvačka, Josef	378, 392	Kleibl, Zdeněk	404
Čáp, Michal	375	Klusoňová, P.	392
Čermák, J.	391	Kneřová, K.	406
Červený, Lukáš	375	Koblížek, Michal	389
Damborský, Jiří	384, 385	Koča, Jaroslav	373
Dobrev, Petr	397	Kohout, Michal	390
Dolečková, Kateřina	377, 388	Kopecky, Vladimír	410
Doležilková, Ivana	377	Korbelová, Barbora	390
Doubek, M.	374	Kosinová, Eva	395
Dračínská, Helena	378	Kotora, Martin	382, 384, 408
Dračínský, Martin	379	Koutek, Bohumír	376
Dvořák, Dalimil	408	Koutný, M.	409
Dvořák, Zdeněk	379, 412	Kovářová, Anna	391
Dvořáková, Marcela	380	Kozmík, Václav	390, 391
Dyr, Jan Evangelista	402	Kozubík, Alois	383, 394
Dyr, J. E.	406	Kožíšek, M.	394
Eckschlager, Tomáš	402	Kráčmarová, A.	391
Eiserich, Jason P.	406	Krafková, Edita	392
Fábry, M.	394	Král, V.	394
Fejtova, Anna	380	Kramer, Karl J.	400
Felsberg, Jürgen	399	Krejčík, Zdeněk	385
Ferret-Bernard, Stephanie	388	Kren, Vladimír	410
Filová, Elena	402	Kročová, Zuzana	385
Fischer, Peter M.	374	Kryštof, Vladimír	374
Fodor, József	390	Křivánková, Kateřina	396
Francová, H.	374	Kříž, Zdeněk	373
Frančová, K.	411	Kučka, M.	392
Frei, Eva	402	Kuglík, P.	374
Fryšová, Iveta	374	Kuhrová, V.	374
Gerber, Stefan H.	380	Kuchař, Martin	393
Glogarová, Milada	390, 391	Lamač, Martin	393
Grochová, Diana	381	Lincová, Eva	394
Grycová, Lenka	381	Linhartová, Irena	403
Gundelfinger, Eckart D.	380	Linková, V.	374
Haisel, Daniel	397	Macečková, Vendula	412
Hajdúch, Marián	407	Macek, Tomáš	377
Harper, Richard W.	406	Macek, T.	411
Hartvich, Petr	382	Macková, Martina	377

Macková, M.	411	Soural, Miroslav	407
Mader, P.	394	Sova, Petr	383
Malbeck, Jiří	389, 397	Standara, Stanislav	381
Malčíková, J.	374	Stará, Irena G.	397, 403
Maňásková, P.	376	Starý, Ivo	397, 403
Marčeková, Zuzana	395	Stibor, Ivan	401
Marek, Radek	381	Stiborová, Marie	378, 398, 402
Marková, Michaela	395	Straková, Monika	385
Mašín, Michal	389	Stránský, Vladimír	387
Matoušková, Eva	405	Streinz, Ludvík	382
Mayer, J.	374	Strnad, Miroslav	374
Mazancová, K.	392	Strnad, Hynek	385
Mcmanus, Michael	406	Stulík, Jiří	385
Mentzlová, D.	374	Südhof, Thomas C.	380
Michalová, Eva	396	Suttner, J.	406
Michl, Josef	409	Svitáková, X.	374
Mikelová, Radka	384	Svitáková, Miluška	381
Mikeš, Libor	377, 388	Svoboda, Michal	373
Mikšík, I.	392	Svoboda, Jiří	390, 391
Mikulík, Karel	399	Šaman, David	397, 403
Milotová, M.	396	Šanda, Miloslav	376
Míšek, Jiří	397	Šebo, Peter	395, 403
Modrianský, Martin	379	Šigutová, Daniela	399
Monreal, F. J.	386	Šilhár, Peter	405
Moravcová, Jitka	387	Šindelka, Radek	376
Moravcová, Jana	398	Šmarda, Jan	412
Motyka, Václav	397	Šmardová, J.	374
Mountford, Adrian	377	Šmardová, Jana	381
Mozga, Tomáš	385	Šťastná, Eva	407
Mráz, Jaroslav	387	Štaud, František	375
Mýtinová, Zuzana	397	Štěpánek, Luděk	375
Neubaerová, Tereza	377	Štěpnička, Petr	393
Neubauerová, Tereza	376	Štěrba, Jaroslav	396
Novak, Petr	410	Štouračová, R.	394
Novotná, Vladimíra	390, 391	Švecová, Lucka	375
Osička, Radim	403	Švihálková-Šindlerová, Lenka	383
Otáhalová, Eva	398	Teplý, Filip	397
Páca, Jan	398	Tichá, M.	376
Pačes, Václav	385	Tobrman, Tomáš	408
Pácha, J.	392	Tom Dieck, Susanne	380
Palečková, Petra	399	Trbušek, M.	374
Palková, Zdena	375	Trnková, Libuše	384
Pávek, Petr	375	Turek, Pavel	408
Petřlová, Jitka	373, 399, 400	Ubík, Karel	405
Petřek, Jiří	399	Udachin, Konstantin A.	401
Phung, Anh D.	406	Václavková, T.	409
Pin, Jean-Philippe	382	Valášek, Michal	409
Pohl, Radek	401	Valentová, Olga	390
Pojarova, Michaela	401	Valík, Dalibor	396
Pokorná, Martina	373	Valterová, Irena	380, 392
Poljaková, Jitka	402	Vanek, Ondrej	410
Pospišil, Martin	387	Vaněk, Tomáš	380
Prášil, Ondřej	389	Vaňková, Jana	381, 412
Prezeau, Laurent	382	Vinšová, J.	386
Procházková, Kateřina	403	Viteček, Jan	399
Prokop, Martin	373	Vlček, Čestmír	385
Prokop, Zbyněk	384, 385	Vlčková, A.	409
Pšikal, Ivan	395	Vltavská, Pavlína	410
Qualmann, Britta	380	Vojtěšek, Bořivoj	385, 396
Ravčuková, Barbora	381	Vrábel, Milan	411
Reková, Alena	389	Vrchotová, Blanka	411
Riedel, Tomáš	402	Vrzal, Radim	379, 412
Riljak, V.	403	Vyklický, Jr., Ladislav	388
Ripmeester, John A.	401	Wilhelmová, Nad'a	397
Rulišek, L.	394	Wimmer, Zdeněk	387
Růžicka, J.	409	Wimmerová, Michaela	373
Růžicka, Jan	410	Zahradníčková, Eva	412
Řezáčová, P.	394	Závada, J.	394
Sadilková, Lenka	403	Závodová, Z.	394
Sedláček, J.	394		
Sehnal, Petr	403		
Sejbal, Jan	379		
Selicharová, Irena	405		
Scholzová, Eva	404		
Slouka, Jan	374		
Smutná, Kateřina	405		
Sobotková, A.	406		
Souček, Karel	383, 394, 406		



Asociace českých chemických společností
a Asociácia slovenských chemických
a farmaceutických spoločností
ve spolupráci se společností

Spolek pro chemickou a hutní výrobu a.s.

a

Univerzitou J. E. Purkyně v Ústí nad Labem
pořádají

58. Sjezd chemických společností

4.–8. září 2006, Ústí nad Labem

Odborný program proběhne v následujících sekcích:

1. Analytická a fyzikální chemie
2. Anorganická a materiálová chemie
3. Organická a farmaceutická chemie
4. Petrochemie a polymery
5. Výuka, informatika a historie chemie
6. Chemie životního prostředí
7. Chemie potravin a biotechnologie
8. Průmyslová chemie – CHEMPROGRESS

Plenární příspěvky dosud potvrdili následující přednášející:
C. Näther (Heyrovského-Ilkovičova-Nernstova přednáška)
J. Moravcová (Šantavého přednáška)

Přednášky k 80. narozeninám doc. K. Bláhy:
J. Vičar, P. Maloň, M. Flegel

VIP přednášky:
P. Zuman, F. Tureček, V. Větvicka, V. Křen, V. M. Král,
J. B. Šmidrkal

Hlavní přednášky v příslušných sekcích:
M. Navrátil, D. Berek, S. Schmidt, P. Kutschy, P. Szolcsányi,
K. Jesenak, K. Florián, P. Silny, M. Remko.

Temíny:

Druhý oběžník na webu	18.3.2006
Registrace za standardní poplatek	15.5.2006
Zaslání abstraktu pro sborník	15.5.2006

Kontakt pro zaregistrované účastníky: info@orgit.cz
Adresa pro písemný styk: Česká společnost chemická,
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
Další informace na adrese: <http://www.sci.ujep.cz/sjezd>



Sjezd se koná v Ústí nad Labem, významném středisku českého chemického průmyslu v roce, kdy Spolek pro chemickou a hutní výrobu, a.s., oslaví 150. výročí svého založení. Koná se také v roce, kdy Česká společnost chemická vydává stý ročník časopisu „Chemické listy“. A v neposlední řadě je konání sjezdu v Ústí n. L. i reflexí toho, že na Univerzitě Jana Evangelisty Purkyně byla nově zřízena Přírodovědecká fakulta, teprve druhá v Čechách, a byla tak posílena i pozice chemických oborů v regionu.

Účastnický poplatek se skládá z následujících položek (fakturovaných separátně):

- vlastní registrační poplatek, zahrnující veškeré organizační náklady, doprovodné akce a sborník sjezdu – 8. číslo Chemických listů,
- ubytování dle individuální objednávky. Ubytování je zajištěno na kolejích UJEP – jedná se o jednolůžkové pokoje s vlastním sociálním zařízením, cena za noc je 230 CZK,
- stravné dle individuálních objednávek, cena oběda či večeře je 75 CZK, snídaně je zahrnuta v ceně ubytování a nevyúčtovává se.

Registrační poplatek pro člena některé ze společností asociace je 2600 CZK v řádném termínu, 3200 CZK za pozdní registraci (řádným termínem se rozumí přihlášení do 15.5.2006). Registrační poplatek pro nečleny je 3100 CZK v řádném termínu a 3500 CZK po termínu. Studentům bude poskytnuta sleva cca 700 CZK z tohoto registračního poplatku (poplatek činí 1900 CZK v řádném termínu a 2500 CZK po termínu). Studentský poplatek je podmíněn členstvím v některé ze společností asociace.

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	313	EDITORIAL	313
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Endokannabinoidy	314	Endocannabinoids	314
Z. Fišar		Z. Fišar	
Arsen a jeho příjem rostlinami	323	Arsenic and Its Uptake by Plants	323
P. Soudek, L. Víchová, Š. Valenová, R. Podlipná, J. Malá a T. Vaněk		P. Soudek, L. Víchová, Š. Valenová, R. Podlipná, J. Malá, and T. Vaněk	
Konstruktce amperometrických biosenzorů pro rychle a jednoduše stanovení etanolu	330	Constructions of Amperometric Biosensors for Rapid and Simple Monitoring of Ethanol	330
M. Valach a E. Šturdík		M. Valach and E. Šturdík	
Kinetika chemického rozpouštění oxidů: Porovnání teorie a experimentu	337	Kinetics of Chemical Dissolution of Oxides: Comparison of Theory and Experiment	337
A. Fedoročková a P. Raschman		A. Fedoročková and P. Raschman	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Porovnání vyparovacího procesu v neriadenom D.C. oblúku v klasickej spektrografii a riadenom D.C. oblúku v optickej spektrometrii pri analýze niektorých vybraných environmentálne relevant- ných prvkov	348	A Comparison of Evaporation in Uncontrolled DC Arc in Classical Spectrography and in Com- puter-Controlled DC Arc in Optical Spectrometry in Analysis of Environmentally Relevant Elements	148
S. Ružičková, J. Bajuszová, M. Matherny a L. Koller		S. Ružičková, J. Bajuszová, M. Matherny, and L. Koller	
Materiály pro tenké vrstvy infračervených zrcadel	357	Materials for Thin Layers of Infrared Mirrors	357
J. Mohelníková		J. Mohelníková	
Identifikace komplexů hliníku v uhlí metodou NMR tuhé fáze	363	Identification of Aluminium Complexes in Coal by Solid State NMR Spectroscopy	363
P. Straka a Z. Klika		P. Straka and Z. Klika	
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE	368	NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY	368
OPRAVA	368	ERRATA	368
RECENZE	369	BOOK REVIEWS	369

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 100 (2006), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 130, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 116 • 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 v Praze, 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 • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, 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, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plné předplatné 2006 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2006 (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 • Dáno do tisku 28.4.2006.