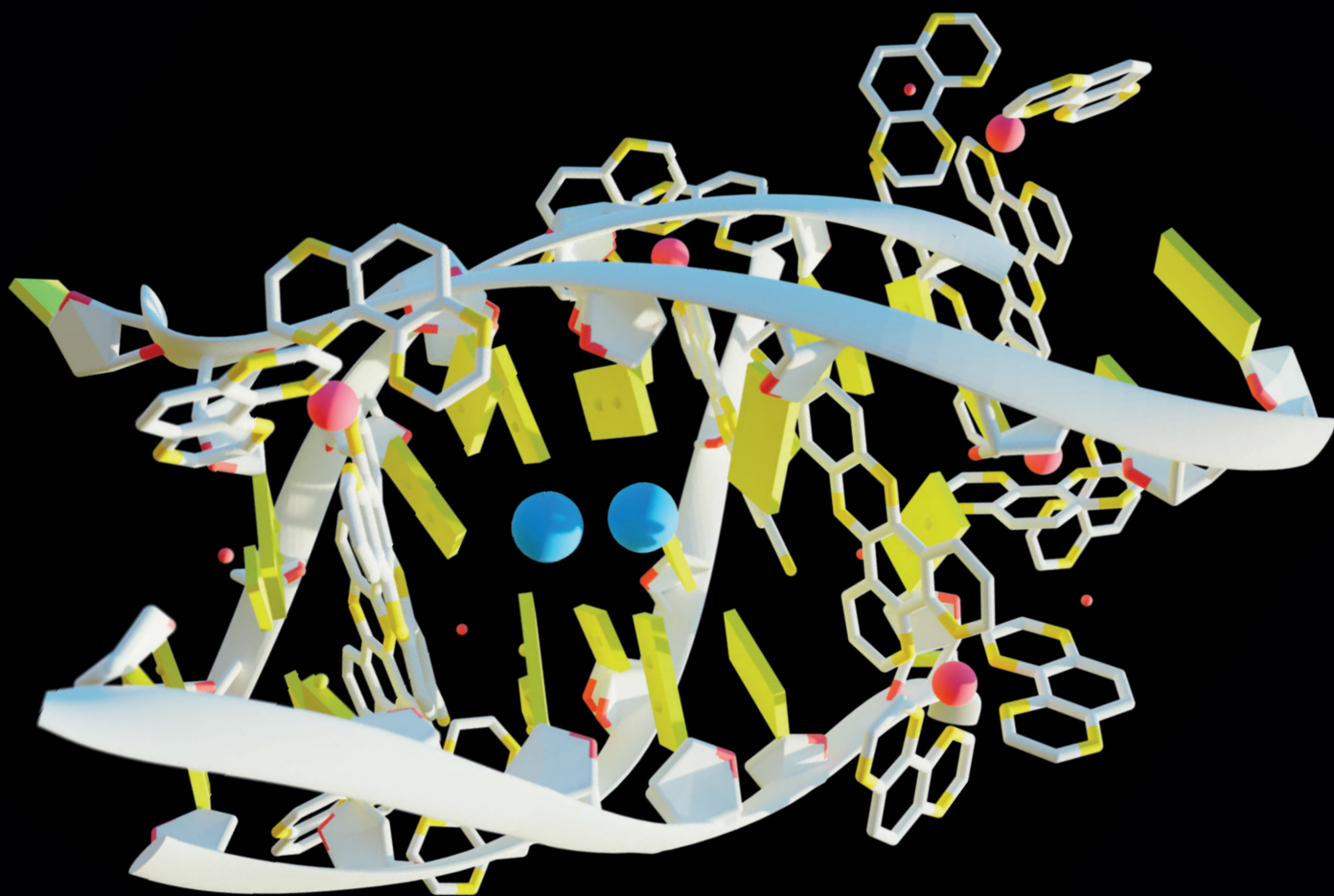


Chemické Listy

5

ročník • 118



Aerosolová hmotnostní spektrometrie

Lipidizace při vývoji peptidových léčiv

Matrix Gla proteiny jako biomarkery

Ramanova spektroskopie medicínských polymerů



Chemistry Europe Fact Sheet

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

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

Journals:
www.chemistry-europe.org

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

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

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

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

Hub: www.chemistry-europe.org

Association

Mission

3 per year, free

Newsletter



**Chemistry
Europe**

ChemistryViews

Science
news
magazine

What is happening in
the global chemistry
community

Strong focus on the people
behind the science.

www.chemistryviews.org/register/

www.chemistryviews.org

Fellows
Program

Award

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

www.chemistryviews.org/fellows/

Recognizes outstanding contributions to chemistry.

Includes prize money of EUR 10,000
and a certificate

Open to individuals worldwide, regardless of
their affiliation with *Chemistry Europe* societies.
www.chemistryviews.org/chemistryeuropeaward/



@ChemEurope

Hub:

www.chemistry-europe.org



[linkedin.com/company/
chemeurope/](https://linkedin.com/company/chemeurope/)

Chemické povídání

Všechny živé organismy využívají nějakou formu komunikace. My lidé používáme obvykle verbální komunikaci, která se zdá velmi dokonalá, ale jak všichni z vlastní zkušenosti víme, vzájemné porozumění/dorozumění bývá často problematické, a to i v případě, že používáme stejný jazyk. Prostě vysoká úroveň vědomí a emoci vše komplikuje. Ostatní živočichové využívají pro komunikaci více či méně artikulované zvuky. Jak to ale je s organismy, které zvukové projevy k dispozici nemají? Z vyšších organismů to jsou například rostliny a velmi propracovaný systém komunikace funguje mezi buňkami jednobuněčných mikroorganismů, jež vede kurčitým prvkům mnohobuněčnosti. Obě uvedené skupiny produkují nepřehledné množství chemických sloučenin a některé z nich jsou právě zodpovědné za tzv. chemické povídání. Asi nejznámějším mechanismem komunikace je quorum sensing u mikroorganismů. Jak už z názvu vyplývá, mikroorganismy jsou schopné rozpoznat množství buněk ve svém okolí a podle toho měnit své chování jako celek, což často vede k přechodu do jiného buněčného fenotypu. Buňky v buněčné populaci se tak vlastně domlouvají, co budou dále dělat. Mohou se tak podle situace rozhodnout, že např. budou růst v „mnohobuněčném“ útvaru – biofilmu, nebo se z tohoto útvaru odpoutají. Mohou začít produkovat různé metabolity, jako například barviva, toxiny a pro nás velmi důležitá antibiotika. Tento mechanismus rovněž může navodit diferenciaci buněk, proces sporulace apod. Z pohledu člověka je nepříjemné, že tento mechanismus může navodit produkci virulencních faktorů u patogenních mikroorganismů. A jak vlastně tento mechanismus funguje? Mikrobní buňky mají na svém povrchu receptory, na které se zachytí signální molekuly, které samotné buňky produkují. Pokud je zaplněno potřebné množství receptorů, buňky poznají, že je jich v prostředí dostatek (bylo dosaženo potřebné quorum) a rozhodnou se změnit svoje chování. Výhodou tohoto procesu je skutečnost, že to celé proběhne bez diskuse a emoci. Signálními molekulami, které proces zajišťují, bývají často acyl-homoserinové laktony nebo krátké peptidy. Uvnitř buněk pak může být signál ještě předán druhému poslovi, což bývá cyklický diguanosin-monofosfát. Kvasinky používají pro dorozumívání farnesol a tyrosol. Z uvedeného plyne, že v mikrobním světě je pro komunikaci využíváno omezené množství chemických struktur. Podobnost signálních molekul tak může vést ke komunikačnímu „šumu“ a vzájemnému ovlivňování různých buněčných populací. Toto křížové povídání se ale nemusí omezovat jen na

mikrobní populace a nemusí být ve všech případech zcela přátelské. *Serratia marcescens* produkuje červené barvivo prodigiosin a *Chromobacterium violaceum* modré barvivo violacein. Obě látky mají též antibiotickou aktivitu a zbarvení kolonií varuje případné útočníky, že nemusi dopadnout dobře. Podobnými informacemi jsou barviva produkována řadou vláknitých hub, kterými nám sdělují, že danou potravinu si už přivlastnil někdo jiný a pro nás je nevhodná. Vlákničitá houba *Acremonium lolii* se vyskytuje jako endofyt běžné traviny jilku a dalších. Tato houba produkuje alkaloidy, které jsou výstražnou zprávou pro okolní organismy a chrání svého hostitele. Alkaloid peramin odpuzuje hmyz a lolitrem B způsobuje neuralgické potíže skotu, který z tohoto důvodu příslušnou travinu nespásá. Gram negativní bakterie *Vibrio fischeri* je schopná výše uvedeným mechanismem quorum sensing vytvářet namodralou luminescenci. Této schopnosti využívají někteří mořští hlavonožci, kteří umožňují, aby jejich těla byla na povrchu osídlena dostatečně hustou populací těchto vibrií. Luminescence způsobí, že těla hlavonožců se stanou v noci neviditelná a jeví se jako odlesky měsíce na hladině vody. Pro predátory to je informace, že se jim potrava ztratila. V říši rostlin je komunikace mnohem rozmanitější. Informace proudí mezi tkáněmi rostliny, ale významně též mezi jednotlivými rostlinami. Rostliny spolu mohou chemickou řečí mluvit prostřednictvím produkce těkavých látek, které si předávají vzduchem. Škála těchto látek je poměrně široká. Častými zástupci jsou ethylen, methyl-salicylát, či látky ze skupiny oxylipinů (např. hexenal, hexenol, methyl-jasmonát, cis-jasmon) nebo terpenoidů (např. beta-ocimen, beta-farnesen). Látky obvykle slouží ke zprostředkování informace o stresových stimulech v prostředí či o napadení jinými organismy. Odezvou pak bývá produkce obranných látek nazývaných fytoalexiny. Další forma komunikace se odehrává prostřednictvím kořenového systému. Rostliny v exudátech z kořenů produkují mimo jiné řadu chemických signálních sloučenin, kterými komunikují s okolním prostředím, zejména s mikroorganismy v rhizosféře, a vznikají mezi nimi nejrůznější kladné či negativní vztahy. Pro komunikaci jsou využívány různé polyfenoly (flavony, kumariny – scopoletin), terpenoidy (strigolaktony), alkaloidy (camalexin) a další. Chemické povídání je tedy velmi rozmanité, ale současně účelné, protože odesílatel poskytuje příjemci informace, zda se s ním chce přátelit nebo ho chce poškodit anebo dokonce zabít. V každém případě jsou zprávy miněné upřímné.

Jan Masák



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

AEROSOLOVÁ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

RADEK LHOTKA^{a,b} a PETR VODIČKA^a

^a Ústav chemických procesů AV ČR v.v.i, Rozvojová 135, 165 00 Praha 6, ^b Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Česká republika
lhotka@icpf.cas.cz, vodicka@icpf.cas.cz

Došlo 1.2.24, přijato 22.2.24.

Hmotnostní spektrometrie nachází široké uplatnění v různých vědeckých oborech. V atmosférické chemii byla dlouhou dobu výzva k detailní on-line analýze chemického složení aerosolových částic (tj. částic pevného nebo kapalného skupenství) v atmosféře. To vedlo k vývoji tzv. aerosolových hmotnostních spektrometrů, k jejichž rozvoji došlo během uplynulých dvaceti let. Tyto přístroje umožňují analyzovat chemické složení částic o velikostech ca 50–800 nm, a to běžně i v minutovém rozlišení. O jejich vývoji a možných aplikacích pojednává tento referát.

Klíčová slova: aerosoly, hmotnostní spektrometrie, atmosféra, organický aerosol, environmentální analýzy

Obsah

1. Úvod
2. Aerosolové hmotnostní spektrometry a možnosti jejich využití
 - 2.1. Vývoj a typy analyzátorů
 - 2.2. Princip měření
 - 2.3. Korekce a evaluace dat
 - 2.4. Příklady měření
 - 2.5. Využití dat
3. Závěry

1. Úvod

Představme si hmotnostní spektrometr s dírkou v plášti vakuované komory, díky které je do analyzátoru stále něco nasáváno. Takový analyzátor bychom nejspíše vrátili výrobci jako vadný. Nicméně, zjednodušeně řečeno, na takovém principu funguje aerosolový hmotnostní spektrometr (AMS). Jedná se o přístroj, který byl navržen a vyvinut za účelem on-line analýzy a charakterizace aerosolů¹. Aerosolem nazýváme částice pevného, kapalného nebo směsného skupenství, které jsou rozptýleny v plynu. Ve vzduchu hovoříme o atmosférickém aerosolu, kde tvoří zdánlivě zanedbatelnou část hmoty atmosféry (méně než 0,0001 %) ^{2,3}. I přesto mají aerosoly významný vliv na zdraví⁴, kvalitu ovzduší⁵ nebo klima⁶, a proto jsou celosvětově předmětem mnoha studií. V rámci výzkumu aerosolů představuje AMS jeden z nejpokročilejších nástrojů pro jeho on-line chemickou analýzu. Mezi materiály, které jsou úspěšně pomocí AMS analyzovány, náleží organické aerosoly (OA) spolu s hlavními anorganickými

látkami přítomnými v atmosférickém aerosolu, jako jsou (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ a NH₄Cl. Tento referát pojednává o vývoji a typech těchto přístrojů a principu jejich měření, představuje ukázkou měřených dat a možnosti jejich využití pro studium atmosféry.

2. Aerosolové hmotnostní spektrometry a možnosti jejich využití

2.1. Vývoj a typy analyzátorů

Při vývoji prototypů hmotnostních spektrometrů pro on-line analýzu aerosolů byly použity různé přístupy, které se odlišovaly jak konstrukcí přístrojů, tak zejména v metodě vypaření/ionizace analyzovaných částic. Zatímco první část spektrometrů využívala laserovou desorpci/ionizaci, tak druhá používala vypaření částic dopadem na zahřátý povrch a následnou ionizaci dopadem elektronů^{7,8}. Druhý přístup se pro analýzy ujal ve větší míře a následně byl rozvíjen i pro běžně dodávané analyzátory. V současnosti je jediným komerčním výrobcem různých druhů AMS pro on-line analýzy americká firma Aerodyne Research, Inc. (<https://www.aerodyne.com/>), jejíž různé typy spektrometrů jsou shrnuty v tab. I. Prvním, takto dostupným on-line spektrometrem byl AMS s kvadrupólovým hmotnostním detektorem (Q-AMS)¹, který od počátku umožňoval určit jak chemické složení základních složek aerosolu, tak jeho velikostní rozlišení. Tento přístroj byl postupně zdokonalován a původní kvadrupólový detektor byl nahrazen kompaktním analyzátozem doby letu (Time-of-Flight, C-ToF)⁹. C-ToF-AMS má v porovnání s Q-AMS nižší meze detekce a větší rozsah měřených *m/z*, nicméně přístroj stále měří v jednotkovém

hmotnostním rozlišení (Unit Mass Resolution). Pro zvýšení hmotnostní rozlišovací schopnosti AMS byl následně vyvinut přístroj s vysokorozlišovacím detektorem (High-Resolution Time-of-Flight, HR-ToF)¹⁰, který již umožňuje analyzovat jednotlivé chemické fragmenty ve vyšším rozlišení m/z . Nejnověji byla detekční schopnost AMS vylepšena pomocí ToF detektoru s dlouhou dobou letu (Long Time-of-Flight, LToF-AMS). Výborná detekční schopnost LToF-AMS umožňuje další rozdělení blízkých píků v hmotnostním spektru¹¹, což je však vykoupeno jeho zvýšenou hmotností (ca 125 kg), a tím i nemožností s ním snadněji manipulovat.

Z důvodů poptávky po miniaturizaci AMS, tak aby byl přístroj snadno umístitelný na různé měřicí stanice, kde se provádí měření, pokud možno rutinně bez nutnosti častých zásahů operátora, byly později vyvíjeny jednodušší monitorovací aerosolové hmotnostní spektrometry (ACSM, Aerosol Chemical Speciation Monitor). První v řadě to byl opět ACSM s kvadrupolovým detektorem (Q-ACSM)¹² následovaný vylepšenou verzí, ACSM s ToF detektorem (ToF-ACSM)¹³. Daní za miniaturizaci přístroje (a také nižší cenu) bylo odstranění možnosti analyzovat velikostní profil částic a omezení rozsahu měřených hmotností zhruba na 200 m/z . I přesto umí ACSM přístroje hodnotit rutinně základní složky atmosférického aerosolu, a to sírany (SO_4^{2-}), dusičnany (NO_3^-), amonné ionty (NH_4^+), organické aerosoly (OA) a chloridy (Cl^-) bez mořské soli. V současnosti je vylepšována i detekční schopnost těchto monitorů, a to v podobě ACSM s vylepšeným detektorem (ToF-ACSM-X)¹⁴, který má větší rozsah měřených m/z , tak rozlišovací schopnost. Vyšší rozlišení TOF-ACSM-X poskytuje lepší limity detekce oproti předchozím ACSM, a to zejména u dusičnanů (rozlišení od

fragmentů OA na m/z 30) a amonných iontů (rozlišení od fragmentu vody na m/z 17).

Limitem AMS je zejména nemožnost analýzy aerosolů, které za daných podmínek nejsou odpařeny a analyzovány, patří mezi ně minerální látky, elementární uhlík (EC), popílek, prvky zemské kůry a jejich oxidy, ale i mořská sůl. V případě mořské soli je možnost stanovení na základě kalibračního faktoru stanoveného zástupnými ionty Na^+ a Cl^- měřených pomocí HR-ToF-AMS (cit.¹⁵). Relativně nejvyšší nejistota vzniká při absenci dat EC (sazí, černého uhlíku), který tvoří 5–15 % atmosférického aerosolu. Omezení v podobě nemožnosti analýzy EC pomocí AMS bylo částečně vyřešeno spojením HR-ToF-AMS a laserového odpařovače s fotometrem, pomocí něhož jsou částice sazí detegovány laserem těsně před dopadem na odpařovač aerosolu¹⁶. Často jsou však koncentrace EC doplňovány z jiných paralelních měření, a to buď z analyzátoru organického a elementárního uhlíku¹⁷, nebo v podobě tzv. černého uhlíku měřeného opticky pomocí aethalometru¹⁸.

Výše uvedený přehled (tab. I) ukazuje, že v současnosti existuje širší spektrum hmotnostních spektrometrů pro analýzu aerosolů. Princip měření AMS, který si následně detailněji popíšeme, však zůstává podobný.

2.2. Princip měření

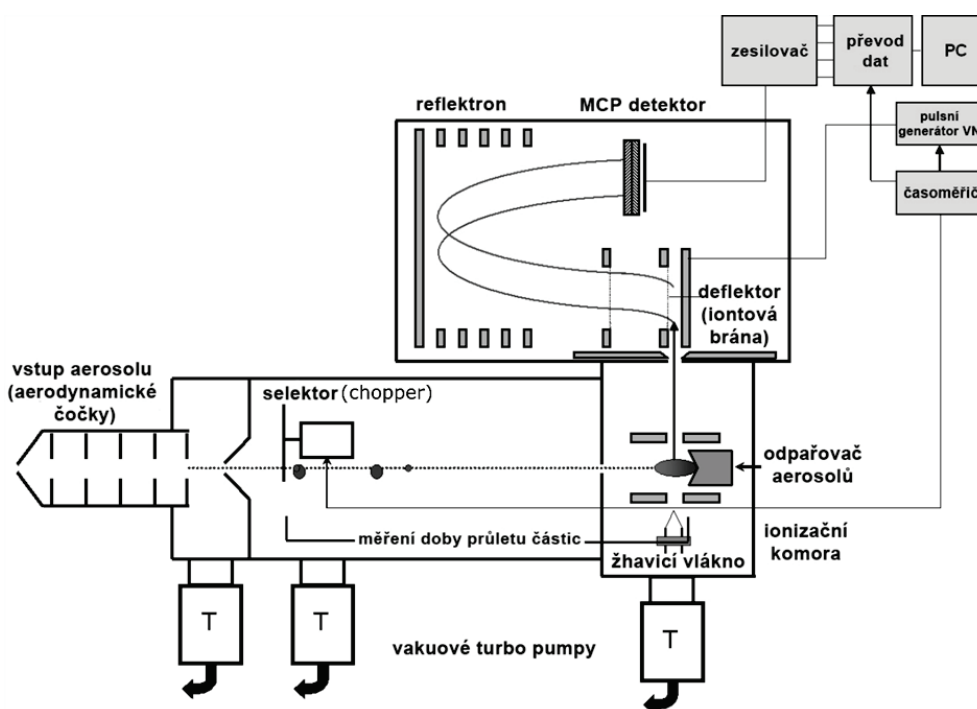
Zjednodušené schéma AMS je znázorněno na obr. 1. Principiálně AMS funguje tak, že aerosolové částice jsou nasávány přes vstupní aerodynamické čočky, kde jsou uspořádány do úzkého paprsku, procházejícího přes evakuovanou komoru do odpařovače, kde jsou vypařeny a následně analyzovány detektorem.

Tabulka I

Přehled různých typů aerosolových hmotnostních spektrometrů, jejich mezí detekce, rozlišovacích schopností a měřicích rozsahů

Typ spektrometru	Mez detekce ^b [$\mu\text{g m}^{-3}$]	Hmotnostní rozlišovací schopnost [$m/\Delta m$]	Rozsah m/z	Lit.
Q-AMS ^a	0,25 (3 min)	UMR ⁱ (300)	1–300	1
C-ToF-AMS ^b	0,025 (1 min)	UMR ⁱ (400)	1–400	9
HR-ToF-AMS ^c	0,003 (V), 0,03 (W) (1 min)	2500 (V), 5000 (W)	1–1200	10
SP-AMS ^d	stejně parametry jako HR-ToF-AMS + měření sazí			16
LToF-AMS ^e	0,04 (1 min)	7000	1–1000	11
Q-ACSM ^f	0,2 (30 min)	UMR ⁱ (200)	1–200	12
ToF-ACSM ^g	0,31 (OA), 0,04 (SO_4^{2-}), 0,09 (NO_3^-), 0,06 (Cl^-), 0,19 (NH_4^+) (10 min)	UMR ⁱ (200)	1–200	13
ToF-ACSM-X	0,14 (OA), 0,0087 (SO_4^{2-}), 0,016 (NO_3^-), 0,010 (Cl^-), 0,0045 (NH_4^+) (10 min)	2000	1–400	14

^aQ-AMS (Quadrupole AMS), ^bC-ToF-AMS (Compact Time-of-Flight AMS), ^cHR-ToF-AMS (High Resolution ToF-AMS), ^dSP-AMS (Soot Particle AMS), ^eLToF-AMS (Long ToF-AMS), ^fQ-ACSM (Quadrupole – Aerosol Chemical Speciation Monitor) ^gToF-ACSM (Time-of-Flight – Aerosol Chemical Speciation Monitor), ^hmez detekce pro 1 min integrační čas, pokud není uvedeno jinak, ⁱUMR (Unit Mass Resolution)



Obr. 1. Schéma C-ToF-AMS. Převzato a upraveno z Drewnick a spol.⁹

Rozebereme-li si přístroj blíže, tak uvnitř spektrometru je udržováno vysoké vakuum (ca 10–15 Pa), které zajišťuje soustava turbomolekulárních vývěv (turbo pump). Přestože je odsáta většina plynné složky, je plynů detegovaných AMS přítomno stále více, než analyzovaných aerosolů. Nicméně hlavních složek plynné fáze není mnoho (N_2 , O_2 , Ar, H_2O , CO_2) a tvoří tak relativně málo m/z píků.

Aerosoly do přístroje vstupují přes kritickou trysku, kterou je otvor o průměru 100 μm , za níž jsou umístěny tzv. aerodynamické čočky, což je soustava dalších kritických trysek, které zajistí, že aerosol je v nasávaném vzduchu zaostřen do úzkého paprsku¹⁹. Zaostření je závislé na tvaru a velikosti částic a probíhá s relativně nízkými ztrátami. Simulace ukázala, že projde téměř 100 % částic o velikosti 70–500 nm (cit.¹⁹). Přístroj tak zhruba analyzuje frakci jemného aerosolu. Pro rozšíření velikostního rozsahu měřených částic byl vyvinut i vstup pro velikost aerosolu do 2,5 μm , tj. frakce $PM_{2.5}$ (cit.²⁰), který je používán i u monitorů ACSM (cit.²¹).

Poté, co je aerosol do přístroje nasát, prochází zaostřené částice evakuovanou komorou na vypařovací kolektor, který je zahříván na ca 600 °C. Přístroj analyzuje pouze částice, které se při této teplotě a vysokém vakuu vypaří dostatečně rychle²². Zdrojem emitujících elektronů jsou rozžhavená wolframová vlákna. Odpařené složky aerosolu jsou nejčastěji ionizovány dopadem elektronů s energií 70 eV, jedná se tedy o elektronovou ionizaci (EI). Následkem toho jsou molekuly fragmentovány a identifikace

původních struktur je většinou nemožná. Při EI ionizaci se produkuje velké množství fragmentů, ale fragmentace jednotlivých molekul je více méně reprodukovatelná a poměry mezi intenzitami jednotlivých fragmentů jsou stabilní²³.

Zde lze ještě dodat, že v rámci vývoje AMS jsou prováděny experimenty s různými typy ionizace vzorku za použití např. ultrafialové fotoionizace^{24,25} nebo chemické ionizace^{26,27}, nicméně EI zůstává standardně používanou ionizací.

Pouze část aerosolů, která je v odpařovací komůrce převedena do plynné fáze, je následně detegována hmotnostním detektorem. Proto se zavádí veličina ionizační účinnost (IE, ionization efficiency)²⁸, která zahrnuje (a) pravděpodobnost, že molekula bude ionizována, (b) transmisní účinnost do oblasti detektoru závislou na m/z , (c) detekční účinnost.

Vedle určení chemického složení částic dokáže AMS určit i jejich velikostní distribuci. Během měření v tzv. módu doby letu částic (PToF, Particle Time of Flight) je do dráhy paprsku částic vložen selektor (chopper), který propustí ca 3 % částic. Během letu jsou částice rozděleny podle velikosti – menší letí rychleji než velké. Přístroj měří dobu jejich letu mezi chopperem a dopadem na vypařovací kolektor a zároveň měří složení jednotlivých velikostních frakcí. Protože AMS signál je úměrný hmotnosti, je výsledek uváděn jako hmotnostní velikostní distribuce částic o daném vakuovém aerodynamickém průměru.

2.3. Korekce a evaluace dat

Kalibrace AMS/ACSM je nutno provádět před, po i během měření. Obvykle je kontrolován průtok, ionizační účinnost a v případě AMS také velikost částic (resp. doba letu částic v závislosti na jejich velikosti). Přesto při odběru a analýze aerosolu dochází k různým typům ztrát. Jedná se o ztráty na odběrové trase během odběru do přístroje, a to včetně výše zmiňovaných ztrát na aerodynamických čočkách. Dále se jedná o ztráty podílu částic dopadajících na kolektor a podíl skutečně vypařených částic na kolektoru (vliv podílu odražených a případně jen částečně odpařených částic). Účinnost zachytu (CE, collection efficiency) v přístroji je ovlivňována velikostí, tvarem a chemickým složením částic. Ztráty, a tím i CE přístroje, jsou nejčastěji kolem hodnoty 50 %, to je následně nutné promítnout při výpočtu reálných koncentrací²⁹. Velikost a tvar částic ovlivňuje zejména vlhkost. Relativní vlhkost vzorku je velmi proměnlivá, a proto sušení částic na vstupu do přístroje pomáhá stálostí výsledků a je zároveň požadavkem pro standardizovanou měření.

Rozdílné chemické složení částic je pak reflektováno v korekčním faktoru zahrnujícím účinnost zachytu závislou na chemickém složení (CDCE, Composition-Dependent Collection Efficiency), který zohledňuje různé odpařování chemických látek³⁰. Např. nejméně kulovité částice $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vykazují nejhorší zaostření, zatímco částice NH_4NO_3 se blíží kulovitým částicím a vykazují tak lepší zaostření²⁹. Tyto korekce jsou však prováděny již ve specializovaném programu pro zpracování dat z AMS, resp. ACSM.

Data z AMS jsou zpracovávána pomocí programu Squirrel³¹ (<https://cires1.colorado.edu/jimenez-group/ToFAMSResources/ToFSoftware/index.html#Analysis2>), a v případě ACSM programem Tofwerk, které oba pracují v prostředí programu Igor (www.wavemetrics.com). Během vyhodnocení dat jsou provedeny jak základní úpravy, jako je např. nastavení základní linie a korekce m/z signálu, tak pokročilejší zpracování dat. Specialitou těchto analýz je korekce na tzv. airbeam, což je signál, který udává počet iontů dusíku a kyslíku (m/z 28 a 32) v plynné fázi (ovzduší). Airbeam je monitorován kontinuálně a změny v jeho hodnotách slouží jako korekční faktor reflektující vliv okolí na měření AMS (cit.²²). Během zpracování dat přiřazují programy signály jednotlivých m/z hlavním chemickým skupinám měřeným pomocí AMS (OA , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , Cl^-) na základě tzv. fragmentační tabulky²³. Fragmentační tabulku je možné modifikovat podle typu prostředí, ve kterém bylo měření prováděno³² a při evaluaci dat lze stanovit i jiné látky jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky³³.

2.4. Příklady měření

Výstupem z měření AMS jsou hmotnostní spektra s přiřazeným chemickým složením, velikostní distribuce a jejich změna v čase, jak je vidět na obr. 2. Ten ukazuje výsledky od 29. 4. do 2. 5. 2023 na Národní atmosférické

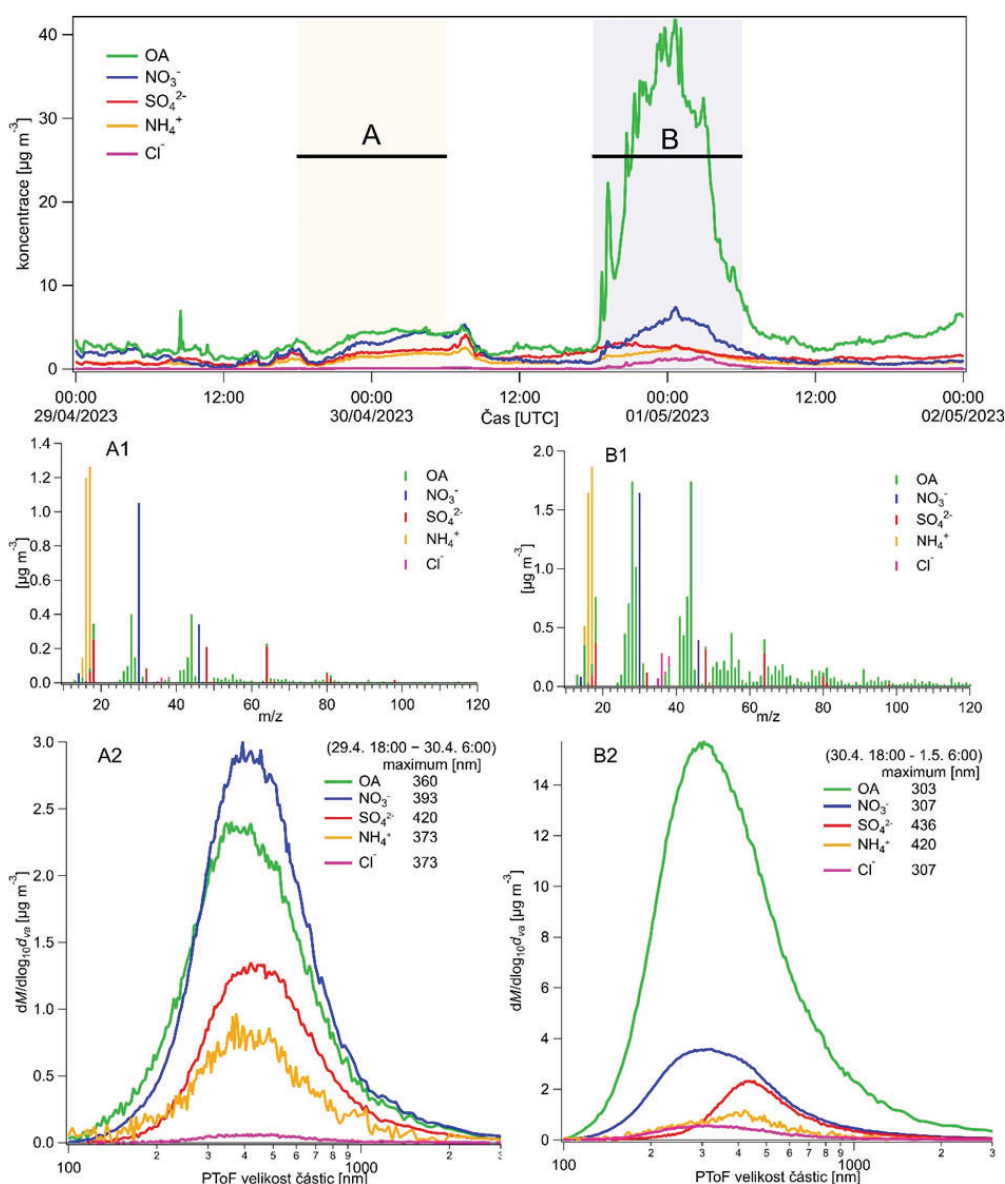
observatoři Košetice. Během tohoto měření je zaznamenána změna ve složení aerosolu během noci na 1. 5., kdy v Česku probíhá tradiční pálení čarodějnic. Při srovnání za stejné časové období během předchozí noci dochází k nárůstu koncentrací zejména OA, a změny jsou vidět jak na průměrném hmotnostním spektru (obr. 2A1 a 2B1), tak na distribuci velikostí částic (obr. 2A2 a 2B2). Průměrná velikost částic během pálení čarodějnic je menší zejména u OA a NO_3^- , zatímco u SO_4^{2-} zůstává podobná jako byla předchozí noc. Analýza tak ukazuje, že v průběhu pálení čarodějnic docházelo k nárůstu čerstvých aerosolových částic, které mají menší průměr než během referenční noci. Podobným způsobem lze analyzovat dlouhodobá AMS měření a sledovat, jak se mění chemické složení v různých sezónách na různých typech stanic. V Česku byly takto zkoumány atmosférické aerosoly na městské stanici v Praze³⁴ nebo na pozadřevé stanici Košetice³⁵.

Další příklad uvedený na obr. 3 ukazuje využití AMS při analýze atmosférických procesů simulovaných v teflonové komoře. Konkrétně reakci α -pinenu s ozonem, kdy dochází k postupné tvorbě různých organických sloučenin, které tvoří částice OA. Tyto částice postupně narůstají na velikost okolo 300 nm. Podobným způsobem lze studovat změny v chemickém složení aerosolu za různých podmínek, např. při změnách teploty, vlhkosti, přítomnosti různých plynných prekurzorů a organických látek^{36–38}.

Výše uvedené příklady ukazují zlomek aplikačních možností AMS, které jsou díky mezím detekce (tab. I) vhodné jak k měření na odlehklých místech s nízkými koncentracemi aerosolů³⁹, tak na silně znečištěných lokalitách⁴⁰. Pokud je na stanicích vhodná infrastruktura např. v podobě měřicího stožáru, lze AMS díky vyššímu časovému rozlišení využít nejen k pozemním měřením, ale i pro výzkum dlouhodobé vertikální distribuce aerosolů⁴¹, případně k analýze eddy-kovariance (vírové kovariance) chemicky rozlišených aerosolových toků⁴². Tato měření však nemusejí být pouze stacionární, ale mohou být prováděna i v nějakém mobilním zařízení, např. v letadle^{43,44}, na lodi⁴⁵ nebo v automobilu⁴⁶. V těchto případech je za určitých omezujících podmínek možno měřit až v milisekundovém časovém rozlišení⁴⁷.

Měření mohou být zaměřena i na výzkum vnitřních prostředí⁴⁸, transformaci aerosolů při přechodu z vnitřního do vnějšího prostředí⁴⁹ nebo studium chemických látek tvořících aerosoly v domácnostech⁵⁰. V laboratorních podmínkách jsou AMS nasazovány při experimentech na různých atmosférických komorách, jak je uvedeno na obr. 3, popřípadě spalovacích komorách⁵¹.

Zvláštním případem je využití AMS pro laboratorní off-line měření vzorků, které již předtím byly odebrány na filtry^{52,53}. Hlavní nevýhodou je, že atmosférický aerosol může na filtru doznat jistých změn⁵⁴, takže výsledky mohou být hůře reprodukovatelné. Atmosférický aerosol měřený off-line metodou však můžeme snadno rozdělit na sloučeniny ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné, přičemž zdroje těchto složek aerosolu se mohou zásadně lišit⁵³.



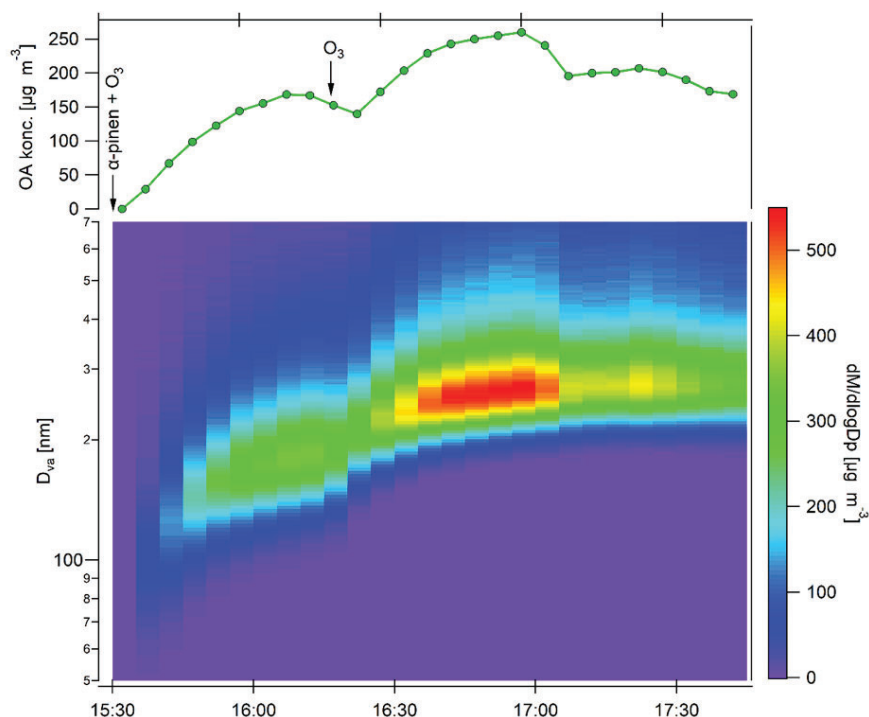
Obr. 2. Časové série základních složek jemného aerosolu měřených na pozadíové stanici Košetice od 29. 4. do 2. 5. 2023. Grafy A1 a A2 reprezentují průměrné hmotnostní spektrum a průměrnou velikostní distribuci částic v období od 29. 4. 18:00 do 30. 4. 6:00, zatímco grafy B1 a B2 pro období palení čarodějnic od 30. 4. 18:00 do 1. 5. 6:00.

2.5. Využití dat

Naměřená on-line data na různých lokalitách se využívají např. k dlouhodobému výzkumu kvality ovzduší ve vysokém časovém rozlišení⁵⁵ nebo k určování zdrojů atmosférických aerosolů, a to zejména metodou pozitivní maticové faktorizace (PMF)⁵⁶ v kombinaci s přístupem ME-2 (cit.^{57,58}). Zdroje OA lze určovat také v reálném čase, a to postupem nazývaným Real-Time Source Apportionment⁵⁹, nebo pro dlouhodobé měřící kampaně metodou tzv. rolování (Rolling PMF)^{60,61}. Dalšími možnostmi využití AMS dat je výpočet hygroskopicity atmosférických

aerosolů⁶², stanovení hustoty organického aerosolu^{35,63} nebo výzkum těkavosti⁶⁴ a velikostní distribuce aerosolu^{35,65}.

Jako diagnostiku z AMS měření lze využít fragmentační poměry organických látek, kde např. f_{44} je poměr (m/z 44) / (m/z OA_{total}). Využívá se zejména srovnání fragmentů f_{43} vs. f_{44} (cit.⁶⁶), které mohou velmi dobře popsat oxidační stav aerosolu v atmosféře⁶⁷. Srovnáním f_{44} vs. f_{60} lze indikovat změny v oxidaci čerstvých emisí ze spalování biomasy⁶⁸. V tomto případě se fragment f_{60} vztahuje k čerstvým emisím ze spalování (hemi)celulosity, zatímco fragment f_{77} z následného štěpení ligninu při spalování biomasy⁶⁹.



Obr. 3. Příklad měření tvorby částic při reakci α -pinenu s ozonem během měření v komoře pomocí C-ToF-AMS

Podobným přístrojem jako jsou AMS a ACSM, je hmotnostní spektrometr s přenosem protonů a analyzátozem doby letu (PTR-ToF-MS). Ten se využívá k analýze těkavých organických uhlovodíků, které jsou v atmosféře přítomny v plynné fázi a řada z nich figuruje jako prekurzory OA (cit.⁷⁰). Výsledky získané z PTR-ToF-MS a z AMS/ACSM lze zkombinovat, a to např. při určování zdrojů OA a jejich prekurzorů metodou PMF (cit.⁷¹) nebo při studiu mezifázových procesů v atmosféře. Výsledky z AMS/ACSM mohou být rovněž doplněny o koncentrace vybraných kovů⁷². Z takto kombinované matice OA a kovů lze rovněž vypočítat výsledky PMF (cit.⁷³), které mohou vést k přesnějšímu určení zdrojů aerosolů v ovzduší.

3. Závěry

Aerosolový hmotnostní spektrometr je využíván jako velice účinný nástroj poskytující unikátní informace o komplexních vlastnostech aerosolových částic. V posledních letech dochází k rychlému rozvoji této metody a nově vyvinuté přístroje již dokáží rozlišovat hmotnostní spektrum aerosolů opravdu detailně. Určitou výzvou stále zůstává analýza chemického složení částic v rozmezí od velikosti aerosolových nanoklastrů⁷⁴ (částice o velikosti pod 10 nm) do 50 nm, což je oblast zajímavá z hlediska tvorby nových částic v atmosféře. Druhý přístup vývoje

analyzátorů se zaměřil na miniaturizaci těchto přístrojů, která vedla k vývoji jednodušších aerosolových hmotnostních monitorů. Díky tomu dochází k výraznějšímu rozšíření takovýchto on-line spektrometrů chemického složení aerosolů a vytváření monitorovacích sítí. Příkladem takového měřicí sítě je evropská výzkumná infrastruktura ACTRIS (cit.⁷⁵). V té je zapojeno již 22 států Evropy a jejími cíli jsou mj. sjednocení postupu měření jednotlivých složek atmosféry a sdílení získaných dat s vědeckou i laickou veřejností.

Článek byl připraven s finanční podporou Technologické agentury České republiky (TACR) v rámci projektu SS 02030031 ARAMIS.

Seznam zkratk

ACSM	monitorovací aerosolový hmotnostní spektrometr (Aerosol Chemical Speciation Monitor)
AMS	aerosolový hmotnostní spektrometr (Aerosol Mass Spectrometer)
CDCE	účinnost záchytu závislá na chemickém složení (Composition Dependent Collection Efficiency)
CE	účinnost záchytu (Collection Efficiency)
C-ToF AMS	aerosolový hmotnostní spektrometr

- s kompaktním analyzátozem doby letu (Compact Time of Flight Aerosol Mass Spectrometer)
- EC elementární uhlík (Elementar Carbon)
- EI elektronová ionizace (Electron Ionization)
- HR-ToF AMS aerosolový hmotnostní spektrometr s vysokorozlišovacím detektorem (High-Resolution Time of Flight Aerosol Mass Spectrometer)
- IE ionizační účinnost (Ionization Efficiency)
- LToF-AMS aerosolový hmotnostní spektrometr s dlouhým analyzátozem doby letu (Long Time of Flight Aerosol Mass Spectrometer)
- OA organický aerosol (Organic Aerosol)
- PMF pozitivní maticová faktorizace (Positive Matrix Factorization)
- PToF doba letu částic (Particle Time of Flight)
- PTR-ToF-MS hmotnostní spektrometr s přenosem protonů a analyzátozem doby letu (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry)
- Q-ACSM monitorovací aerosolový hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým detektorem (Quadrupole Aerosol Chemical Speciation Monitor)
- Q-AMS aerosolový hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým detektorem (Quadrupole Aerosol Mass Spectrometer)
- ToF-ACSM monitorovací aerosolový hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu (Time of Flight Aerosol Chemical Speciation Monitor)
- ToF-ACSM-X monitorovací aerosolový hmotnostní spektrometr s vylepšeným rozlišením (Time of Flight Aerosol Chemical Speciation Monitor with eXtended Resolution)
- LITERATURA
- Jayne J. T., Leard D. C., Zhang X., Davidovits P., Smith K. A., Kolb C. E., Worsnop D. R.: *Aerosol Sci. Technol.* **33**, 49 (2000).
 - Hinds W. C.: *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*. Wiley, New York 1999.
 - Novotný V., Lhotka R., Holubová Šmejkalová A., Vodička P.: *Vesmír* **101**, 244 (2022).
 - Sram R. J. a 11 spoluautorů: *Int. J. Hyg. Environ. Health* **216**, 533 (2013).
 - Kozáková J., Pokorná P., Vodička P., Ondráčková L., Ondráček J., Křůmal K., Mikuška P., Hovorka J., Moravec P., Schwarz J.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 1675 (2019).
 - Spracklen D. V., Bonn B., Carslaw K. S.: *Philos. Trans. R. Soc., A* **366**, 4613 (2008).
 - Middlebrook A. M. a 16 spoluautorů: *J. Geophys. Res.: Atmos.* **108**, (2003), doi: 10.1029/2001JD000660.
 - Drewnick F.: *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2127 (2012).
 - Drewnick F. a 10 spoluautorů: *Aerosol Sci. Technol.* **39**, 637 (2005).
 - DeCarlo P. F. a 11 spoluautorů: *Anal. Chem.* **78**, 8281 (2006).
 - Graeffe F. a 13 spoluautorů: *ACS Earth Sp. Chem.* **7**, 230 (2023).
 - Ng N. L. a 10 spoluautorů: *Aerosol Sci. Technol.* **45**, 780 (2011).
 - Fröhlich R. a 11 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* **6**, 3225 (2013).
 - Aerodyne Research – *TOF-ACSM-X*: <https://aerodyne.com/wp-content/uploads/2023/09/TOF-ACSM-X.pdf>, staženo 30. 1. 2024.
 - Ovadnevaite J., Ceburnis D., Canagaratna M., Berresheim H., Bialek J., Martucci G., Worsnop D. R., O'Dowd C.: *J. Geophys. Res.: Atmos.* **117**, (2012), doi: 10.1029/2011JD017379.
 - Onasch T. B., Trimborn A., Fortner E. C., Jayne J. T., Kok G. L., Williams L. R., Davidovits P., Worsnop D. R.: *Aerosol Sci. Technol.* **46**, 804 (2012).
 - Vodička P., Schwarz J.: *Chem. Listy* **111**, 354 (2017).
 - Drinovec L. a 10 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* **8**, 1965 (2015).
 - Zhang X., Smith K. A., Worsnop D. R., Jimenez J. L., Jayne J. T., Kolb C. E., Morris J., Davidovits P.: *Aerosol Sci. Technol.* **38**, 619 (2004).
 - Williams L. R. a 20 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* **6**, 3271 (2013).
 - Zhang Y. a 13 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* **17**, 14501 (2017).
 - Canagaratna M. R. a 17 spoluautorů: *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 185 (2007).
 - Allan J. D. a 11 spoluautorů: *J. Aerosol Sci.* **35**, 909 (2004).
 - Shu J., Gao S., Li Y.: *Aerosol Sci. Technol.* **42**, 110 (2008).
 - Northway M. J. a 10 spoluautorů: *Aerosol Sci. Technol.* **41**, 828 (2007).
 - Aljawhary D., Lee A. K. Y., Abbatt J. P. D.: *Atmos. Meas. Tech.* **6**, 3211 (2013).
 - Jokinen T., Sipilä M., Junninen H., Ehn M., Lönn G., Hakala J., Petäjä T., Mauldin R. L., Kulmala M., Worsnop D. R.: *Atmos. Chem. Phys.* **12**, 4117 (2012).
 - Jimenez J. L. a 11 spoluautorů: *J. Geophys. Res.: Atmos.* **108**, (2003), doi: 10.1029/2002JD002452.
 - Huffman J. A., Jayne J. T., Drewnick F., Aiken A. C., Onasch T., Worsnop D. R., Jimenez J. L.: *Aerosol Sci. Technol.* **39**, 1143 (2005).
 - Middlebrook A. M., Bahreini R., Jimenez J. L., Canagaratna M. R.: *Aerosol Sci. Technol.* **46**, 258 (2012).
 - Sueper D.: https://cires1.colorado.edu/jimenez-group/wiki/index.php/ToF-AMS_Analysis_Software, staženo 30. 1. 2024.
 - Tobler A. K., Skiba A., Wang D. S., Croteau P., Styszko K., Necki J., Baltensperger U., Slowik J. G., Prévôt A. S. H.: *Atmos. Meas. Tech.* **13**, 5293 (2020).

33. Dzepina K., Arey J., Marr L. C., Worsnop D. R., Salcedo D., Zhang Q., Onasch T. B., Molina L. T., Molina M. J., Jimenez J. L.: *Int. J. Mass Spectrom.* 263, 152 (2007).
34. Kubelová L., Vodička P., Schwarz J., Cusack M., Makeš O., Ondráček J., Ždímal V.: *Atmos. Environ.* 118, 45 (2015).
35. Pokorná P., Zíková N., Vodička P., Lhotka R., Mben-gue S., Holubová Šmejkalová A., Riffault V., Ondráček J., Schwarz J., Ždímal V.: *Atmos. Chem. Phys.* 22, 5829 (2022).
36. Jensen L. N., Canagaratna M. R., Kristensen K., Quéléver L. L. J., Rosati B., Teiwes R., Glasius M., Pedersen H. B., Ehn M., Bilde M.: *Atmos. Chem. Phys.* 21, 11545 (2021).
37. Chhabra P. S., Ng N. L., Canagaratna M. R., Corrigan A. L., Russell L. M., Worsnop D. R., Flagan R. C., Seinfeld J. H.: *Atmos. Chem. Phys.* 11, 8827 (2011).
38. Zhao D. a 14 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 18, 1611 (2018).
39. Giordano M. R., Kalnajs L. E., Avery A., Douglas Goetz J., Davis S. M., DeCarlo P. F.: *Atmos. Chem. Phys.* 17, 1 (2017).
40. He L. Y., Huang X. F., Xue L., Hu M., Lin Y., Zheng J., Zhang R., Zhang Y. H.: *J. Geophys. Res.: Atmos.* 116, (2011), doi: 10.1029/2010JD014566.
41. Xie C. a 19 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 19, 16 (2019).
42. Farmer D. K., Kimmel J. R., Phillips G., Docherty K. S., Worsnop D. R., Sueper D., Nemitz E., Jimenez J. L.: *Atmos. Meas. Tech.* 4, 1275 (2011).
43. Capes G., Johnson B., McFiggans G., Williams P. I., Haywood J., Coe H.: *J. Geophys. Res.: Atmos.* 113, D00C15 (2008).
44. DeCarlo P. F. a 17 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 8, 4027 (2008).
45. Boreddy S. K. R., Nair V. S., Babu S. S.: *Sci. Total Environ.* 901, 166461 (2023).
46. Kolb C. E., Herndon S. C., McManus J. B., Shorter J. H., Zahniser M. S., Nelson D. D., Jayne J. T., Canagaratna M. R., Worsnop D. R.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 5694 (2004).
47. Kimmel J. R., Farmer D. K., Cubison M. J., Sueper D., Tanner C., Nemitz E., Worsnop D. R., Gonin M., Jimenez J. L.: *Int. J. Mass Spectrom.* 303, 15 (2011).
48. Talbot N., Kubelova L., Makes O., Cusack M., Ondracek J., Vodička P., Schwarz J., Zdimal V.: *Atmos. Environ.* 131, 171 (2016).
49. Talbot N., Kubelová L., Makeš O., Ondráček J., Cusack M., Schwarz J., Vodička P., Zíková N., Ždímal V.: *Aerosol Air Qual. Res.* 17, 653 (2017).
50. Schwarz J., Makeš O., Ondráček J., Cusack M., Talbot N., Vodička P., Kubelová L., Ždímal V.: *Environ. Sci. Technol.* 51, 5907 (2017).
51. Yazdani A., Dudani N., Takahama S., Bertrand A., Prévôt A. S. H., El Haddad I., Dillner A. M.: *Atmos. Chem. Phys.* 21, 10273 (2021).
52. Daellenbach K. R. a 16 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* 9, 23 (2016).
53. Zhou R., Chen Q., Chen J., Ren L., Deng Y., Vodička P., Deshmukh D. K., Kawamura K., Fu P., Mochida M.: *Environ. Sci. Technol.* 55, 4494 (2021).
54. Resch J., Wolfer K., Barth A., Kalberer M.: *Atmos. Chem. Phys.* 23, 9161 (2023).
55. Bressi M. a 56 spoluautorů: *Atmos. Environ.: X* 10, 100108 (2021).
56. Ulbrich I. M., Canagaratna M. R., Cubison M. J., Zhang Q., Ng N. L., Aiken A. C., Jimenez J. L.: *Atmos. Meas. Tech.* 5, 195 (2012).
57. Lanz V. A., Alfarra M. R., Baltensperger U., Buchmann B., Hueglin C., Prévôt A. S. H.: *Atmos. Chem. Phys.* 7, 1503 (2007).
58. Paatero P.: *J. Comput. Graph. Stat.* 8, 854 (1999).
59. Chen G. a 12 spoluautorů: *Environ. Sci. Technol.* 56, 15290 (2022).
60. Chen G. a 69 spoluautorů: *Environ. Int.* 166, 107325 (2022).
61. Canonaco F. a 12 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* 14, 923 (2021).
62. Pöhlker M. a 23 spoluautorů: *Nat. Commun.* 14, 6139 (2023).
63. Kuwata M., Zorn S. R., Martin S. T.: *Environ. Sci. Technol.* 46, 787 (2012).
64. Ehn M. a 32 spoluautorů: *Nature* 506, 476 (2014).
65. Xu W. a 20 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 19, 10205 (2019).
66. Ng N. L. a 19 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 10, 4625 (2010).
67. Canagaratna M. R. a 14 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 15, 253 (2015).
68. Cubison M. J. a 20 spoluautorů: *Atmos. Chem. Phys.* 11, 12049 (2011).
69. Chen P., Li Y., Zhang Y., Xue C., Hopke P. K., Li X.: *Environ. Sci. Technol.* 57, 15193 (2023).
70. Yuan B., Koss A. R., Warneke C., Coggon M., Sekimoto K., De Gouw J. A.: *Chem. Rev.* 117, 13187 (2017).
71. Song J., Saathoff H., Jiang F., Gao L., Zhang H., Leisner T.: *Egusphere* [preprint], 1 (2023). <https://doi.org/10.5194/egusphere-2023-2255>.
72. Tremper A. H. a 11 spoluautorů: *Atmos. Meas. Tech.* 11, 3541 (2018).
73. Belis C. A., Pikridas M., Lucarelli F., Petralia E., Cavalli F., Calzolari G., Berico M., Sciare J.: *Atmos. Environ.: X* 3, 100046 (2019).
74. Fárník M.: *J. Phys. Chem. Lett.* 14, 287 (2023).
75. ACTRIS: <https://www.actris.eu/> a česká odnož na <https://actris.cz/>, staženo 30. 1. 2024.

R. Lhotka^{a,b} and P. Vodička^a (*^aInstitute of Chemical Process Fundamentals, CAS, Prague, Czech Republic, ^bInstitute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*);
Aerosol Mass Spectrometry

Mass spectrometry is widely used in various scientific fields. In atmospheric chemistry, there has been a long call for a detailed on-line analysis of the chemical composition of aerosol particles (i.e., particles in the solid or liquid state) in the atmosphere resulting in the development of the so-called aerosol mass spectrometers in the past 20 years. These instruments allow the measurement of the chemical composition of particles with sizes of ca. 50–800 nm, typically at minute resolution. Their development and possible applications are discussed in this review.

Keywords: aerosols, mass spectrometry, atmosphere, organic aerosol, environmental analysis

Acknowledgement

This paper has been partly supported by the Technological Agency of the Czech Republic (TAČR), joint grant no. SS 02030031 ARAMIS.



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

LIPIDIZACE JAKO NÁSTROJ PRO VÝVOJ PEPTIDOVÝCH LÉČIV

ANETA MYŠKOVÁ^{a,b}, DAVID SÝKORA^a, JAROSLAV KUNES^{b,c} a LENKA MALETÍNSKÁ^b

^a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha, ^b Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 542/2, 166 10 Praha 6, ^c Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Videňská 1083, 142 20 Praha, Česká republika
david.sykora@vscht.cz

Došlo 8.12.23, přijato 11.3.24.

Význam peptidových terapeutik v posledních letech neustále roste. Peptidy jako potenciální léčiva mají mnoho příznivých chemických a farmakologických vlastností, počínaje jejich velkou rozmanitostí a konče vysokou afinitou k různým druhům přirozených receptorů. Přes tyto a další přínosy však mají i své nevýhody. Mají omezenou stabilitu v organismu v důsledku rychlé degradace a vylučování. Pro dosažení co nejlepšího farmakologického účinku je žádoucí hledat vhodné způsoby modifikace peptidů vedoucí k jejich vyšší stabilitě bez ztráty afinity k příslušným receptorům. Existuje mnoho různých způsobů modifikace peptidů. V této práci jsou shrnuty v současnosti používané syntetické přístupy potenciálně vedoucí ke zlepšení klíčových vlastností peptidů v roli nových perspektivních léčiv se zaměřením na lipidizaci. Tato práce zároveň nabízí přehled lipidizovaných peptidových léčiv, které jsou momentálně dostupné na trhu.

Klíčová slova: peptidová terapeutika, modifikace struktury peptidu, lipidizace

Obsah

1. Úvod
2. Způsoby stabilizace peptidů
3. Lipidizace
4. Farmakologické vlastnosti lipidizovaných peptidů
5. Komerčně dostupné lipopeptidy
6. Závěr

1. Úvod

Zájem o peptidy jako potenciální terapeutika různých typů onemocnění stále roste. Přírodní nebo syntetické peptidy a jejich analoga vykazují slibné farmakologické vlastnosti a jedinečné výhody oproti jiným léčivům. Nabízí především velkou rozmanitost struktur, vysokou selektivitu a afinitu k receptorům. Navíc degradační produkty peptidů jsou pro organismus neškodné. Peptidy nachází terapeutické využití u onemocnění, jako jsou např. metabolické poruchy, různé druhy rakovin, záněty, mikrobiální infekce, imunitní dysfunkce či hypertenze^{1,2}. Navzdory svému potenciálu se léčiva na bázi peptidů potýkají také s problémy, především s jejich nedostatečnou stabilitou v organismu. Většina z nich je eliminována během několika minut, což ve svém důsledku vyžaduje podání vyšší dávky v kratších časových intervalech. Tato skutečnost vede k větší zátěži pacienta a zvýšení nákladů léčby. Peptidy také obtížně pronikají hematoencefalickou bariérou

(BBB). V případě peptidů regulujících příjem potravy je nezbytný jejich průchod do mozku, konkrétně do místa regulace příjmu potravy, které je lokalizováno především v hypothalamu. Pro dosažení požadovaného efektu v organismu je proto nutné jejich strukturu vhodně chemicky modifikovat. Naše experimenty ukázaly, že anorexigenní peptidy mají potenciál při léčbě obezity, ale bez příslušné modifikace nemohou projít přes BBB. Lipidizace, jako jedna z možných modifikací, zvyšuje stabilitu, prodlužuje dobu účinku a usnadňuje průchod BBB (cit.³⁻⁶). V posledních letech byly na téma lipidizace vytvořeny následující publikace^{3,7-9}.

Tento článek shrnuje možné modifikace peptidů s cílem zlepšení jejich stability a farmakologických vlastností. Zvláštní důraz je kladen na lipidizaci.

2. Způsoby peptidové stabilizace

Stabilizaci peptidů lze provádět různými způsoby. V následující kapitole jsou uvedeny nejvýznamnější modifikace, které je možné za tímto účelem na peptidovém řetězci provádět.

Pojem PEGylace představuje modifikaci molekuly, ať už nepeptidové, peptidové nebo proteinové, která spočívá v připojení jednoho nebo více polyethylenglykolových (PEG) řetězců k její původní struktuře. PEG je polymer známý svou nízkou toxicitou a není imunogenní. PEGylace zvyšuje stabilitu léčiva, snižuje proteolýzu a omezuje

vyučování ledvinami tím, že zvětšuje molekulovou hmotnost originální látky. Jedná se o modifikaci schválenou úřadem Food and Drug Administration (FDA) pro kontrolu léčiv, potravin a kosmetiky. Úřad FDA schválil PEG pro injekční, lokální, rektální a nosní formulace^{10,11}. Příkladem již schváleného PEGylovaného léčiva je peginesatid (Omontys)¹².

Glykosylace spočívá v připojení sacharidové jednotky (sacharidových částí) k peptidu/proteinu. Tento proces zvyšuje biologickou dostupnost, mění farmakokinetický profil a zlepšuje farmakodynamické vlastnosti. Glykosylace prodlužuje trvání účinku léčiva tím, že zlepšuje absorpci, distribuci a stabilitu a zároveň snižuje renální clearanci. Glykosylované peptidy jsou navíc odolné vůči proteolýze^{13,14}.

Přírodní peptidy/proteiny jsou prakticky výhradně tvořeny L-aminokyselinami. Nicméně D-aminokyseliny (tzv. nekódující aminokyseliny), které se liší stereochemií, mají určité výhody, mezi které patří vyšší stabilita a odolnost vůči enzymové degradaci. Výměna L-aminokyselin za D-aminokyseliny vedla v mnoha studiích ke zvýšení stability peptidů, prodloužení poločasu rozpadu a snížení cytotoxicity při zachování biologické aktivity^{15,16}. Významným příkladem této modifikace je molekula desmopresinu (DDAVP, 1-deamino-8-D-arginin-vasopresin), syntetického analogu vasopresinu¹⁷. Ve struktuře desmopresinu je oproti vasopresinu první aminokyselina deaminována a v poloze osm je L-arginin zaměněn D-argininem. DDAVP byl původně schválen pro léčbu diabetu insipidu. DDAVP se nyní pod komerčním názvem Minirin podává intranasálně. Od svého prvního klinického použití v roce 1977 našel DDAVP uplatnění také při léčbě hemofilie nebo Willebrandova syndromu^{18,19}.

Pro zvýšení stability peptidů a zabránění jejich degradaci je další účinnou strategií substituce a přidávání aminokyselin. Maletínská a spol.⁵ nahradili v peptidu uvolňujícím prolaktin (PrRP) v poloze 8 methionin za norleucin, a tím zabránili rychlé oxidaci. Je pozoruhodné, že tato změna aminokyselin neměla žádný vliv na biologickou aktivitu peptidu. Například u stabilního analogu anorexigenního neuropeptidu FF, zvaného 1DMe, je provedeno více modifikací zároveň. Jedná se o substituci L-fenylalaninu v pozici 1 za D-tyrosin a dále byla provedena N-methylace třetí peptidové vazby^{5,20,21}.

N-Methylace spočívá v nahrazení přirozené aminokyseliny N-methyl aminokyselinou. N-Methylace významně zlepšuje farmakologické vlastnosti, jako je biodostupnost po perorálním podání, odolnost vůči enzymatické degradaci a poskytuje lepší stabilitu vůči degradačním enzymům^{22,23}. N-Methylace peptidů má však i své nevýhody, mezi které patří zejména zhoršení afinity některých N-methylovaných peptidů k přirozeným receptorům²⁴.

Poměrně jednoduchá metoda pro zvýšení stability peptidů spočívá v kovalentní cyklizaci peptidů. Nejčastěji se jedná o propojení N- a C-konců peptidu nebo jeho specifických úseků. Tím se vytvoří cyklizovaný hlavní řetězec, případně lze cyklizovat i řetězce postranní. Tato modifikace zvyšuje zejména odolnost vůči proteolytické degradaci^{25–27}.

Inovativní techniky stabilizace peptidů zahrnují také koloidní systémy využívající nanočástice nebo mikročástice. Tyto systémy jsou navrženy tak, aby zapouzdřovaly a chránily peptidy a zároveň napomáhaly jejich cílenému směrování. Částice, které se obvykle využívají pro tyto účely, jsou nejčastěji tvořeny polysacharidy, minerálními oleji nebo lipidy²⁸. Nicméně i polymerní nanočástice hrají důležitou roli při modifikaci peptidových léčiv. Umožňují postupné uvolňování peptidu v průběhu dlouhého časového horizontu, čímž snižují frekvenci dávkování. Enkapsulované peptidy jsou příslibem vyšší terapeutické účinnosti, prodloužené stability a lepší biologické dostupnosti²⁹.

PASylace zahrnuje spojení peptidů a proteinů s hydrofilním polymerem sestávajícím z aminokyselin prolinu, alaninu a/nebo serinu (PAS). Tyto PAS sekvence mají nenabitou, náhodnou spirálovou strukturu, která má hydrofilní vlastnosti. Tato modifikace, podobně jako PEGylace, zvyšuje hydrodynamický objem původní látky, a tím zpomaluje vylučování konjugátu z organismu^{30,31}. PASylované peptidy vykazují vysokou stabilitu v plazmě a nejsou imunogenní³².

Mezi peptidové modifikace vedoucí ke stabilizaci a zlepšení farmakologických vlastností patří i tzv. peptidový stapling. Stapling spočívá ve spojení dvou aminokyselin téhož peptidu, které vytvoří můstek a stabilizují tak helikální strukturu řetězce. Počet těchto můstků není v jedné molekule omezen, naopak u delších peptidů se běžně využívá propojení více aminokyselin, které vytvoří až tři můstky. Propojované aminokyseliny musí být od sebe vzdáleny minimálně o čtyři aminokyselinové jednotky. Peptidy s těmito můstky vykazují významně delší poločas rozpadu³³.

Poslední a velmi důležitou modifikací peptidových léčiv je lipidizace.

3. Lipidizace

Přibližně před třiceti lety bylo publikováno provedení tzv. lipidizace peptidu za účelem zvýšení stability léčiv na bázi peptidů/proteinů³⁴. Lipidizace zahrnuje připojení vhodné lipidové skupiny k peptidu a takto vzniklé produkty se nazývají lipopeptidy. Příkladem přirozeně lipidizovaného peptidu je ghrelin. Ghrelin se syntetizuje v žaludku a je jedinečný svým centrálním působením se silným orexigenním účinkem. Struktura ghreluinu zahrnuje serin acylovaný kyselinou oktanovou, která má zásadní význam pro jeho biologickou aktivitu^{35,36}.

Lipidizace zahrnuje celou řadu různých modifikací, jako je prenylace cysteinu (např. S-geranylgeranylové lipidy), acylace mastnými kyselinami na N-konci nebo postranní skupině aminokyselin (N-palmitoyl, O-palmitoyl, N-myristoyl lipidy), zavedení molekuly cholesterolu, glykosylfosfatidylinositolu (GPI) nebo fosfatidylethanolaminu (PE) do struktury peptidu připojením na C-konec. Tyto modifikace mění původně hydrofilní strukturu na lipofilní. Lipidizace tak může usnadnit průchod modifikovaných

peptidů přes BBB a řadí se mezi peptidové úpravy schválené FDA (cit.^{3,37,38}).

Prenylace je posttranslační modifikace, při níž dojde ke kovalentnímu připojení isoprenové jednotky, nejčastěji na cysteinu (Cys), v blízkosti C-konce proteinu. Tyto jednotky se vážou prostřednictvím thioetherové vazby. Prenylaci lze dále dělit na geranylaci (10 uhlíků, dvě isoprenové jednotky), farnesylaci (15 uhlíků, tři isoprenové jednotky) a geranylgeranylaci (20 uhlíků, čtyři isoprenové jednotky). Nejčastější využívanou vazbou k připojení cysteinového zbytku je thioetherová vazba zprostředkovaná sírou. K navázání na peptid může dojít také v menší míře prostřednictvím atomu kyslíku nebo dusíku. Prenylace poskytuje peptidu lipofilní C-konec, což zvyšuje jeho možnost interakce s buněčnými membránami³⁷. Prenylací peptidů se významně mění jejich farmakologické vlastnosti a často vykazují lepší biologické vlastnosti, což je podnětem k jejich studiu pro potenciální léčebné využití³⁹.

Dalším typem lipidizace je glypiace, při které se k peptidu připojuje glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva. Jedná se o poměrně běžnou posttranslační modifikaci, která se vyskytuje na C-konci peptidů/proteinů. Proces tvorby zahrnuje signální peptid GPI, při kterém se odštěpí C-konec původního proteinu. Nově vzniklý C-konec se pak spojí s aminoskupinou ethanolaminového zbytku v prekurzoru GPI (cit.^{37,40}). Tato forma lipidizace se obvykle přirozeně vyskytuje v buňkách, konkrétně v endoplazmatickém retikulu. Navzdory jeho přirozenému širokému využití v organismu je laboratorní syntéza proteinů s kotvou GPI velmi komplikovaná⁴¹.

Lipidizace může být také zprostředkována PE kotvou. Jedná se o posttranslační modifikaci, která vzniká kovalentním spojením C-terminálního glycinu na peptidu s aminoskupinou PE pomocí amidové vazby. Tento typ lipidizace je poměrně vzácný a není příliš dobře prozkoumán⁴².

Dalším typem lipidizace je připojení cholesterolu k peptidu. Cholesterol lze k peptidu připojit pomocí esterové či thioesterové vazby, která může být provedena na N-konci, C-konci nebo kdekoli na peptidovém řetězci³⁷.

Nicméně vůbec nejrozšířenější, často nejvýhodnější a nejjednodušší (z pohledu syntézy) formou lipidizace je acylace peptidu mastnými kyselinami. Tato modifikace spočívá v kovalentním připojení různých mastných kyselin k peptidům/proteinům. Rozdíly v délce mastných kyselin vedou k odlišným biochemickým vlastnostem výsledného lipopeptidu. Běžně se používají mastné kyseliny jako kyselina kaprylová (C8), myristová (C14), palmitová (C16) a stearová (C18), přičemž převažují zejména kyseliny myristová a palmitová^{43,44}. Výběr mastné kyseliny, typ vazby spojující mastnou kyselinu s peptidem nebo použití spojky mezi mastnou kyselinou a peptidem významně ovlivňuje finální lipopeptid. Mezi vlastnostmi, které jsou nejvíce změněny, patří vazebná afinita k receptorům a bioaktivita. Lipidizace zahrnuje tři různé typy tvorby lipidových vazeb, amidaci, esterifikaci a S-vazbu (thioetherovou nebo disulfidovou). Zatímco některé z tak-

to vzniklých vazeb jsou velmi robustní, jiné jsou jen omezeně stabilní⁴⁵.

Lipidizace bývá někdy provedena s pomocí spojek, tzv. linkerů mezi lipidovou a peptidovou částí molekuly. Široce používanou spojkou je např. γ -glutamové raménko odvozené od kyseliny glutamové²⁰. Tato spojka může být umístěna na koncích, ale i prakticky kdekoli v struktuře peptidu, často se váže na lysin prostřednictvím sekundární aminoskupiny⁴⁶.

Jiná spojka využívá krátký modifikovaný PEG řetězec (1,13-diamino-4,7,10-trioxadekan-sukcinamová kyselina) a je známá jako tzv. TTDS spojka, obvykle připojená k lysinu²⁰. Byly zkoumány a použity i další spojky pro potenciální použití při lipidizaci peptidů, mimo jiné také kyselina γ -aminomáselná (GABA) nebo spojka v podobě kyseliny 8-amino-3,6-dioxaktanové⁴⁷.

4. Farmakologické vlastnosti lipidizovaných peptidů

Lipidizace výrazně zvyšuje stabilitu peptidů a zlepšuje jejich biologické vlastnosti, což zahrnuje zvýšenou biologickou dostupnost a také možnost inovativních metod podání léčiva.

Lipidizace mění povahu peptidu ve směru zvýšené hydrofobicity, což podporuje silnější vazbu na sérový albumin. Tato interakce napomáhá transportu modifikovaného peptidu do cílových tkání a prodlužuje jeho dobu setrvání v organismu⁴⁸. Délka řetězce mastné kyseliny lipopeptidu významně ovlivňuje vazbu lipopeptidu na albumin. Platí, že čím delší je zbytek navázané mastné kyseliny na peptid, tím je silnější vazba lipopeptidu na sérový albumin. Platí přitom, že lipidizace může být provedena na různých místech peptidového řetězce, aniž by to ovlivnilo vazbu na albumin. Experimentálně bylo ale prokázáno, že aplikace dvou řetězců mastných kyselin na jednom řetězci peptidu může vést ke zdatelné ztrátě biologické účinnosti^{3,49}. Příkladem komerčně velmi úspěšného lipopeptidu s prodlouženým poločasem je liraglutid (Victoza pro léčbu diabetu mellitu 2. typu (T2DM), Saxenda pro léčbu obezity, oboje Novo Nordisk), který má oproti výchozímu nelipidizovanému peptidu GLP-1 biologický poločas několik hodin na rozdíl od minut (cit.⁵⁰).

Obecně léčiva na bázi peptidů leckdy vyvolávají imunitní reakci, a to i ta, která jsou strukturně podobná přírodním lidským peptidům. Výzkum v této oblasti ale ukazuje, že právě lipidizace je účinnou strategií ke snížení imunogenity. Délka připojené mastné kyseliny se ukazuje jako klíčová, protože čím je delší mastná kyselina, tím výraznější bývá snížení uvedeného nežádoucího účinku^{8,50}.

V posledních letech je velká pozornost věnována neuropeptidům, jako je PrRP, peptid CART (kokainem a amfetaminem regulovaný transkript), a zejména agonistům glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1), které jsou zamýšleny k léčbě obezity, T2DM a neurodegenerace^{51,52}. Jako slibné látky se jeví také duální agonisté GLP-1/GIP

a trojití agonisté GLP-1/GIP/glukagonu. Tyto látky jsou zkoumány jako potenciální léčiva v léčbě diabetu mellitu 1. typu (T1DM) a u pacientů s nadváhou/obezitou⁵³. Nicméně přirozené peptidy nemají schopnost procházet přes BBB a následně ovlivňovat mozkové receptory. Lipidizace tuto překážku překonává a umožňuje dosažení centrálních účinků po periferním podání⁵⁴. Například palmitovaný analog PrRP31 (palm¹¹-PrRP31) vykazoval na modelech hlodavců snížení příjmu potravy s následným snížením tělesné hmotnosti. Lipidizace napomáhá peptidům procházet fyziologickými membránami, čímž zvyšuje jejich terapeutický potenciál⁵⁵.

Při používání léčiv na bázi peptidů je dalším častým problémem nízká biologická dostupnost, což je zásadní farmakologická vlastnost, která je neodmyslitelně spjata se způsobem podání. Intravenózní (i.v.) podání poskytuje 100% biologickou dostupnost, zatímco alternativní cesty vedou k jejímu snížení. Lipidizace prokázala schopnost zvýšit biologickou dostupnost, a dokonce zvýšit biologickou dostupnost v centrálním nervovém systému (CNS) po intraperitoneálním podání⁵⁶. Wang a spol. poukázali na další případ zvýšené biologické dostupnosti, kdy lipidizovaný peptid dosáhl čtyřnásobně vyšší biologické dostupnosti při subkutánním podání ve srovnání se svým nemodifikovaným analogem⁵⁷.

5. Komerčně dostupné lipopeptidy

Tato kapitola popisuje lipidizované peptidy, které jsou momentálně dostupné na trhu. Tabulka I shrnuje tyto látky a uvádí jejich použití a formu, v jaké jsou podávány.

Tabulka I
Aktuálně dostupná schválená lipopeptidová terapeutika

Látka	Typ modifikace	Původní molekula	Indikace	Cesta podání	Lit.
Liraglutid	acylace	GLP-1	T2DM obezita	s.c. injekce s.c. injekce	74,75 56
Semaglutid	acylace	GLP-1	T2DM obezita	s.c. injekce/orální tablety s.c. injekce	60,76
Detemir	acylace	insulin	diabetes	s.c. injekce	64
Degludec	acylace	insulin	diabetes	s.c. injekce	77
Xultophy	acylace	insulin + GLP-1	T2DM	s.c. injekce	78
Somapacitan	acylace	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	s.c. injekce	79
Tesamorelin	acylace	lidský hormon vylučující růstový hormon	lipodystrofie způsobená virem HIV	s.c. injekce	80
Tirzepatide	acylace	GLP-1/GIP	T2DM	s.c. injekce	70
Mifamurtid	PE kotva + acylace	muramyl-dipeptid	osteosarkom	i.v. injekce	81
Polymyxin B	acylace		bakteriální infekce	i.v. injekce/inhalace/topické	82
Daptomycin	acylace		bakteriální infekce	i.v. injekce	83

Liraglutid (Saxenda, Novo Nordisk) je agonistou receptoru peptidu podobného glukagonu-1 (GLP-1), který byl objeven při studiích GLP-1 analogů, které by měly delší poločas rozpadu ve srovnání s přirozeným GLP-1 (2 min)⁵⁸. Struktura liraglutidu má 97% homologii s přirozeným GLP-1. Tyto dva peptidy se liší v aminokyselině na pozici 34, kde je ve struktuře liraglutidu nahrazen lysin za arginin. Liraglutid je lipidizován na pozici 26 kyselinou palmitovou pomocí γ -glutamového raménka. Tyto modifikace vedou k prodloužení poločasu rozpadu na 13 h (v případě s.c. podání). Původně byl liraglutid vyvinut k léčbě T2DM, kdy byl v roce 2010 schválen FDA jako terapeutikum právě pro toto onemocnění. Po jeho zavedení však byly objeveny významné antiobezitní účinky a v roce 2013 byl liraglutid schválen FDA jako antiobezitikum⁵⁹. V obou případech je podáván pomocí injekčního pera⁵⁹.

Semaglutid (Ozempic, Wegovy nebo Rybelsus, Novo Nordisk) je podobně jako liraglutid agonistou receptoru přirozeného GLP-1. Semaglutid má 94% strukturní homologii s přirozeným GLP-1 a obsahuje celkem 3 významné modifikace, kterými jsou: výměna alaninu za kyselinu 2-aminomáselnou v pozici 8, výměna lysinu za arginin v pozici 34 a připojení palmitové kyseliny v pozici 26 pomocí γ -glutamového raménka⁶⁰. Výhodou semaglutidu je jeho prodloužený poločas rozpadu v porovnání s liraglutidem (183 h vs 11–15 h) po s.c. podání. Díky tomu je možné podávání semaglutidu jednou týdně, na rozdíl od liraglutidu, který je podáván jednou denně⁶¹. Primárně byl semaglutid schválen pro léčbu T2DM v podobě s.c. injekce (Ozempic). Následně byla vyvinuta nová formulace v podobě tablet. Tyto tablety obsahují

zesilovač absorpce přes žaludeční epitel a je možná administrace semaglutidu i orální formou (Rybelsus). Podobně jako u liraglutidu byly i v případě semaglutidu u pacientů pozorovány anti-obezitní účinky a semaglutid byl následně schválen FDA i jako antiobezitikum (Wegovy)⁶².

Insulin detemir je analogem přírodního insulínu a obsahuje dvě modifikace: odstranění threoninu v řetězci B na pozici 30 a acylaci pomocí myristové kyseliny na lysinu na pozici B29. Detemir má prodloužený poločas rozpadu ve srovnání s neutrálním Protamine Hagedorn (NPH) insulínem (Novolin N/ Humulin H, Novo Nordisk). Acylace poskytuje prodloužený farmakokinetický a farmakodynamický profil, což vede ke snížené fluktuaci koncentrace glukosy v krevní plasmě. Insulin Detemir byl schválen FDA v roce 2005 je využíván k léčbě T1DM a T2DM s využitím injekčního pera^{63,64}.

Insulin Degludec (Tresiba, Novo Nordisk) je dlouhodobě působícím analogem insulínu, u kterého je v pozici B30 odstraněn threonin a v pozici B29 je na lysin připojena kyselina palmitová. Insulin degludec byl schválen FDA v roce 2005 a je využíván pro léčbu T1DM a T2DM u dětí, dospívajících i dospělých. Díky dlouhému poločasu rozpadu je tento analog podáván pomocí injekčního pera jednou denně^{65,66}.

Na trhu je od roku 2016 také léčivo s názvem IDeg-Lira (Xultophy, Novo Nordisk). Jedná se o léčivý přípravek, který je kombinací fixního poměru bazálního insulínu, insulínu degludecu a liraglutidu. Běžné doporučené denní dávkování je 16 jednotek/ml IDegu a 0,6 mg liraglutidu, podáváno subkutánně pomocí dávkovacího pera. Xultophy lze užívat samostatně nebo v kombinaci s orálními anti-diabetiky⁶⁷.

K léčbě nedostatku růstového hormonu u dospělých a dětí se od roku 2020 využívá somapacitan (Sogroya, Novo Nordisk). Somapacitan je podáván do podkoží jednou týdně. Od přirozené struktury růstového hormonu se liší kromě připojení mastné kyseliny také výměnou jedné aminokyseliny. Tyto změny významně prodlužují poločas rozpadu somapacitanu⁶⁸.

Tesamorelin (Egrifta, Theratechnologies/EMD Serono) je dalším analogem růstového hormonu, který byl na trh uveden v roce 2010. Struktura tesamorelinu je tvořena 44 aminokyselinami a obsahuje zbytek kyseliny *trans*-3-hexenové, která je zodpovědná za prodloužený poločas rozpadu. Tesamorelin je využíván při léčbě HIV-infekčních pacientů podstupujících anti-retrovirovou terapii, u kterých má za úkol snižovat nadměrnou hladinu břišního viscerálního tuku a zlepšovat tělesné abnormality⁶⁹.

V roce 2022 byl na trh uveden Tirzepatide (Mounjaro, Eli Lilly) jako léčivo T2DM. Jedná se o duálního GLP-1/GIP agonistu, který se momentálně nachází také ve třetí fázi klinického testování pro léčbu selhání srdce, obezitu a kardiovaskulární potíže spojené s T2DM (cit.⁷⁰).

Při léčbě osteosarkomu se od roku 2009 společně s chemoterapií využívá léčivo mifamurtid (Mepact, Takeda), které je známé také jako lipozomální muramyl-tripeptid-fosfatidylethanolamin (L-MPT-PE). Schválení

mifamurtidu vedlo ke snížení počtu úmrtí pacientů s osteosarkomem o jednu třetinu. Struktura mifamurtidu obsahuje PE kotvu a dvě palmitové kyseliny, díky kterým je zvýšená lipofilicita molekuly a prodloužen poločas rozpadu⁷¹.

Metamycin (Pola Pharma), Polymyxin B (Fuji Yakuhin), Poly-RX (X-Gen) a mnoho dalších jsou komerčními názvy pro polymyxin B. Tento léčivý přípravek byl schválen původně v USA v roce 1964 a v Evropě je schválen od roku 2015 a to pouze pro topické podání. Lipopeptid polymyxin B je antibiotikum izolované z *Bacillus polymyxa*, jehož struktura obsahuje různé mastné kyseliny. Polymyxin B se využívá k léčbě infekcí renálního traktu či CNS (cit.⁷²).

Daptomycin (Cubicin, Pfizer) je lipopeptidové antibiotikum produkované bakterií *Streptomyces roseosporus*. Struktura daptomycinu obsahuje kyselinu oktanovou, která je připojena k *N*-koncové části peptidu. Tato látka se využívá k léčbě infekcí způsobených gram-pozitivními bakteriemi a byla schválena FDA v roce 2003 (cit.⁷³).

6. Závěr

Léčiva na bázi peptidů se stala slibnou skupinou chemických látek pro léčbu různých onemocnění, a to hlavně díky relativně snadné syntéze a dobré vazbě na důležité receptory. Nicméně navzdory těmto výhodám přírodní peptidy často trpí nízkou stabilitou *in vivo* a neprostupností přes buněčné membrány. Tato významná omezení ovšem lze překonat jejich vhodnou modifikací, jako je PEGylace, glykosylace, substituce aminokyselin, enkapsulace nanočásticemi, cyklizace, *N*-methylace a lipidizace. Uvedené modifikace často podstatně zlepšují farmakologické účinky peptidů. Lipidizace může být realizována mnoha způsoby, které byly výše diskutovány, nicméně v současnosti nejvyužívanější je acylace peptidů mastnými kyselinami. Takto modifikované lipopeptidy vykazují podstatně zvýšenou stabilitu v organismu a sníženou imunogenitu. V posledních letech došlo k výraznému pokroku ve vývoji peptidových léčiv. Cesty ke stabilizaci peptidů jsou stále rozmanitější, což z lipopeptidů činí velmi slibné kandidáty pro léčbu mnoha různých onemocnění. Díky jejich výhodným vlastnostem se již na trhu nachází řada lipopeptidů a mnoho dalších je v klinických či preklinických zkouškách.

Tato práce byla podpořena projekty RVO: 61388963 a RVO: 67985823 Akademie věd České republiky.

LITERATURA

- Ghatage T., Goyal S. G., Dhar A., Bhat A.: *Hypertens. Res.* 44, 740 (2021).
- Jahandideh F., Wu J.: *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2192 (2020).
- Menacho-Melgar R., Decker J. S., Hennigan J. N., Lynch M. D.: *J. Control. Release* 295, 1 (2019).

4. Goodwin D., Simerska P., Toth I.: *Curr. Med. Chem.* **19**, 4451 (2012).
5. Maletínská L. a 13 spoluautorů: *Int. J. Obes.* **39**, 986 (2015).
6. Mikulášková B., Maletínská L., Zicha J., Kuneš J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* **436**, 78 (2016).
7. Myšková A., Sýkora D., Kuneš J., Maletínská L.: *Drug Deliv.* **30**, 2284685 (2023).
8. Kowalczyk R., Harris P. W., Williams G. M., Yang S.-H., Brimble M. A.: *Peptides and peptide-based biomaterials and their biomedical applications*. Springer, New York City 2017.
9. Resh M. D.: *Prog. Lipid Res.* **63**, 120 (2016).
10. Veronese F. M., Pasut G.: *Drug Discov. Today* **10**, 1451 (2005).
11. Harris J. M., Chess R. B.: *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 214 (2003).
12. Hermanson T., Bennett C. L., Macdougall I. C.: *Expert Opin. Drug Saf.* **15**, 1421 (2016).
13. Solá R. J., Griebenow K.: *BioDrugs* **24**, 9 (2010).
14. Jayaprakash N. G., Surolia A.: *Biochem. J.* **474**, 2333 (2017).
15. Mahalakshmi R., Balaram P.: *D-Amino acids*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York City 2006.
16. Molhoek E. M., Van Dijk A., Veldhuizen E. J., Haagsman H. P., Bikker F. J.: *Peptides* **32**, 875 (2011).
17. Vávra I., Machová A., Holeček V., Cort J. H., Zaoral M., Sorm F.: *Lancet* **291**, 948 (1968).
18. Karanth L., Barua A., Kanagasabai S., Nair N. S.: *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, CD009824 (2019).
19. Lee W. P., Lippe B. M., La Franchi S. H., Kaplan S. A.: *Am. J. Dis. Child.* **130**, 166 (1976).
20. Pražienková V., Popelová A., Kuneš J., Maletínská L.: *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5297 (2019).
21. Mazarguil H., Gouardères C., Tafani J.-A. M., Marcus D., Kotani M., Mollereau C., Roumy M., Zajac J.-M.: *Peptides* **22**, 1471 (2001).
22. Sharma A., Kumar A., Abdel Monaim S. A., Jad Y. E., El-Faham A., de la Torre B. G., Albericio F.: *Biopolymers* **109**, e23110 (2018).
23. Biron E., Chatterjee J., Ovadia O., Langenegger D., Brueggen J., Hoyer D., Schmid H. A., Jelinek R., Gilon C., Hoffman A.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **47**, 2595 (2008).
24. Gazdik M., O'Neill M. T., Lopaticki S., Lowes K. N., Smith B. J., Cowman A. F., Boddey J. A., Sleebs B. E.: *Med. Chem. Commun.* **6**, 437 (2015).
25. Purkayastha A., Kang T. J.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **24**, 702 (2019).
26. Qvit N., Rubin S. J., Urban T. J., Mochly-Rosen D., Gross E. R.: *Drug Discov. Today* **22**, 454 (2017).
27. Zhang R.-Y., Thapa P., Espiritu M. J., Menon V., Bingham J.-P.: *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 1135 (2018).
28. McClements D. J.: *Adv. Colloid Interface Sci.* **219**, 27 (2015).
29. Yadav S. C., Kumari A., Yadav R.: *Peptides* **32**, 173 (2011).
30. Binder U., Skerra A.: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **31**, 10 (2017).
31. Zvonova E. A. a 12 spoluautorů: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 1975 (2017).
32. Zhang Q., Li S., Wu W., Xia X., Zhang J.: *Nanomedicine: NBM* **47**, 102622 (2023).
33. Moiola M., Memeo M. G., Quadrelli P.: *Molecules* **24**, 3654 (2019).
34. Pardridge W. M.: *Pharmacol. Toxicol.* **71**, 3 (1992).
35. Maletínská L., Pýchová M., Holubová M., Blechová M., Demianová Z., Elbert T., Železná B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 781 (2012).
36. Zemenova J., Sykora D., Adamkova H., Maletinska L., Elbert T., Marek A., Blechova M.: *J. Sep. Sci.* **40**, 1032 (2017).
37. Hanna C. C., Kriegesmann J., Dowman L. J., Becker C. F., Payne R. J.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **61**, e202111266 (2022).
38. Erak M., Bellmann-Sickert K., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A. G.: *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 2759 (2018).
39. Alhassan A. M., Abdullahi M. I., Uba A., Umar A.: *Trop. J. Pharm. Res.* **13**, 307 (2014).
40. Ikezawa H.: *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 409 (2002).
41. Zhu S., Guo Z.: *Org. Lett.* **19**, 3063 (2017).
42. Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., Ishihara N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M.: *Nature* **408**, 488 (2000).
43. Hannoush R. N., Sun J.: *Nat. Chem. Biol.* **6**, 498 (2010).
44. Magee T., Seabra M. C.: *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 190 (2005).
45. Zhang L., Bulaj G.: *Curr. Med. Chem.* **19**, 1602 (2012).
46. Hutchinson J. A., Burholt S., Hamley I. W., Lundback A.-K., Uddin S., Gomes dos Santos A., Reza M., Seitsonen J., Ruokolainen J.: *Bioconjugate Chem.* **29**, 2296 (2018).
47. De Prins A., Van Eeckhaut A., Smolders I., Tourvé D., Ballet S.: *Curr. Med. Chem.* **27**, 39 (2019).
48. Wang J., Wu D., Shen W.-C.: *Pharm. Res.* **19**, 609 (2002).
49. Holubová M., Blechová M., Kákonová A., Kuneš J., Železná B., Maletínská L.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **366**, 422 (2018).
50. Drucker D. J., Dritselis A., Kirkpatrick P.: *Nat. Rev. Drug Discovery* **9**, 267 (2010).
51. Maletínská L., Maixnerová J., Matyšková R., Haugvicová R., Pirník Z., Kiss A., Železná B.: *BMC Neuroscience* **9**, 101 (2008).
52. Popelová A., Kákonová A., Hrubá L., Kuneš J., Maletínská L., Železná B.: *Phys. Res.* **67**, 339 (2018).
53. Tan T. M.-M.: *Nat. Rev. Endocrinol.* **19**, 66 (2023).
54. Zemenová J., Sýkora D., Freislebenová A., Maletínská L.: *Bioanalysis* **9**, 1319 (2017).
55. Mráziková L., Nepřašová B., Mengr A., Popelová A., Strnadová V., Holá L., Železná B., Kuneš J., Maletínská L.: *Front. Pharmacol.* **12**, 779962 (2021).
56. Toutain P.-L., Bousquet-mélou A.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27**, 455 (2004).

57. Wang J., Chow D., Heiati H., Shen W.-C.: *J. Controlled Release* 88, 369 (2003).
58. Mehta A., Marso S. P., Neeland I.: *Obes. Sci. Pract.* 3, 3 (2017).
59. Ng S. Y. A., Wilding J. P.: *Expert Opin. Biol. Ther.* 14, 1215 (2014).
60. Christou G. A., Katsiki N., Blundell J., Fruhbeck G., Kiortsis D. N.: *Obes. Rev.* 20, 805 (2019).
61. Trier S., Linderoth L., Bjerregaard S., Strauss H. M., Rahbek U. L., Andresen T. L.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 329 (2015).
62. Bergmann N. C., Davies M. J., Lingvay I., Knop F. K.: *Diabetes Obes. Metab.* 25, 18 (2023).
63. Athanasiadou K. I., Paschou S. A., Stamatopoulos T., Papakonstantinou E., Haidich A.-B., Goulis D. G.: *Diabetes Res. Clin. Pract.* 190, 110020 (2022).
64. Home P., Kurtzhals P.: *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 325 (2006).
65. Steensgaard D. B., Schluckebier G., Strauss H. M., Norrman M., Thomsen J. K., Friderichsen A. V., Havelund S., Jonassen I.: *Biochemistry* 52, 295 (2013).
66. Marso S. P., McGuire D. K., Zinman B., Poulter N. R., Emerson S. S., Pieber T. R., Pratley R. E., Haahr P.-M., Lange M., Brown-Frandsen K.: *N. Engl. J. Med.* 377, 723 (2017).
67. Rodbard H. W., Buse J. B., Woo V., Vilsbøll T., Langbakke I. H., Kvist K., Gough S. C. L.: *Diabetes Obes. Metab.* 18, 40 (2016).
68. Säwendahl L., Battelino T., Brod M., Højby Rasmussen M., Horikawa R., Juul R. V., Saenger P.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105, e1847 (2020).
69. Mateo M. G., Gutiérrez M. d. M., Domingo P.: *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 6, 21 (2011).
70. Syed Y. Y.: *Drugs* 82, 1213 (2022).
71. Meyers P. A.: *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 1035 (2009).
72. DrugBank: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00781>, staženo 5. 4. 2023.
73. FDA: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-572_Cubicin.cfm, staženo 26. 8. 2023.
74. Iepson E. W., Torekov S. S., Holst J. J.: *Expert Rev. Cardiovas. Ther.* 13, 753 (2015).
75. NovoNordisk: <https://www.novonordisk-us.com/media/news-archive/news-details.html?id=39225>, staženo 27. 8. 2023.
76. FDA: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-chronic-weight-management-first-2014>, staženo 6. 4. 2021.
77. Traynor K.: *Am. J. Health Syst. Pharm.* 72, 1834 (2015).
78. Steyn L.: *SA Pharm. J.* 89, 36 (2022).
79. FDA: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-weekly-therapy-adult-growth-hormone-deficiency>, staženo 9. 1. 2023.
80. Stanley T. L., Fourman L. T., Feldpausch M. N., Purdy J., Zheng I., Pan C. S., Aepfelbacher J., Buckless C., Tsao A., Kellogg A.: *The Lancet HIV* 6, e821 (2019).
81. Frampton J. E.: *Pediatric Drugs* 12, 141 (2010).
82. Moffatt J. H., Harper M., Boyce J. D.: *Polymyxin antibiotics: From laboratory bench to bedside*. Springer, New York City 2019.
83. Heidary M., Khosravi A. D., Khoshnood S., Nasiri M. J., Soleimani S., Goudarzi M.: *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1 (2017).

A. Myšková^{a,b}, D. Sýkora^a, J. Kuneš^{b,c}, and L. Maletínská^b (^a *Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*, ^b *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*, ^c *Institute of Physiology, CAS, Prague, Czech Republic*): **Lipidization as a Tool for Peptide Drug Development**

Peptide therapeutics are becoming increasingly important in the quest for effective compounds to treat various difficult-to-cure diseases. As potential therapeutics, peptides have many favorable chemical and pharmacological properties, ranging from their great diversity to their high affinity to various types of natural receptors. However, despite these and other advantages, they also have their pitfalls, such as a very limited stability in the organism. They have a short half-life and tend to be excreted from the body very quickly. In order to achieve a better pharmacological effect, it is desirable to find new means of modifying peptides to enable them to be used as effective drugs. There are many ways of altering the peptide structure. In this review, we summarize the approaches currently used to modify the peptide constitution with a focus on lipidization. Simultaneously this review summarizes all lipidized peptide-based therapeutics that are currently on the market.

Keywords: peptide therapeutics, peptide structure modification, lipidization

Acknowledgements

This work was supported by RVO: 61388963 and RVO: 67985823 projects of the Academy of Sciences of the Czech Republic.



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

BIOCHEMICKÝ VÝZNAM MATRIX GLA PROTEINU A JEHO POTENCIONÁLNÍ VYUŽITÍ V KLINICKÉ BIOCHEMII JAKO MARKERU

MILOŠ BARNA^{a,b}, JANA ČEPOVÁ^a, KATEŘINA DUNOVSKÁ^a, PAVEL MELICHERČÍK^b, VLADISLAV BARTÁK^b, RICHARD PRŮŠA^a, RENÉ KIZEK^a a EVA KLAPKOVÁ^a

^a Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Česká republika, ^b 1. ortopedická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká republika
eva.klapkova@fnmotol.cz

Došlo 31.12.23, přijato 6.3.24.

Cílem práce bylo získat přehled o biochemickém významu matrix γ -karboxyglutamátového (Gla) proteinu (MGP). Jsou předloženy literární podklady ukazující spojení MGP s metabolismem cév, kostí, ledvin a hladinami vitamínu K. Je popsán vztah MGP ke Keutelově syndromu, pseudoxanthoma elasticum, kolitidě a zubnímu kameni. Doposud získané informace naznačují, že hladiny MGP by mohly sloužit jako biochemický marker u těchto závažných onemocnění.

Klíčová slova: kostní metabolismus, matrixové proteiny, hladiny vápníku a fosforu, biochemické markery, vitamin K2

Obsah

1. Úvod
2. Klinicko-biochemické korelace spojené s MGP
3. Vztah hladiny MGP k metabolismu cév
4. Vztah hladiny MGP k ledvinám
5. Vztah hladiny MGP ke kostnímu metabolismu
6. Vztah MGP k hladinám vitamínu K
7. Pseudoxanthoma elasticum
8. Keutelův syndrom
9. Zubní kámen
10. Kolitida
11. Závěr

1. Úvod

Matrix γ -karboxyglutamátový (Gla) protein (MGP – Matrix Gla protein) je cirkulující protein o 103 aminokyselinach o molekulové hmotnosti kolem 14 kDa. V primární struktuře tvoří aminokyseliny 1–19 signální peptid. Biologicky aktivní MGP je 20–96 a propeptid 97–103. Propeptid je při maturaci odštěpen karboxypeptidasou N. MGP obsahuje ve své molekule 5 karboxyglutamátů a 3 fosforeny. Mezi pozicemi 73 a 79 je disulfidová vazba a mezi pozicemi 51 a 97 je vlastní Gla doména². Biologicky a biochemicky významné role MGP jsou ukázány na obr. 1. Byly popsány asociace s řadou orgánů a procesů (cévy, svalovina, kosti, klouby, zuby, ledviny, ale i nádorová onemocnění)^{3–6}. MGP je jednoznačně zapojen do řady metabolických drah u kostí, glukosy, tuků, vitamínu

K a dalších^{7–11}. Koncentrace těchto proteinů jsou velmi nízké. Pro stanovení MGP proteinů se využívají imunochemické spektrofotometrické a chemiluminiscenční metody¹².

2. Klinicko-biochemické korelace spojené s MGP

MGP řadíme do skupiny proteinů označených jako vitamin K-dependentní (VKDP), který působí jako přirozený inhibitor kalcifikace¹³. V této proteinové rodině bylo

Biochemicky významné role MGP

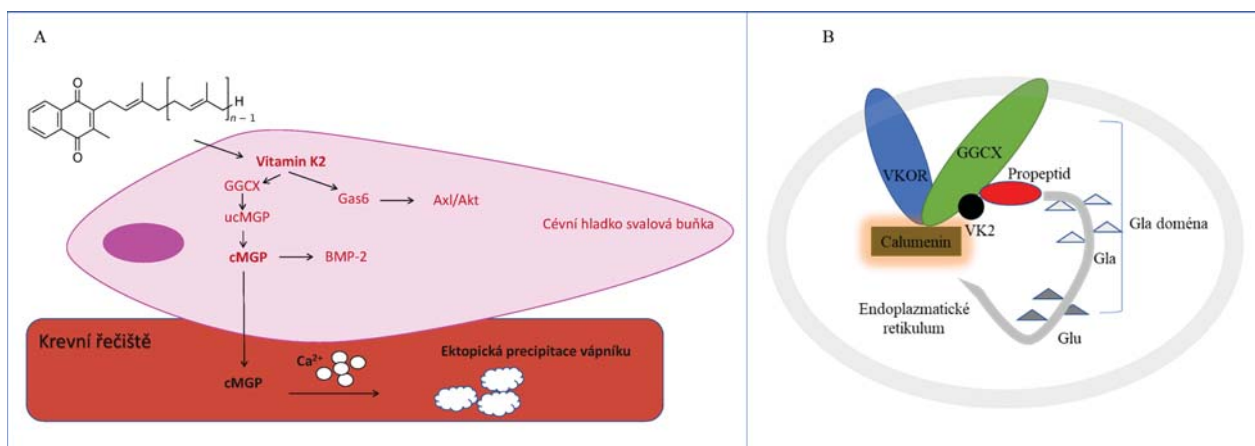
cévy, svalovina	metabolismus kostní hmoty
kosti, klouby, zuby	metabolismus glukózy
ledviny, oči	metabolismus tuků
alergické reakce, nádory	metabolismus vitamínu K

Obr. 1. Přehled biochemicky významných rolí MGP ve vztahu k orgánům a hlavním metabolickým procesům

doposud popsáno 17 VKDP. Byly identifikovány VKDP syntetizované v játrech. Do této skupiny lze zařadit srážecí faktory II, VII, IX a X. Další skupinu představují VKDP syntetizované v kostech, chrupavkách a v hladké svalovinné cévní stěny. Do této skupiny zařazujeme osteokalcin a MGP. Společným znakem VKDP je vysoká afinita k vápníku, kterou zajišťuje γ -karboxylglutamátová doména (Gla), která představuje pět γ -karboxylglutamátových zbytků^{9,14}. Předpokládá, že karboxylace má účinky na vazbu iontů vápníku a fosforylace má ovlivnit uvolňování MGP do buněk^{15–17}. Zvýšené množství plně aktivní izoformy v séru, tj. karboxylovaného a fosforylovaného MGP (p-c-MGP), může znamenat snížení celkové aktivity MGP (cit.¹⁶). Isoformy bez karboxylovaných glutamátových zbytků, p-uc-MGP (fosforylované-nekarboxylované MGP) nemají vlastní antikalcemickou aktivitu, avšak díky fosforylaci jsou schopny navázat se na vápenatá depozita a mohou korelovat se zvýšeným množstvím vaskulárních kalcifikací. Naopak dp-c-MGP (defosforylovaný-karboxylovaný MGP) by antikalcemickou aktivitu mít měl, není ale schopen se na kalciová depozita navázat a interagovat s nimi. Koreluje tedy se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem^{18,19}. Za nejvhodnější biomarker antikalcemické aktivity MGP je považována neaktivní izoforma MGP, defosforylovaný-podkarboxylovaný MGP (dp-uc-MGP)²⁰. Navíc není plně objasněno, zda-li MGP, který je vysoce nerozpustný, cirkuluje jako samostatný protein, či za účasti přenašeče²¹.

3. Vztah hladiny MGP k metabolismu cév

Na obr. 2 je předpokládané schéma významu MGP u kalcifikace hladké svaloviny cév. Ukazuje se, že v aterosklerotických cévách je podstatně upregulovaná transkripce genu pro MGP. Pacienti, kteří mají prokazatelně těžkou aterosklerózu, mají v séru významně zvýšené hodnoty MGP v porovnání se zdravými jedinci²². V případě karotické tepny byly nalezeny signifikantní rozdíly v sérové koncentraci MGP u pacientů bez významné stenózy (< 20 %) a pacientů se střední (20–50 %) a těžkou (> 50 %) aterosklerotickou stenózou. Hladina MGP také korelovala se stupněm stenózy²³. Kromě karotických tepen se studie zabývaly i vztahem MGP a stenóz koronárních arterií. Funkce MGP v prevenci kalcifikace cév byla prokázána u myši, u kterých byl proveden genový knockout (inaktivace genu) právě pro MGP. Tyto myši umíraly do 8 týdnů od narození, kvůli rupturám velkých cév v důsledku masivní mineralizace. Bylo zjištěno, že elastická vlákna cév byla kompletně kalcifikována a VSMC (Vascular smooth muscle cells – cévní hladkosvalové buňky) ztratily svoji pružnost a schopnost se stahovat v důsledku chondrogení metaplázie^{2,24}. MGP brání vzniku extracelulárních kalciových depozit jak na buněčné, tak na molekulární úrovni. Tyto mechanismy zahrnují zejména regulaci uvolňování matrixových vezikul (MV) a inhibici precipitace vápenatých sloučenin¹³. Buňky hladkých svalů cév se brání apoptóze vylučováním MV, které obsahují vápenaté sloučeniny. Zvýšená hladina vápenatých iontů iniciálně způsobí zvýšení koncentrace MGP v séru. Při dlouhodobé hyperkalcémii hladina MGP rapidně klesá a dochází k precipitaci vápenatých sloučenin



Obr. 2. Význam MGP u kalcifikace hladké svaloviny cév. Dochází k ukládání vápenatých iontů na necílových místech. V krevním řečišti dochází k interakci c-MGP s Ca^{2+} a následnému ukládání vápníku na necílových místech (A). γ -Karboxylace proteinů závislých na vitamínu K. V endoplazmatickém retikulu (ER) se proteiny závislé na vitamínu K spojují s γ -glutamylkarboxylasou (GGCX) prostřednictvím N-terminálních propeptidů. Mnohočetné glutamátové zbytky (Glu) jsou pak postupně převedeny na Gla zbytky v tomto komplexu. Glutamátové zbytky, které mají být γ -karboxylovány, tvoří shluk známý jako „Gla doména“ blízko N-konce substrátů GGCX. Na lumen ER je GGCX lokalizován s vitamín K epoxid reuktasou (VKOR), která má důležitou roli v cyklu vitamínu K. Protein zvaný calumenin, který negativně reguluje aktivitu GGCX, se také pojí s tímto komplexem (B). Více podrobností je uvedeno v práci Azuma a spol.⁵⁶

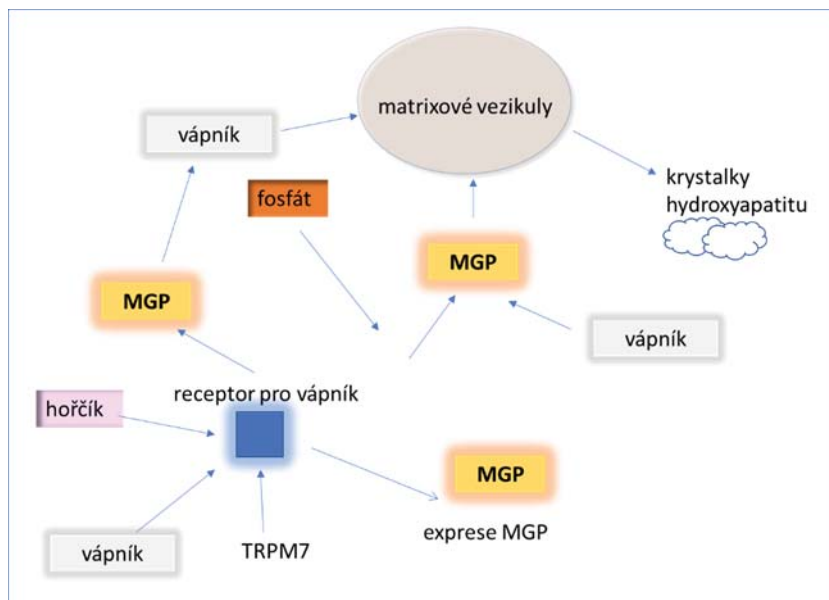
a vzniku kalcifikace^{25,26}. K vytvoření kalcifikace přispívá také apoptóza VSMC. Tento děj zřejmě MGP antagonizuje vyvázáním kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2), který funguje jako proapoptotický agonista²⁷. Zvýšené hladiny fosfátů působí upregulaci osteogenních markerů u VSMC a následně vedou k osteochondrogní transdiferenciaci. Tomuto ději opět zřejmě brání MGP, jelikož v pokusu u MGP-deficientních myší bylo demonstrováno snížení množství VSMC a byl prokázán nález buněk podobných chondrocytům²⁸, viz obr. 3.

Předpokládá se, že různé polymorfismy zvyšují riziko extracelulární kalcifikace právě prostřednictvím změny sérové koncentrace MGP (cit.²). Hladiny MGP v séru pacientů, u kterých je na koronárních tepnách přítomná kalcifikace, vykazují souvislost s polymorfismy rs4326 a rs1800802 (cit.^{29,30}). Bylo popsáno, že tepny postižené aterosklerózou obsahovaly v intimě uc-MGP a u Monckebergovy mediokalcinózy byl uc-MGP v médiu. Ve zdravých tepnách nebyl uc-MGP detegován. Prokázán byl pouze funkční karboxylovaný MGP, který se vyskytoval kolem elastických vláken v *tunica media*³¹. Zrychleným vaskulárním stárnutím jsou postiženi i pacienti s chronickou renální insuficiencí (chronic kidney disease, CKD). Kvůli tomu lze předpokládat, že u těchto pacientů bude zvýšená hladina dp-uc-MGP (tedy nefunkčního MGP, který neinhibuje kalcifikaci). Pacienti s CKD podstoupili vyšetření cirkulujících hladin dp-uc-MGP. Mezi pacienty s CKD stadia 5 bylo nejvyšší riziko kalcifikace koronárních tepen u nejvyšší koncentrací dp-uc-MGP. Také exprese MGP v cévách byla spojena se zvýšením dp-uc-MGP a rozsahem koronární kalcifikace. Z pohledu polymorfismu (SNP) je zajímavé, že vyšší skóre kalcifikace koronárních arterií měli pacienti homozygotní pro alelu

C (pacienti nesoucí alelu T měli skóre nižší)^{7,32}. Byla popsána potenciální souvislost mezi koncentrací dp-uc-MGP a vysokým kalciovým skóre³³. Mezi vápníkem, fosfátem a MGP však existuje negativní zpětnovazební okruh, který zabezpečuje, že nárůst koncentrace vápníku a fosfátu zahájí expresi MGP a tím zabrání kalcifikaci. Na druhé straně vápník snižuje vstup MGP do matrixových vezikul, čímž ruší jeho inhibiční efekt. Vztah mezi hořčíkem, který je známým inhibítozem kalcifikace, a MGP se zdá být také komplikovaný. Hořčík reguluje změnu počtu receptorů pro vápník, které jsou zodpovědné za indukci exprese MGP a pravděpodobně přes kanál TRPM7 (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7) stimulují expresi MGP (cit.³⁴). Čím vyšší byl věk pacientů, tím vyšší byly i hladiny MGP v séru. Byly nalezeny také asociace s HDL cholesterolem a rizikem ICHS (ischemická choroba srdeční). Po provedení CT angiografie koronárních cév bylo hodnoceno i kalciové skóre. Souvislosti mezi kalciovým skóre a MGP objeveny nebyly³⁵.

4. Vztah hladiny MGP k ledvinám

Chronické komplikace dialyzovaných pacientů vycházejí i z hyperfosfatémie, která způsobuje sekundární hyperparatyreózu (onemocnění charakterizované dlouhodobě zvýšenou sekrecí parathormonu) a vaskulární kalcifikaci. Kalcimimetika se ukázala jako možné řešení komplikací vycházejících z hyperfosfatémie. Kalindol (kalcimimetikum) nejúčinněji inhiboval ukládání kalcia ve stěně, a navíc do jisté míry snižoval expresi BMP-2 (indukován vysokou koncentrací fosfátu). Na druhé straně



Obr. 3. **Negativní zpětnovazební okruh.** Zjednodušené schéma vztahu molekul zasahujících do kostního metabolismu a osifikačního procesu.

kalindol pravděpodobně snižuje kalcifikaci indukci exprese MGP v stěně cév. Tento mechanismus se jeví jako jeden z důležitých při ochraně cév vůči kalcifikaci při chronické hyperfosfatémii³⁶. Pacienti na hemodialýze měli dle studie Raschtchizadeh a spol.³⁷ významně nižší plazmatické hladiny MGP ve srovnání s kontrolní skupinou. Dalším potenciálním využitím dp-uc-MGP se zdá být identifikace dospělých diabetických pacientů s diabetickou nefropatií a vysokým rizikem cévního onemocnění. Byl nalezen vztah mezi dp-uc-MGP a poklesem renálních funkcí vyjádřených jako eGFR (Estimated Glomerular Filtration Rate)³⁸.

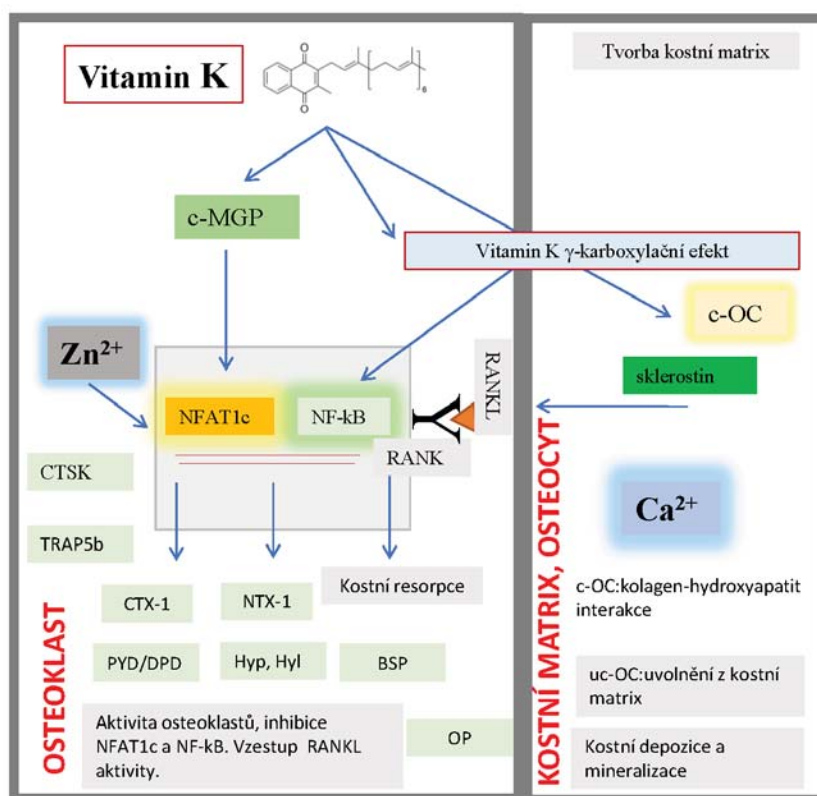
5. Vztah hladiny MGP ke kostnímu metabolismu

Byly objeveny významné rozdíly v koncentracích MGP v séru u zdravých osob a u skupiny pacientů s anginou pectoris či onemocněními chrupavky³⁹. Zároveň se ukázalo, že účastníci s alelou rs1800802 (minoritní alela)

měli nižší riziko osteoartrózy ruky ve srovnání s účastníky s majoritní alelou v dané pozici na chromosomu⁴⁰. Jiná studie našla spojení mezi sérovou koncentrací MGP a konečným stadiem osteoartrózy. Také pacienti, kteří mají již delší dobu bolesti, měli nižší hladiny MGP, což by mohlo souviset s kalcifikací kloubní chrupavky, která je jedním z patologických jevů při osteoartróze⁴¹.

6. Vztah MGP k hladinám vitamínu K

Význam MGP pro formování kostí je uveden na zjednodušeném schématu na obr. 4. Intervenční studie, která porovnávala užívání fylochinonu (K1) s běžným multivitaminem ve smyslu změny progresu kalcifikace koronárních arterií, zjistila, že mezi intervenční a kontrolní skupinou nebyl objeven rozdíl ve zhoršení kalcifikací. Navíc, pacienti s již přítomnými koronárními kalcifikacemi měli při terapii fylochinonem o 6 % menší rozvoj onemocnění než kontrolní skupina⁴². Nedostatek vitamínu K u dialyzovaných pacientů komplikuje karboxylaci MGP (cit.⁴³).



Obr. 4. Význam MGP pro formování kostí. Zjednodušené schéma vztahu vitamínu K2 ke kostnímu metabolismu. U osteoklastů dochází k řízení procesu kostní resorpce. Vztah k aktivitě transkripčních faktorů NFAT1c a NF-kB s vazbou na další regulační proteiny CTSK, tryptofan RNA vazebný protein (TRAP5b), karboxyterminální telopeptid kolagenu typu 1 (CTX-1), aminoterminální telopeptid kolagenu typu 1 (NTX-1), pyridinolin/deoxyypyridinolin (PYD/DPD), hydroxyprolin protein (Hyp), ceramid synthase hyl (Hyl), kostní sialoprotein (BSP), osteogenní protein (OP) a receptorový aktivátor ligandu nukleárního faktoru kappa-B (RANKL). V kostní matrixi a osteocytech ovlivňují kolagen. Vliv sklerostinu c-OC, c-OC a interakce kolagen-hydroxyapatit, uc-OC uvolnění z kostní matrix, změny kostní depozice a mineralizace. Upraveno podle Scheiber a spol.⁴⁵

Studie umožnila studovat vliv užívání *per os* podávaného vitamínu K2 na koncentraci uc-MGP (cit.⁴⁴). Jedna skupina dostávala 360 µg MK-7 denně, druhá skupina stejné množství placeba. Hodnoceny byly hladiny dp-uc-MGP a MK-7 v séru. Ve druhém roce hodnocení měla skupina užívající vitamin K2 40× vyšší hladiny MK-7 a o 40 % nižší hladiny dp-uc-MGP ve srovnání s placebem. U obou skupin kalcifikace progredovala bez signifikantního rozdílu mezi skupinami⁵. Vliv užívání vysokých dávek MK-7 (100 µg g⁻¹ stravy) na rozvoj kalcifikace měkkých tkání byl studován na potkaním modelu. Jedna skupina potkanů podstoupila nefrektomii v kombinaci s vysokofosfátovou dietou (indukce kalcifikace), druhá falešný zákrok. Zvířata pak dostávala dietu bohatou nebo chudou na MK-7. Model CKD měl vyšší kalcifikaci aorty a myokardu, přičemž měl také zvýšenou hladinu ALP (alkalická fosfatasa). Při suplementaci MK-7 byla kalcifikace kardiovaskulárního aparátu inhibována a poklesly koncentrace ALP. Expres mRNA MGP genu v aortě se po suplementaci zvýšila 10krát. Suplementace neměla vliv na renální hypertenzi a sekundární hypertrofii srdeční svaloviny. MK-7 může chránit cévy před excesivní kalcifikací pomocí stimulace tvorby funkčního MGP (cit.^{6,45–47}). γ -Glutamylkarboxylasa je enzym potřebný na karboxylaci inhibitorů srážení vápníku, jako MGP a osteokalcin. Kofaktorem enzymu je vitamin K. V populaci existuje fenotyp, u kterého dochází kvůli mutaci v γ -glutamylkarboxylase k hypofunkci tohoto enzymu, což způsobuje ektopickou kalcifikaci. Fenotyp pacientů je velmi podobný pacientům s pseudoxanthoma elasticum (PXE). Zjistilo se, že u pacientů s fenotypem podobným PXE se nekarboxylované MGP a osteokalcin akumulovaly v séru, plazmě i v pokožce⁴⁸.

7. Pseudoxanthoma elasticum

Dědičné systémové onemocnění PXE se projevuje ektopickou mineralizací měkkých pojivových tkání a je možné, že v jeho patogenезi se uplatňuje také MGP. Víceřé studie se zaměřily na tuto souvislost a bylo zjištěno, že pacienti s PXE mají v séru nižší koncentrace MGP (ta je pak nemusí dostatečně chránit před ektopickými kalcifikacemi). Navíc by mohla rostoucí koncentrace MGP u PXE pacientů kopírovat dobu nástupu nemoci⁴⁹. Tvrzení z předešlé studie potvrzuje i další výzkum, který byl vykonán na transgenních myších (neexprimují gen ABCC6, který bývá porušen u pacientů s PXE). Hladina MGP byla u transgenních myší významně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Důležitým objevem je také fakt, že transgenní myši měly ve svých játrech v převážné části jenom nekarboxylovanou formou MGP. Existuje tedy jasné spojení mezi ektopickou kalcifikací a nízkou hodnotou karboxylované formy MGP u myší s PXE (cit.⁵⁰). Tuto hypotézu podporuje i nálezy intenzivní lokalizace nekarboxylovaného MGP v místech precipitátů u PXE pacientů. Fibroblasty odebrané z dermis studovaných skupin byly kultivovány a byla monitorována jak exprese MGP mRNA, tak detegován MGP protein. Koncentrace

MGP mRNA byla srovnatelná, avšak karboxylovaného MGP produkovaly PXE fibroblasty o 30 % méně, což je pravděpodobně spojeno s kalcifikací elastických vláken. Všechny tyto nálezy silně podporují souvislost mezi nedostatkem karboxylovaného MGP a patogenézí PXA (cit.⁵¹). MGP v séru interaguje s proteinem fetuinem a tvoří s ním komplex MGP-fetuin. Množství komplexu v séru přímo koreluje s koncentrací vápníku v séru. Převažující aktivita osteoklastu způsobí nárůst vápníku a fosforečnanu v séru, které by ale začaly spontánně krystalizovat. Tato krystalizace je inhibována komplexem MGP-fetuin⁵².

8. Keutelův syndrom

Keutelův syndrom je vzácné genetické onemocnění způsobené mutací v genu pro MGP. U pacientů dochází ke kalcifikaci chrupavčitých tkání a narušení vývoje střední části obličeje. Na myším modelu bylo zjištěno, že MGP promotor je vysoce aktivní v lebečních švech a nosní přepážce. U myší s vyřazeným MGP byla nosní přepážka abnormálně mineralizovaná a zkrácená. Transgenní exprese MGP korigovala vzniklé anomálie⁵³. U pacienta s Keutelovým syndromem byl studován jeho fenotyp a druh MGP mutace a také množství jednotlivých forem MGP a účinek užívání vitamínu K na karboxylaci MGP. Nalezeny byly vysoké hladiny fosforylovaného MGP, ale nízké hladiny karboxylované formy MGP (cit.⁵⁴).

9. Zubní kámen

Analýza přítomnosti polymorfismu MGP rs4236 u pacientů se subgingiválním (poddášňovým) zubním kamenem a u pacientů bez něj se ukazuje jako nevýznamná. Pozorována však byla vyšší koncentrace MGP v přítomnosti subgingiválního zubního kamene⁵⁵.

10. Kolitida

Na myším modelu byla vyvolána kolitida. V tkáních tlustého střeva s ulcerózní kolitidou byla zjištěna vyšší úroveň exprese genu MGP, která korelovala se závažností onemocnění⁴.

11. Závěr

Tento přehledový článek se zaměřuje na význam MGP v buněčném metabolismu především cév a kostí. V řadě studií byly popsány pravděpodobné asociace MGP proteinů s patologiemi cév, svaloviny, kostí, kloubů, ledvin a i zhoubnými nádory. Asociace mezi hladinami MGP proteinů by mohly přinášet informace pro jejich praktické klinické využití.

Práce byla realizována za institucionální podpory MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203. Autoři dále děkují za prvotní zpracování materiálu Jakobovi Petrusovi a Tomášovi Grondžakovi.

Seznam zkratk

MGP	matrix γ -karboxyglutamátový protein, celkový MGP, také c-MGP
uc-MGP	podkarboxylovaný MGP
dp-MGP	defosforylovaný MGP
ELISA	enzymová imunoadsorpční analýza
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií
VA	vitamin A
VD	vitamin D
VK2	vitamin K2
ISCH	ischemická choroba srdeční
ECM	extracelulární matrice
TNF	tumor nekrotizující faktor
KS	Keutelův syndrom
hs-CRP	vysoce senzitivní C-reaktivní protein
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
RA	revmatoidní artritida
MK-7	menachinon-7
VKOR	vitamin K epoxidreduktasa
GGCX	γ -glutamylkarboxylasa
TRPM7	kanály přechodných receptorových potenciálů (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7)

LITERATURA

- Krüger T., Floege J.: *Nephrologie* 5, 152 (2010).
- Luo G. B., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R., Karsenty G.: *Nature* 386, 78 (1997).
- Perne M. G. a 10 spoluautorů: *J. Mind Med. Sci.* 10, 66 (2023).
- Dong X. Y., Wu M. X., Zhang H. M., Lyu H., Qian J. M., Yang H.: *Gastroenterol. Rep.* 8, 66 (2020).
- Levy-Schousboe K. a 17 spoluautorů: *Clin. Kid. J.* 14, 2114 (2021).
- Crintea A., Dutu A. G., Constantin A. M., Fekete Z., Samasca G., Lupan I., Florian I. A., Silaghi C. N., Craciun A. M.: *Biology- Basel* 11, 82 (2022).
- Jaminon A. M. G., Dai L., Qureshi A. R., Evenepoel P., Ripsweden J., Soderberg M., Witasp A., Olauson H., Schurgers L. J., Stenvinkel P.: *Sci. Rep.* 10, 6586 (2020).
- Li C., Li J., He F., Li K., Li X., Zhang Y.: *Adipocyte* 9, 68 (2020).
- Vermeer C., Vik H.: *Vasc. Dis. Ther.* 5, 1 (2020).
- Sarosiak A., Oziębło D., Udziela M., Vermeer C., Malejczyk J., Szaflik J. P., Ołdak M.: *Acta Ophthal.* 99, e171 (2021).
- Bjorklund G., Svanberg E., Dadar M., Card D. J., Chirumbolo S., Harrington D. J., Aaseth J.: *Cur. Med. Chem.* 27, 1647 (2020).
- Barna M., Cepova J., Dunovska K., Petrus J., Melicherčík P., Prusa R., Kizek R., Klapkova E.: *Chem. Listy* 118, 694 (2023).
- Schurgers L. J., Uitto J., Reutelingsperger C. P.: *Trends Mol. Med.* 19, 217 (2013).
- Mayer O.: *Čas. Lék. Čes.* 155, 13 (2016).
- Price P. A., Fraser J. D., Metzvirca G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8335 (1987).
- Cranenburg E. C. M., Brandenburg V. M., Vermeer C., Stenger M., Muhlenbruch G., Mahnken A. H., Gladziwa U., Ketteler M., Schurgers L. J.: *Thromb. Haemostasis* 101, 359 (2009).
- Wajih N., Borras T., Xue W., Hutson S. M., Wallin R.: *J. Biol. Chem.* 279, 43052 (2004).
- Mayer O. a 11 spoluautorů: *Int. J. Cardiol.* 203, 916 (2016).
- Mayer O. a 10 spoluautorů: *J. Hum. Hypertens.* 30, 418 (2016).
- Ueland T., Gullestad L., Dahl C. P., Aukrust P., Aakhus S., Solberg O. G., Vermeer C., Schurgers L. J.: *J. Intern. Med.* 268, 483 (2010).
- Price P. A., Thomas G. R., Pardini A. W., Figueira W. F., Caputo J. M., Williamson M. K.: *J. Biol. Chem.* 277, 3926 (2002).
- Braam L., Dissel P., Gijssbers B., Spronk H. M. H., Hamulyak K., Soute B. A. M., Debie W., Vermeer C.: *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 20, 1257 (2000).
- Dana P., Adela S. T., Elena G., Gyorgy B., Mirela C., Smaranda B., Dumitru Z.: *Revista Română de Medicină de Laborator* 19, 169 (2011).
- Murshed M., Schinke T., McKee M. D., Karsenty G.: *J. Cell Biol.* 165, 625 (2004).
- Reynolds J. L., Joannides A. J., Skepper J. N., McNair R., Schurgers L. J., Proudfoot D., Jahnen-Dechent W., Weissberg P. L., Shanahan C. M.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2857 (2004).
- Kapustin A. N. a 10 spoluautorů: *Circulation Res.* 109, E1 (2011).
- Pi W. F., Guo X. J., Su L. P., Xu W. G.: *PLoS One* 7, e35283 (2012).
- Speer M. Y., Yang H. Y., Brabb T., Leaf E., Look A., Lin W. L., Frutkin A., Dichek D., Giachelli C. M.: *Circulation Res.* 104, 733 (2009).
- Najafi M., Roustazadeh A., Amirfarhangi A., Kazemi B.: *Mol. Biol. Rep.* 41, 1779 (2014).
- Karsli-Ceppioglu S., Yazar S., Keskin Y., Karaca M., Luleci N. E., Yurdun T.: *Balk. J. Med. Genet.* 22, 43 (2019).
- Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Kwajtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C. P., Cleutjens J. P. M., Vermeer C.: *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 25, 1629 (2005).
- Schurgers L. J., Cranenburg E. C. M., Vermeer C.: *Thromb. Haemostasis* 100, 593 (2008).

33. Dalmeijer G. W., van der Schouw Y. T., Vermeer C., Magdeleyns E. J., Schurgers L. J., Beulens J. W. J.: *J. Nutr. Biochem.* 24, 624 (2013).
34. Houben E., Neradova A., Schurgers L., Vervloet M.: *Giornale Italiano di Nefrologia* 33, 1724 (2016).
35. O'Donnell C. J. a 14 spoluautorů: *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 26, 2769 (2006).
36. Ciceri P., Elli F., Brenna I., Volpi E., Brancaccio D., Cozzolino M.: *Nephron Experimental Nephrology* 122, 75 (2012).
37. Hallajzadeh J., Ghorbanhaghjo A., Argani H., Dastmalchi S., Rashtchizadeh N.: *Iran. J. Kid. Dis.* 9, 249 (2015).
38. Griffin T. P., Islam M. N., Wall D., Ferguson J., Griffin D. G., Griffin M. D., O'Shea P. M.: *Sci. Rep.* 9, 18452 (2019).
39. Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Geusens P., van der Heijde D., Kwaijtaal M., van Diest R., Ketteler M., Vermeer C.: *Clin. Chim. Acta* 351, 131 (2005).
40. Misra D., Booth S. L., Crosier M. D., Ordovas J. M., Felson D. T., Neogi T.: *J. Rheumatol.* 38, 1960 (2011).
41. Lis K.: *Reumatologia* 46, 1 (2008).
42. Shea M. K., O'Donnell C. J., Hoffmann U., Dallal G. E., Dawson-Hughes B., Ordovas J. M., Price P. A., Williamson M. K., Booth S. L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1799 (2009).
43. Schlieper G. a 12 spoluautorů: *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 387 (2011).
44. Oikonomaki T., Papatotiriou M., Ntriniat T., Kalogeropoulou C., Zabakis P., Kalavrizioti D., Papadakis I., Goumenos D. S., Papachristou E.: *Int. Urol. Nephrol.* 51, 2037 (2019).
45. Scheiber D., Veulemans V., Horn P., Chatrou M. L., Potthoff S. A., Kelm M., Schurgers L. J., Westendorf R.: *Nutrients* 7, 6991 (2015).
46. Cranenburg E. C. M., Koos R., Schurgers L. J., Magdeleyns E. J., Schoonbrood T. H. M., Landewé R. B., Brandenburg V. M., Bekers O., Vermeer C.: *Thromb. Haemost.* 104, 811 (2010).
47. Tylianti T., Arief M., Wijaya A.: *Ind. Biomed. J.* 2, 126 (2010).
48. Vanakker O. M., Martin L., Schurgers L. J., Quaglino D., Costrop L., Vermeer C., Pasquali-Ronchetti I., Coucke P. J., De Paep A.: *Lab. Invest.* 90, 895 (2010).
49. Hendig D., Zarbock R., Szliska C., Kleesiek K., Gotting C.: *Clin. Biochem.* 41, 407 (2008).
50. Li Q. L., Jiang Q. J., Schurgers L. J., Uitto J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 208 (2007).
51. Gheduzzi D., Boraldi F., Annovi G., DeVincenzi C. P., Schurgers L. J., Vermeer C., Quaglino D., Ronchetti I. P.: *Lab. Invest.* 87, 998 (2007).
52. Price P. A., Caputo J. M., Williamson M. K.: *J. Bone Miner. Res.* 17, 1171 (2002).
53. Marulanda J., Eimar H., McKee M. D., Berkvens M., Nelea V., Roman H., Borrás T., Tamimi F., Ferron M., Murshed M.: *J. Biol. Chem.* 292, 11400 (2017).
54. Cranenburg E. C. M. a 11 spoluautorů: *J. Thromb. Haemost.* 9, 1225 (2011).
55. Dogan G. E., Demir T., Aksoy H., Saglam E., Laloglu E., Yildirim A.: *Arch. Oral Biol.* 70, 125 (2016).
56. Azuma K., Inoue S.: *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2844 (2019).

M. Barna^{a,b}, J. Čepová^a, K. Dunovská^a, P. Melicherčík^b, V. Barták^b, R. Průša^a, R. Kizek^a, and E. Klappková^a (^a Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, ^b Department of Orthopaedics, First Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic): **Biochemical Significance of Matrix Gla Protein and Its Potential Use as a Marker in Clinical Biochemistry**

The aim of this work was to present an overview on the biochemical significance of the matrix γ -carboxyglutamate (Gla) protein (MGP). According to the literature, the MGP is associated with vascular, bone, and kidney metabolisms, as well as vitamin K levels. The relationship of MGP to Keutel's syndrome, Pseudoxanthoma elasticum, colitis, and dental calculus is described. The information published so far suggests that MGP protein levels could have potential as a biochemical marker in these serious diseases.

Keywords: bone metabolism, levels of calcium and phosphates, matrix Gla proteins, vitamin K

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic – Conceptual development of research organization, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203. Special thanks to Jakub Petrus and Tomáš Grondžák for the initial processing of the material.



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

VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO HODNOCENÍ DEGRADACE VLÁKNA Z POLY(*p*-DIOXANONU) URČENÉHO PRO LÉKAŘSKÉ ÚČELY

DANIEL JEZBERA^a, JAN LOSKOT^a, MARTINA NALEZINKOVÁ^b, ALENA MYSLIVCOVÁ FUČÍKOVÁ^b
a ALEŠ BEZROUK^c

^a Katedra fyziky, ^b Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové, Rokitsanského 62, 500 03 Hradec Králové, Česká republika, ^c Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové, Česká republika
daniel.jezbera@uhk.cz

Došlo 7.2.24, přijato 5.3.24.

Ramanovu spektroskopii lze v chemii použít nejen k určování chemického složení, ale také pro získávání dalších informací o struktuře materiálu. Ve spektrech semikrystalických polymerů lze nalézt vzájemně odlišné pásy charakteristické pro krystalickou nebo amorfní fázi, stanovit z nich krystalinitu a z ní odhadnout míru degradace polymeru. V předložené studii byly vyhodnoceny změny raménka pásu na vlnočetu 1733 cm⁻¹ v Ramanových spektrech vlákna z poly(*p*-dioxanonu) podrobeného hydrolytické degradaci. Pro různě dlouhé doby degradace byly vypočteny obsahy ploch pod raménkem tohoto pásu a též byl proveden jeho modelový rozklad na předpokládané píky krystalické a amorfní fáze. Obsahy ploch pod raménkem i parametry modelových píků byly porovnány s hodnotami krystalinity získanými pomocí diferenční skenovací kalorimetrie, přičemž bylo dosaženo dobré shody. Tato práce ukazuje příklad využití Ramanovy spektroskopie při studiu hydrolytické degradace polymerů.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, degradace polymerů, stent, polydioxanon, krystalinita, modelování spekter

Úvod

Degradaci polymeru se míní změna jeho fyzikálních vlastností v průběhu času, nejčastěji to jsou vlastnosti mechanické. Obvykle jsou takové změny nežádoucí. V pozdějších fázích degradace polymeru je vidět jeho rozklad i pouhým okem. Z fyzikálně-chemického hlediska je nejvýznamnější změnou rozpad páteřního řetězce polymeru, tento proces se nazývá depolymerizace¹.

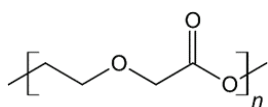
Rozpad polymerních řetězců může v principu nastat u libovolného polymeru na kterékoliv vazbě tvořící páteř řetězce, ale obvykle jsou předmětem zájmu polymery s relativně krátkou dobou degradace. Příčinou rozpadu mohou být chemické reakce (např. hydrolyza), fyzikální procesy (působení vysokých teplot či elektromagnetického záření s dostatečnou energií) nebo živé organismy¹⁻³. Pro zkoumání degradace polymerů existuje řada důvodů, mezi hlavními je využití biodegradovatelných polymerů ve zdravotnictví.

Biodegradovatelné polymery se ve zdravotnictví hojně používají jako materiály pro spojovací a podpůrné prvky, které se v těle po definované době samy rozpadnou a není nutné je operativně odstraňovat. Jedná se například o chirurgické nitě⁴⁻⁶, stenty⁷⁻¹⁰, membrány pro regeneraci tkáně¹¹⁻¹³ a podobně. S úspěchem se využívají i jako nosi-

če léčiv¹⁴⁻¹⁶. Pro tento účel je léčivo zabudováno do struktury polymeru a během degradace je postupně uvolňováno do ošetřované tkáně.

Pro zdravotnické účely se často používají polymery založené na laktonech, především polymléčná kyselina (PLA), polyglykolová kyselina (PGA) a jejich kopolymer (PLGA), dále poly(*p*-dioxanon) (PPDX, polydioxanon), polykaprolakton (PCL) a polytrimethylenkarbonát (PTMC). Jedná se o alifatické polyestery, obvykle vyráběné polymerizací s otevíráním kruhu (tzv. ring-opening polymerization). Štěpení jejich řetězců je způsobováno hydrolyzou na esterové skupině. Uvedené polymery mají vzájemně odlišné vlastnosti (např. rychlost degradace, pevnost v tahu, pružnost apod.), které lze navíc upravit vytvářením vhodných kopolymerů¹⁷.

Polydioxanon, patentovaný již v roce 1977, je v dnešní době hojně využíván pro medicínské účely. Strukturální vzorec PPDX je uveden na obr. 1. Za hydrolytickou degradaci PPDX je zodpovědná esterová skupina, jejíž vazba C–O je štěpena vodou¹⁸. Protože polymerní řetězec PPDX má oproti PLA a PGA menší podíl esterových vazeb, je jeho degradace pomalejší¹⁹. Tato vlastnost je výhodná v aplikacích vyžadující delší působení podpůrného prvku na ošetřovanou tkáň, jako například léčba benigních a maligních striktur jícnu^{7,8} apod. Polymer obsahuje velmi

Obr. 1. Strukturální vzorec poly(*p*-dioxanonu)

ohebnou skupinu etherovou. Právě díky ní jsou vlákna vyrobená z PPDX velmi pružná¹⁷. Polydioxanonová vlákna – obvykle vyráběná extruzí za tepla – tak nacházejí uplatnění jako chirurgické nitě nebo jsou z nich vyráběny degradabilní stenty.

Teplota skelného přechodu PPDX je přibližně $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání okolo $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, v závislosti na molekulové hmotnosti a předchozí teplotní historii. Díky těmto hodnotám teplot je PPDX za běžných podmínek semikrystalický s krystalinitou cca 50 % (cit.^{18,20}). V produktech vyráběných vysušením či odléváním jsou z krystalových lamel formovány typické sférolity, avšak ve vláknech extrudovaných za tepla vznikají malé, vysoce uspořádané lamely s výškou okolo 10 nm (cit.^{19,20}).

Pro hydrolytickou degradaci semikrystalických polymerů je typické, že přednostně degraduje jejich amorfní fáze a teprve později fáze krystalická. Důvodem je, že voda lépe difunduje neuspořádanou amorfní strukturu. Depolymerizací uvolněné monomery nebo oligomery s velmi krátkými řetězci jsou poté vyplavovány z materiálu ven. Krystalinita polymeru se tedy v průběhu degradace zvyšuje, a to má vliv na jeho vlastnosti^{17,22,23}.

Stanovení krystalinity může posloužit mj. k posouzení míry degradace polymeru. Pro stanovování krystalinity polymerů jsou běžně využívány diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a rentgenová difrakce², avšak pro tento účel je možné využít i Ramanovu spektroskopii²³.

Ramanova spektroskopie je sesterskou metodou k infračervené spektroskopii. Zatímco infračervená spektroskopie sleduje závislost poklesu intenzity polychromatického budícího záření na jeho vlnové délce, v Ramanově spektroskopii ozařujeme vzorek monochromatickým zářením (laserem) a měříme tzv. Ramanův rozptyl, mající původ ve změně vibračně-rotacních stavů molekul vzorku. I rozptýlené Ramanovo záření lze popsat jako závislost intenzity na vlnové délce (přesněji na vlnočtu Ramanova posunu). Podstatné je, že podobně jako v infračervených spektrech, i v Ramanových spektrech lze nalézt pásy odpovídající různým vibračně-rotacním stavům molekul či jejich funkčních skupin²⁴.

Nejčastěji se Ramanova spektroskopie využívá ke zjišťování chemického složení látek²⁵, ale její principy se uplatňují i v řadě „exotických“ metod, například v měření Ramanovy optické aktivity²⁶. Dobré výsledky přináší Ramanova spektroskopie i při výzkumu polymerů, kde též umožňuje určovat prostorové uspořádání polymerních řetězců²⁷, a pokud lze ve spektru semikrystalického materiálu rozlišit pásy krystalické a amorfní fáze, určovat jeho krystalinitu²³.

Pro hlubší výzkum materiálů je však potřeba provést podrobnou analýzu příslušných oblastí Ramanova spektra. Proto je cílem této studie detailní rozbor spekter v oblasti vlnočtu 1733 cm^{-1} , která je vhodná pro zjišťování krystalinity PPDX. Pokud je nám známo, analýza v předložené podrobné formě dosud nebyla publikována.

Experimentální část

Předložená studie je založena na výzkumu popsaném v cit.²⁸, jehož předmětem byla degradace biliárních degradovatelných stentů vyrobených firmou ELLA-CS (Hradec Králové, Česká republika). Tyto stenty mají délku 80 mm, průměr 8 mm a jsou vyráběny z PPDX vláken o průměru 0,39 mm. Vlákna obsahují <0,1 hm.% barviva Solvent Violet 13. Stenty byly degradovány ve fosfátovém pufru (PBS) po dobu 0, 3, 6 a 9 týdnů (8 stentů pro každou dobu degradace) při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Počáteční pH pufru bylo 7,45, během degradace hodnota pH postupně klesla na 7,19. Po degradaci byly stenty rozpleteny na volná vlákna, která byla následně nastříhána na kousky o délkách 7 a 3 cm, podle druhu analýzy.

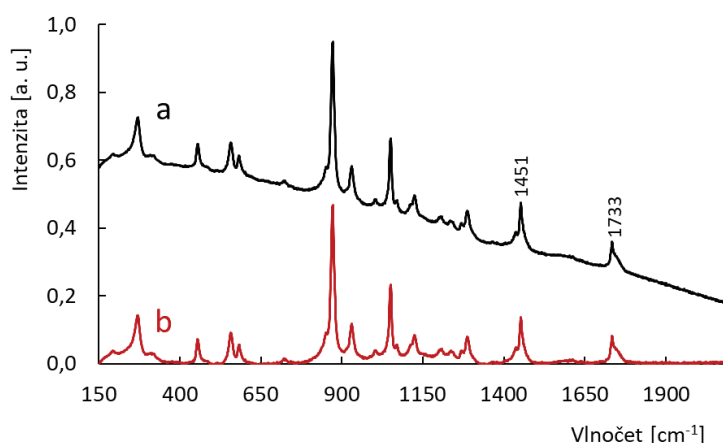
Ve výše citovaném výzkumu byly testovány mechanické vlastnosti popsaných vláken, prováděny termální analýzy metodou DSC a sledována Ramanova spektra. Z výsledků této studie využíváme hodnoty krystalinity vzorků zjištěné pomocí DSC a Ramanova spektra, která důkladně vyhodnocujeme a diskutujeme.

Pro registraci Ramanových spekter byl použit Ramanův mikrospektrometr XploRA PLUS (Horiba, Kyoto, Japonsko) s excitačním laserem o vlnové délce 785 nm a výkonu 10 mW. Všechna analyzovaná vlákna byla ve spektrometru orientována rovnoběžně s rovinou polarizace excitačního laseru, aby nedošlo ke zkreslení výsledků v důsledku polarizační závislosti intenzity Ramanova rozptylu. Na každém vzorku vlákna byla zaznamenána tři dlouhá přehledová spektra (v rozsahu vlnočtů Ramanova posunu $150\text{ až }2100\text{ cm}^{-1}$) a 32 krátkých detailních spekter (v rozsahu $1550\text{ až }1860\text{ cm}^{-1}$) v matici 4×8 bodů vzdálených od sebe 10 μm . Záznam přehledových spekter byl prováděn s difrakční mřížkou o hustotě vrypů 1200 g mm^{-1} a detailních spekter s difrakční mřížkou o hustotě vrypů 1800 g mm^{-1} , která poskytuje vyšší spektrální rozlišení. Záznam spekter byl řízen a data zpracována softwarem LabSpec 6 version 6.5.2.11, dodávaným k použitému spektrometru. Plochy ramének pásu v oblasti 1733 cm^{-1} byly vypočteny v programu MATLAB R2020a (MathWorks, Natick, MA, USA).

Výsledky a diskuse

Vyhodnocení přehledových Ramanových spekter

Typické Ramanovo spektrum vlákna PPDX, naměřené při výše uvedené orientaci vlákna, je uvedeno na obr. 2. Černou barvou je zobrazeno naměřené neupravené spek-



Obr. 2. Typický průběh Ramanova spektra vlákna z PPDX; a) černá křivka znázorňuje původní spektrum, b) červená křivka je spektrum po korekci základní linie

trum po 9 týdnech degradace, červenou barvou totéž spektrum po korekci základní linie, tedy po odečtu fluorescenčního pozadí. Spektra nedegradovaného vlákna a vláken degradovaných po dobu kratší než 9 týdnů se na první pohled příliš neliší od spektra z obr. 2, avšak lze mezi nimi nalézt několik důležitých rozdílů. Především se jedná o oblast pásu s raménkem na vlnočtu 1733 cm^{-1} , která bude podrobně diskutována v dalším textu. Ve spektrech degradovaných vláken dále téměř chybí pásy barviva, jimž náleží vlnočty 483, 1242, 1403, 1610 a 1638 cm^{-1} . Také se ukázalo, že toto barvivo – přestože je ve vláknech přítomno pouze v malém množství – je významným zdrojem fluorescence.

Všechna spektra obsahují na vlnočtu 870 cm^{-1} výrazný pás, který odpovídá symetrickým valenčním vibracím C–O–C. Dále stojí za zmínku pás v poloze 1048 cm^{-1} , patřící valenčním vibracím C–C, a pás v poloze 1451 cm^{-1} , který pravděpodobně přísluší deformačním vibracím skupin $-\text{CH}_2-$. Pro tuto studii je však nejdůležitější pás v oblasti okolo 1733 cm^{-1} , který se skládá z ostrého píku s raménkem a náleží karbonylové skupině C=O (cit.^{21,23}).

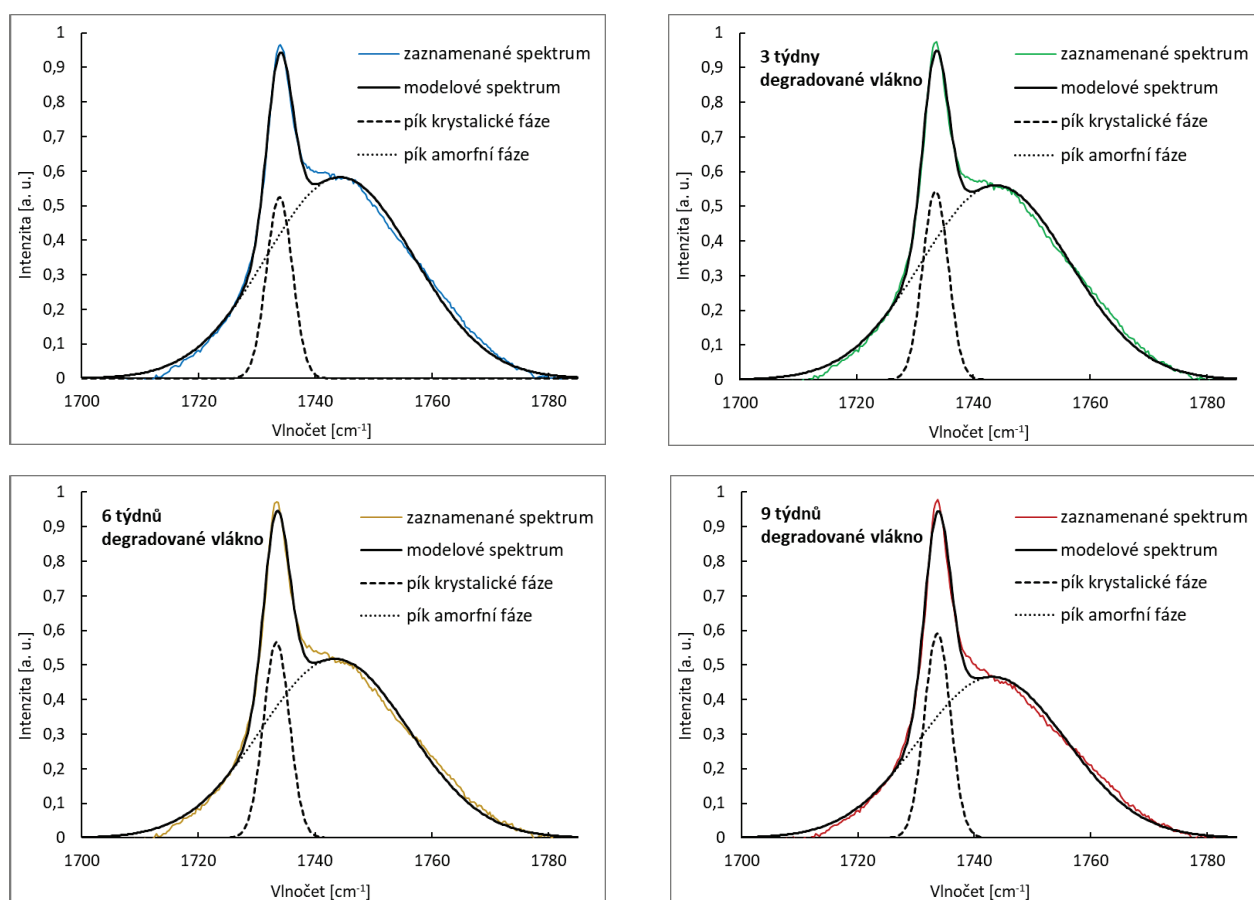
Tyto pásy, jež všechny patří PPDX, se během degradace významně nemění, avšak jejich výšky jsou silně závislé na úhlu pootočení vlákna vůči rovině polarizace laseru. To svědčí o tom, že úzké pásy odpovídají vysoce prostorově orientovaným, a nejspíše tedy krystalovým, fázím polymeru. Pás vibrace C=O (1733 cm^{-1}) dosahuje maximální výšky, pokud je vlákno orientováno kolmo k rovině polarizace laseru. Je to dáno tím, že páteřní řetězce jsou v krystalových lamelách dosti přesně uspořádány paralelně s osou vlákna. Vazba C=O, která je na páteřní řetězce kolmá, je tedy při této orientaci vlákna rovnoběžná s rovinou polarizace, což vede k nejvyšší intenzitě Ramanova rozptylu. Naopak při otočení vlákna o 90° je vazba C=O kolmá k rovině polarizace laseru a intenzita Ramanova rozptylu je minimální²¹.

Spektrum v oblasti 1733 cm^{-1}

Spektrální pás v poloze 1733 cm^{-1} je charakteristický raménkem na pravé straně (směrem k vyšším vlnočtům). Toto raménko je jedinou oblastí spektra, ve které lze pozorovat změny způsobené hydrolytickou degradací PPDX. Zatímco výška úzkého píku na 1733 cm^{-1} zůstává stejná, jeho raménko s časem degradace klesá. Ve studii²³ se předpokládá, že tento pokles souvisí s růstem krystalinity ve smyslu snižování podílu amorfni fáze vůči fázi krystalické.

Degradaci PPDX pomocí infračervené spektroskopie zkoumali Kurowiak a spol.²⁹ Přestože v Ramanových a infračervených spektrech mají pásy stejných vibrací odlišnou intenzitu, v jejich studii byl v okolí vlnočtu 1733 cm^{-1} též pozorován pás s raménkem, které se během degradace zmenšovalo. To naznačuje, že ke studiu průběhu degradace PPDX je možné využít i infračervenou spektroskopii, nicméně nám se více osvědčila spektroskopie Ramanova jako metoda citlivější pro oblast vlnočtu 1733 cm^{-1} . Na obr. 3 jsou detaily pásu v okolí vlnočtu 1733 cm^{-1} pro degradace trvající 0, 3, 6 a 9 týdnů. Barevné křivky znázorňují průběhy zaznamenaných a zprůměrovaných detailních spekter v rozsahu 1700 až 1800 cm^{-1} . Je vidět, že s postupující degradací dochází k relativnímu poklesu raménka vůči vrcholu píku. Z těchto křivek byly vypočteny normalizované plochy raménka (v rozsahu vlnočtů 1736 až 1749 cm^{-1}), které jsou uvedeny v tabulce I.

V programu LabSpec 6 byly pro tyto zjištěné průběhy nalezeny modelové jednoduché píky, z nichž se spektrální pás skládá: ostrý pík krystalické fáze (s maximem na vlnočtu 1733,5 cm^{-1}) a širší, nižší pík fáze amorfni (s maximem na vlnočtu 1743,5 cm^{-1}). Na obr. 3 jsou píky krystalické fáze vyznačeny přerušovanou čarou a píky amorfni fáze tečkovanou čarou. Hladká černá křivka v každém grafu představuje součet těchto píků. Tyto souč-



Obr. 3. Porovnání tvaru spektrálních pásů v okolí vlnočtu 1733 cm^{-1} pro různé dlouhé doby degradace. Barevné křivky představují zaznamenaná spektra, černě jsou vykresleny navržené modelové píky a jejich součet

Tabulka I

Porovnání krystalinity různě degradovaných vláken PPDx s plochou raménka pásu v oblasti 1733 cm^{-1} Ramanova spektra

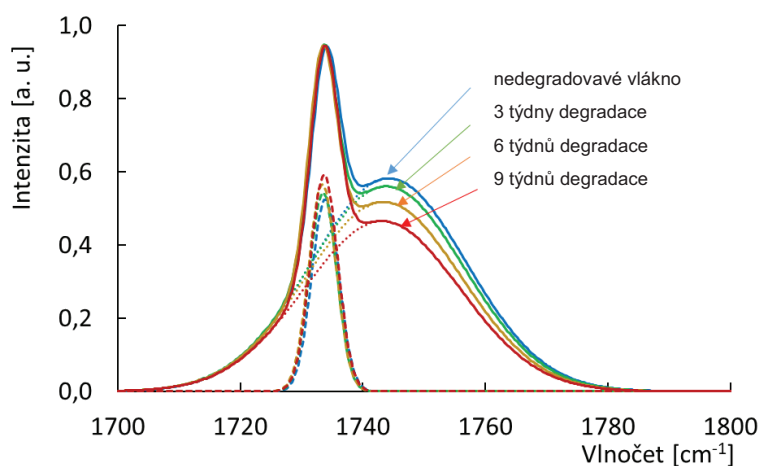
Doba degradace	Krystalinita [%]	Plocha raménka [cm^{-1}]
Nedegradované	46,4	11,06
3 týdny	48,6	10,67
6 týdnů	51,3	9,86
9 týdnů	55,2	8,86

tové křivky, které můžeme nazvat modelová spektra, dobře odpovídají naměřeným spektrům, takže lze předpokládat, že nalezené modelové píky odpovídají skutečným vibracím.

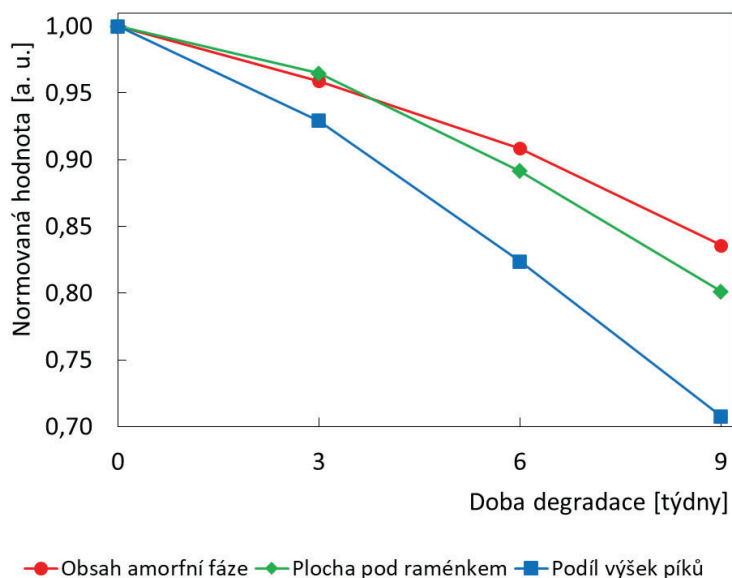
Nalezené polohy píků odpovídají hodnotám uvedeným v práci³⁰, kde Zheng a spol. identifikovali v infračervených spektrech PPDx pás odpovídající vazbě C=O

v krystalické fázi na vlnočtu 1734 cm^{-1} a pás téže vazby v amorfni fázi na vlnočtu 1754 cm^{-1} . Hodnota pro amorfni fázi se vůči našim výsledkům poněkud liší, pravděpodobnou příčinou je odlišná technologie přípravy vzorků. Zatímco uvedená studie byla prováděna na přetaveném materiálu s neuspořádanou vnitřní strukturou, našimi vzorky byla extrudovaná vlákna, jejichž vnitřní struktura je značně uspořádaná²¹.

Modelové křivky pro různé doby degradace jsou porovnány na obr. 4. Opět je zde vidět, že s rostoucí dobou degradace se snižuje pík amorfni fáze, zatímco úzký pík krystalické fáze roste. Tyto změny lze pozorovat jednak vzájemně mezi těmito dvěma píky, ale i vůči jejich součtu (tj. modelovému spektru) vyznačenému spojitou čarou. Modelové součtové spektrum má pro všechny doby degradace neměnné maximum, z čehož vyplývá, že na výšce tohoto maxima se podílí i amorfni fáze. Ta však s degradací ubývá rychleji než fáze krystalická, tudíž maximum tohoto pásu by se mělo s postupem degradace snižovat oproti jiným významným pásům v Ramanově spektru vlákna z PPDx. Tento jev se nepodařilo zaregistrovat,



Obr. 4. Porovnání navržených modelových píků v okolí vlnočtu 1733 cm^{-1} pro různé doby degradace vlákna z PPDx. Přerušovanou čarou je vyznačen pík krystalické fáze, tečkovanou čarou pík amorfické fáze a spojitou čarou jejich součet. Porovnávané křivky odpovídají průběhům z obr. 3



Obr. 5. Pokles obsahu amorfické fáze, plochy pod raménkem spektrálního pásu v oblasti 1733 cm^{-1} a podílu výšek modelových píků amorfické a krystalické fáze v průběhu degradace vlákna z PPDx

zřejmě je příliš malý oproti nejistotám způsobeným šumem měření i nepřesnostmi korekce základní linie.

Tabulka I podává srovnání hodnot krystalinity získaných z DSC s normovanými hodnotami plochy raménka spektrálního pásu v oblasti 1733 cm^{-1} . Čísla uvedená v této tabulce se však těžko porovnávají, protože krystalinita – na rozdíl od plochy raménka – s délkou degradace roste. Přehledněji je souvislost mezi mírou krystalinity a velikostí raménka v průběhu degradace vyobrazena v grafu na obr. 5. Místo krystalinity je zde uvedena amor-

ficita, tedy podíl amorfické fáze, který lze číselně vyjádřit jako doplněk ke krystalinitě do 100 procent. Amorficita je na obr. 5 porovnána s plochou raménka, vypočtenou z naměřených dat, a s podílem výšek modelových píků amorfické a krystalické fáze, navržených softwarem LabSpec 6. Hodnoty všech tří křivek jsou přepočteny tak, aby pro nedegradovaný vzorek měly hodnotu 1.

Díky tomu, že průběhy křivek jsou monotónní, můžeme říci, že existuje jednoznačná závislost mezi krystalinitou, plochou raménka a podílem výšek píků amorfické

a krystalické fáze. Průběh křivky s plochou pod raménkem téměř odpovídá průběhu krystalinity. To je však spíše náhoda, přesný tvar křivky je například závislý na výběru rozsahu vlnočtů, ve kterém se plochy počítají.

Závěr

Předložený příspěvek představil možnost využití Ramanovy spektroskopie pro určení krystalinity polymerů během jejich hydrolytické degradace. Diskutované výsledky byly získány pro vlákna z polydioxanonu, lze však předpokládat, že obdobný postup bude použitelný i pro jiné polymery, v jejichž Ramanových spektrech se vyskytují vzájemně rozlišitelné píky pro krystalickou a amorfni fázi. Na základě důkladné analýzy spektra v oblasti 1733 cm^{-1} lze říci, že měření plochy raménka tohoto pásu je jednoduché a zřejmě vhodné pro operativní přehledové měření, zatímco nalezení oddělených piků pro obě fáze umožňuje hlubší pohled na spektrum zkoumaného materiálu, což je vhodné především pro detailní výzkum.

Autoři děkují Ing. Zuzaně Zmrhalové, Ph.D. z Univerzity Pardubice za stanovení krystalinity studovaných vzorků.

LITERATURA

- Vohlídal J.: Chem. Teach. Int. 3, 213 (2021).
- Rodriguez F., Cohen C., Ober C. K., Archer L. A.: *Principles of Polymer Systems*, 6. vyd. CRC Press, Boca Raton 2015.
- Zaaba N. F., Jaafar M.: Polym. Eng. Sci. 60, 2061 (2020).
- Pillai C. K. S., Sharma C. P.: J. Biomater. Appl. 25, 291 (2010).
- Greenwald D., Shumway S., Albear P., Gottlieb L.: J. Surg. Res. 56, 372 (1994).
- Kreszinger M., Toholj B., Ačanski A., Baloš S., Cincović M., Pećin M., Lipar M., Smolec O.: Vet. Arh. 88, 235 (2018).
- Černá M., Köcher M., Válek V., Aujeský R., Neoral Č., Andrašina T., Pánek J., Mahathmakanthi S.: CardioVascular and Interventional Radiology 34, 1267 (2011).
- Repici A., Vleggaar F. P., Hassan C., van Boeckel P. G., Romeo F., Pagano N., Malesci A., Siersema P. D.: Gastrointestinal Endoscopy 72, 927 (2010).
- Mauri G. a 15 spoluautorů: Eur. Radiol. 26, 4057 (2016).
- Bezrouk A., Hosszu T., Hromadko L., Zmrhalova Z. O., Kopecek M., Smutny M., Krulichova I. S., Macac J. M., Kremlacek J.: PLoS One 15, e0235842 (2020).
- Khan M. U. A., Aslam M. A., Bin Abdullah M. F., Hasan A., Shah S. A., Stojanović G. M.: Mater. Today Chem. 34, 101818 (2023).
- Liu X., He X., Jin D., Wu S., Wang H., Yin M., Aldalbahi A., El-Newehy M., Mo X., Wu J.: Acta Biomater. 108, 207 (2020).
- Wang J., Wang L., Zhou Z., Lai H., Xu P., Liao L., Wei J.: Polymers 8, 115 (2016).
- Borandeh S., van Bochove B., Teotia A., Seppälä J.: Adv. Drug Delivery Rev. 173, 349 (2021).
- Liechty W. B., Kryscio D. R., Slaughter B. V., Peppas N. A.: Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 1, 149 (2010).
- Šnejdrová E., Dittrich M.: Chem. Listy 105, 27 (2011).
- Domb A. J., Kost J., Wiseman D. M.: *Handbook of Biodegradable Polymers*. CRC Press, Boca Raton 1997.
- Yang K. K., Wang X. L., Wang Y. Z.: J. Macromol. Sci., Polym. Rev. 42, 373 (2002).
- Ooi C. P., Cameron R. E.: J. Biomed. Mater. Res. 63, 280 (2002).
- Svoboda R., Machotová J., Krbal M., Jezbera D., Nalezinková M., Loskot J., Bezrouk A.: Polymer 277, 125978 (2023).
- Jaidann M., Brisson J.: J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys. 46, 406 (2008).
- Zong X. H., Wang Z. G., Hsiao B. S., Chu B., Zhou J. J., Jamiolkowski D. D., Muse E., Dormier E.: Macromolecules 32, 8107 (1999).
- Loskot J., Jezbera D., Bezrouk A., Doležal R., Andrýs R., Francová V., Miškář D., Fučíková A. M.: Materials 14, 5462 (2021).
- Smith E., Dent G.: *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, 2. vyd. Wiley, Hoboken 2019.
- Jezbera D., Loskot J., Miškář D., Pleska M., Thér R.: Chem. Listy 115, 320 (2021).
- Bouř P.: Chem. Listy 117, 722 (2023).
- Loskot J., Jezbera D., Loskot R., Bušovský D., Barylski A., Glowka K., Duda P., Aniołek K., Voglová K., Zubko M.: Polym. Test. 123, 108055 (2023).
- Loskot J. a 10 spoluautorů: Polymers 14, 938 (2022).
- Kurowiak J., Mackiewicz A., Klekiel T., Będziński R.: Acta Mechanica et Automatica 17, 477 (2023).
- Zheng Y., Zhou J., Du F., Bao Y., Shan G., Zhang L., Dong H., Pan P.: Cryst. Growth Des. 19, 166 (2019).

D. Jezbera^a, J. Loskot^a, M. Nalezinková^b, A. Myslivcová Fučíková^b, and A. Bezrouk^c
^aDepartment of Physics, ^bDepartment of Biology, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic, ^c Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic):
The Use of Raman Spectroscopy to Assess the Degradation of Poly(p-dioxanone) Fibre Intended for Medical Purposes

Raman spectroscopy can be used in chemistry not just to determine chemical composition, but also to obtain

further information on the material structure. In the spectra of semi-crystalline polymers, distinct bands characteristic of the crystalline or the amorphous phase can be found, the degree of crystallinity determined from them, and the degree of polymer degradation estimated from the crystallinity. In the present study, changes in the 1733 cm^{-1} band shoulder in Raman spectra of poly(*p*-dioxanone) fibres subjected to hydrolytic degradation were evaluated. For different degradation periods, the areas under the shoulder of this band were calculated and a model deconvolution of this band into assumed

crystalline and amorphous peaks was also performed. The areas under the shoulder, as well as the model peaks' parameters, were compared with the crystallinity values obtained by differential scanning calorimetry, achieving a good agreement. This work shows an example of using Raman spectroscopy when studying the hydrolytic degradation of polymers.

Keywords: Raman spectroscopy, polymer degradation, stent, polydioxanone, crystallinity, modelling of spectra



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

STANOVENÍ VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V LEVANDULI LÉKAŘSKÉ VYPĚSTOVANÉ V ČESKÉ REPUBLICE

IVETA ŠÍSTKOVÁ^a, VOJTĚCH KRUŽÍK^a, IVETA HORSÁKOVÁ^a, HELENA NEUMANNOVÁ^b
a HELENA ČÍŽKOVÁ^a

^a Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 160 00 Praha 6, ^b Tři věže s. r. o., Lišnice, Česká republika
iveta.sistkova@vscht.cz

Došlo 20.10.23, přijato 13.3.24.

Levandule jako rostlina a levandulová silice mají široké spektrum biologických účinků, levandule se v kosmetice a léčivých přípravcích využívá již od dob starého Řecka a Říma. V dnešní době se na trhu vyskytuje nepřeberná škála produktů obsahujících levanduli, ať už jako takovou (levandulový čaj nebo sušenky či jiné pochutiny s květy levandule), případně obsahující levandulovou silici či vodné extrakty levandule (kosmetika, drogerie, potraviny či farmaceutické přípravky). Tato práce se zaměřuje na zjištění obsahu silice, zastoupení těkavých látek a stanovení celkových fenolů a flavonoidů u vzorků levandule lékařské z Levandulového údolí a porovnání výsledků se složením levandulových květů prodávaných jako bylinné čaje v tržní síti České republiky.

Klíčová slova: levandule lékařská, *Lavandula angustifolia*, silice, fenoly, flavonoidy

Úvod

Levandulová silice (*Lavandulae etheroleum*) je definována Českým lékopisem jako silice získaná z kvetoucích vrcholků druhu *Lavandula angustifolia* Mill. (syn. *Lavandula officinalis* Chaix) destilací s vodní parou, přičemž by sušený květ levandule měl obsahovat nejméně 13 ml silice na kg (cit.¹). Kromě destilace s vodní parou lze k získání silice využít i superkritickou extrakci CO₂ či extrakci do hexanu². Vedlejším produktem destilace silice je vznik hydrolátu. Dominantními látkami levandulové silice (celkem přes 300 látek) jsou linalool a linalyl-acetát, látky s typickou levandulovou vůní, jejichž obsah a vzájemný poměr určuje kvalitu silice. Obě látky se v autentické levandulové silici vyskytují převážně jako (*R*)-enantiomery, obsah (*S*)-linaloolu a (*S*)-linalyl-acetátu by neměl překročit 12 % resp. 1 % (cit.¹). Mezi další látky mající pozitivní vliv na výslednou vůni silice patří borneol, α -terpineol, lavandulyl-acetát, karyofylen a linalool oxid. Naproti tomu zvýšený obsah ocimenu, 1,8-cineolu, kafru a terpinen-4-olu má negativní vliv na výslednou vůni silice³.

Porovnání procentuálního zastoupení vybraných těkavých látek v levandulové silici různého původu^{5,6} s požadavky Českého lékopisu¹ a mezinárodní normy ISO 3515:2022 (cit.⁴), která definuje požadavky pro levandulovou silici (*Lavandula angustifolia* Mill.) uvádí tab. I.

Mezi biologicky aktivní látky obsažené v levanduli lékařské patří vedle dalších látek také fenoly, resp. jejich hlavní podskupina flavonoidy, které mají antioxidační

účinky. Stanovený obsah fenolů a flavonoidů mimo jiného (pěstovaná odrůda, klimatické a geografické podmínky, doba sklizně) závisí na metodách a podmínkách extrakce. Běžně používanými metodami extrakce jsou macerace, odvar, Soxhletova extrakce, hydrodestilace či moderní postupy, jako je ultrazvuková (UAE), mikrovlnná, tlaková kapalinová či zrychlená (akcelerovaná) extrakce, při kterých jsou využívány různé druhy extrakčních rozpouštědel (voda, methanol či ethanol (o různé koncentraci), petrol-ether aj.), lze využít i superkritickou fluidní extrakci (CO₂, 1,1,1,2-tetrafluorethan)^{7,8}. Celkový obsah fenolů se vyjadřuje nejčastěji jako obsah kyseliny gallové v mg na gram vzorku (gallic acid equivalents, GAE), obsah flavonoidů pak jako obsah katechinů v mg na gram vzorku (catechin equivalents, CA). Pro stanovení celkového obsahu flavonoidů je jednou z nejčastěji používaných metod spektrofotometrické stanovení založené na tvorbě barevných komplexů s hliníkem. V literatuře se nejčastěji vyskytují dva postupy stanovení (s a bez NaNO₂) s vyjádřením výsledku pro několik sloučenin z různých tříd flavonoidů. Postupy s NaNO₂, který byl použit i v této práci, jsou specifické pro rutin, luteolin a katechiny⁹. Při porovnání extraktů levandule lékařské získaných macerací (50% ethanol, 30 min), odvarem (voda, var, 30 min) a ultrazvukovou extrakcí (UAE, 50% ethanol, 1 h celkem) byly zjištěny nejvyšší obsahy celkových fenolů u UAE 23–33 mg GAE/g, následovaný macerací (17–28 mg GAE/g) a odvarem (15–21 mg GAE/g). Stejně pořadí účinnosti bylo získáno i u stanovení celkového obsahu flavonoidů (14–24 mg

Tabulka I

Porovnání procentuálního zastoupení vybraných těkavých látek dle Českého lékopisu¹ levandulové silice z různých literárních zdrojů

Sloučenina	Český lékopis ¹	ISO 3515:2002 (cit. ²)	Evropa ^a (cit. ⁵)	Mimo Evropu ^b (cit. ⁵)	Ukrajina ^c (cit. ⁶)
Oktan-3-on, %	0,1–5,0	≤ 3,0	nd–1,6	nd–0,4	0,0–1,0
D-Limonen, %	≤ 1,0	≤ 1,0	0,3–0,9	nd–3,1	0,0–0,6
1,8-Cineol, %	≤ 2,5	≤ 1,3	< 0,05–8,4	nd–3,1	0,0–1,1
Linalool, %	20,0–45,0	20,0–43,0	23,1–36,2	23,6–33,3	11,4–46,7
Kafr, %	≤ 1,2	≤ 1,5	0,5–6,9	nd–9,8	0,1–0,8
Lavandulol, %	≥ 0,1	≤ 3,0	nd–1,6	nd–1,2	0,0–7,8
Terpinen-4-ol, %	0,1–8,0	≤ 8,0	nd–16,1	nd–14,9	1,2–18,7
α-Terpineol, %	≤ 2,0	≤ 2,0	0,3–5,0	nd–6,3	0,5–4,5
Linalyl-acetát, %	25,0–47,0	25,0–47,0	14,2–39,9	19,7–47,6	7,4–44,2
Lavandulyl-acetát, %	≥ 0,2	≤ 8,0	nd–4,4	nd–6,5	0,2–12,3

^a 9 vzorků, ^b 8 vzorků, ^c 13 vzorků, nd – nedetekováno

CA/g pro UAE; 10–20 mg CA/g pro maceraci a 8–16 mg CA/g pro odvar⁷.

Tato práce se zaměřuje na zjištění obsahu silice, zastoupení těkavých látek a stanovení celkových fenolů a flavonoidů u levandule lékařské, odrůda Munstead pocházející z Levandulového údolí u obce Zdice – Chodouň (Česká republika) a porovnání výsledků se vzorky levandule zakoupené v tržní síti.

Experimentální část

Vzorky

Soubor analyzovaných vzorků shrnuje tab. II. U vzorků květy se stonky (tj. květy s květonosnými lodyhami) byla průměrná hmotnost bilance květu a květonosné lodyhy 55 : 45. Obsah vody ve vzorcích sušených květů a květu se stonky se pohyboval v rozmezí 8–10 %.

Destilace silice s vodní parou

Objem silice ve vzorcích byl stanoven destilací s vodní parou za podmínek uvedených v Českém lékopise¹, výsledek byl přepočítán na kg vzorku. Stanovení silice bylo provedeno v materiálu, jak byl dodán, tedy bez vysušení, a to z důvodu porovnání obsahu silice mezi různými matricemi.

Stanovení těkavých látek

Získané vzorky silice byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem (GC/MS). Pro identifikaci těkavých látek byly použity standardy látek (D-limonen, linalool, terpinen-4-ol, α-terpineol a linalyl-acetát), ostatní sloučeniny byly identifikovány na základě

srovnání spekter s NIST knihovnou hmotnostních spekter (NIST 14, cit.¹⁰) a pomocí Kovatsových retenčních indexů RI. Vzhledem k podobné retenční charakteristice látek D-limonenu (RI=1027) a 1,8-cineolu (RI=1032) na použité koloně (DB-5) se nepodařilo tyto dvě látky separovat, z tohoto důvodu jsou výsledky prezentovány sumou těchto látek. Každý ze vzorků silice byl proměřen 2krát. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentuální zastoupení látky ve vzorku.

Příprava extraktů pomocí ultrazvuku

Homogenizovaný vzorek byl extrahován v roztoku ethanolu pomocí ultrazvuku dle podmínek metody dle⁷ (UAE, 50% ethanol, 1 h celkem). Všechny vzorky byly připraveny v paralelním stanovení. Získané extrakty se do doby analýzy uchovávaly při –18 °C.

Stanovení celkových fenolů

Ke stanovení celkového obsahu fenolů (TPC, Total Phenolic Content) byla použita modifikovaná metoda dle⁷. Celkové fenoly v extraktu byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s Folin-Ciocalteu činidlem a Na₂CO₃ při vlnové délce 765 nm. Všechny vzorky byly měřeny v paralelním stanovení a výsledky vyjádřeny jako mg kyseliny gallové na gram vzorku na základě získané kalibrační křivky $y = 0,0011x - 0,0085$, $R^2 = 0,994$ (mg kyseliny gallové/g vzorku).

Stanovení celkových flavonoidů

Ke stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC, Total Flavonoid Content) byla použita modifikovaná metoda dle⁷. K extraktu byl přidán roztok NaNO₂ a AlCl₃ a po 5 min byl přidán 1M NaOH. Flavonoidy v extraktu

Tabulka II
Seznam analyzovaných vzorků

Č.	Označení	Popis
1.	Květy č. 1	<i>Lavandula angustifolia</i> odrůda Munstead, Levandulové údolí, sklizeň 2022, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
2.	Květy č. 2	Vzorek z tržní sítě – levandulový květ (<i>Flos lavandulae</i>), bylinný čaj, značka: čaj bylináře, výrobce: Mediate, s. r. o., DMT 10/2024, země původu: neznámá
3.	Květy č. 3	Vzorek z tržní sítě – levandule květ, značka: Grešík, výrobce: Natura s. r. o., DMT 11/2024, původ: EU a mimo EU
4.	Květy č. 4	Vzorek z tržní sítě – levandule květ (<i>Lavandula angustifolia</i>), značka: Sonnentor, výrobce: Sonnentor s. r. o., DMT 11/2022, země původu: Albánie
5.	Květy se stonky č. 1	<i>Lavandula angustifolia</i> odrůda Munstead, Levandulové údolí, sklizeň 2021, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
6.	Květy se stonky č. 2	<i>Lavandula angustifolia</i> odrůda Munstead, Levandulové údolí, 1. sklizeň 2022, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
7.	Květy se stonky č. 3	<i>Lavandula angustifolia</i> odrůda Munstead, Levandulové údolí, 2. sklizeň 2022, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
8.	Stonky	<i>Lavandula angustifolia</i> odrůda Munstead, Levandulové údolí, 1. sklizeň 2022, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
9.	Produkt č. 1	100% BIO esenciální olej z Levandule Chodouňské, výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
10.	Produkt č. 2	BIO levandulový hydrolát z Levandule Chodouňské, výrobce: Tři věže s. r. o., DMT 08/2023, země původu: ČR
11.	Produkt č. 3	BIO esenciální olej z Levandule Chodouňské (10ml), výrobce: Tři věže s. r. o., země původu: ČR
12.	Produkt č. 4	100% esenciální olej z levandule, země původu: Francie

Pozn.: Termín „esenciální olej“ je obchodní název převzatý z doslovného anglického překladu *essential oil*, a jedná se tedy o silici levandule lékařské.

byly následně stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm. Všechny vzorky byly měřeny v paralelním stanovení a výsledky vyjádřeny jako mg katechinu na gram vzorku na základě získané kalibrační křivky $y = 0,0016x + 0,0014$, $R^2 = 1,000$ (mg katechinu/ g vzorku).

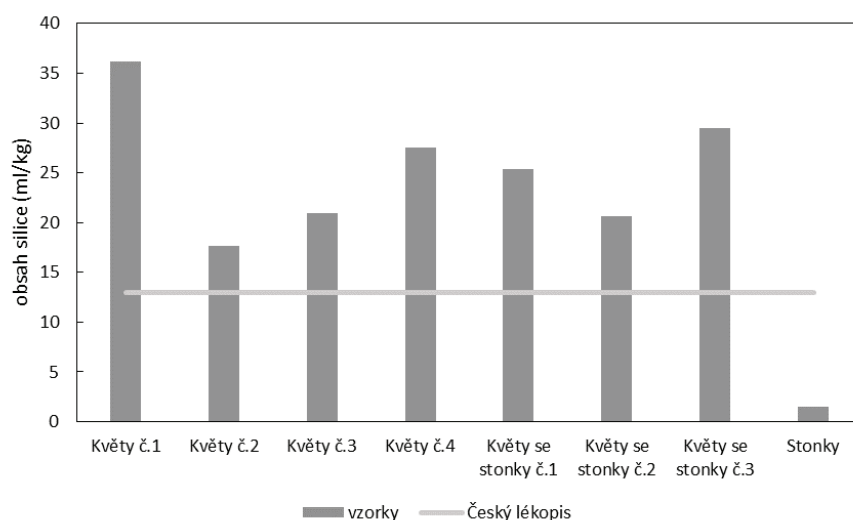
Výsledky a diskuse

Silice ve vzorcích byla stanovena dle Českého lékopisu po destilaci s vodní parou objemově, výsledky znázorňuje obr. 1. Jak je vidět, všechny analyzované vzorky květů splňují požadavek Českého lékopisu na minimální obsah silice (13 ml/kg bezvodé drogy¹, limit při zohlednění 10% vlhkosti vzorků je 11,7 ml/kg vzorku). Stejně tak splňují požadovaný minimální obsah silice vzorky květů se stonky; samotné stonky levandule jsou na silici chudé (pouze 1,5 ml/kg). Co se týká výrobků z Levandulového údolí: dle předpokladů produkt č. 1 (100% BIO esenciální olej z levandule Chodouňské) obsahuje skoro 100 % silice (960 ml/litr výrobku), obdobné výsledky byly zjištěny i u produktu č. 3 a č. 4. Oproti tomu produkt č. 2 – hydrolát, který vzniká jako vedlejší produkt při získávání silice,

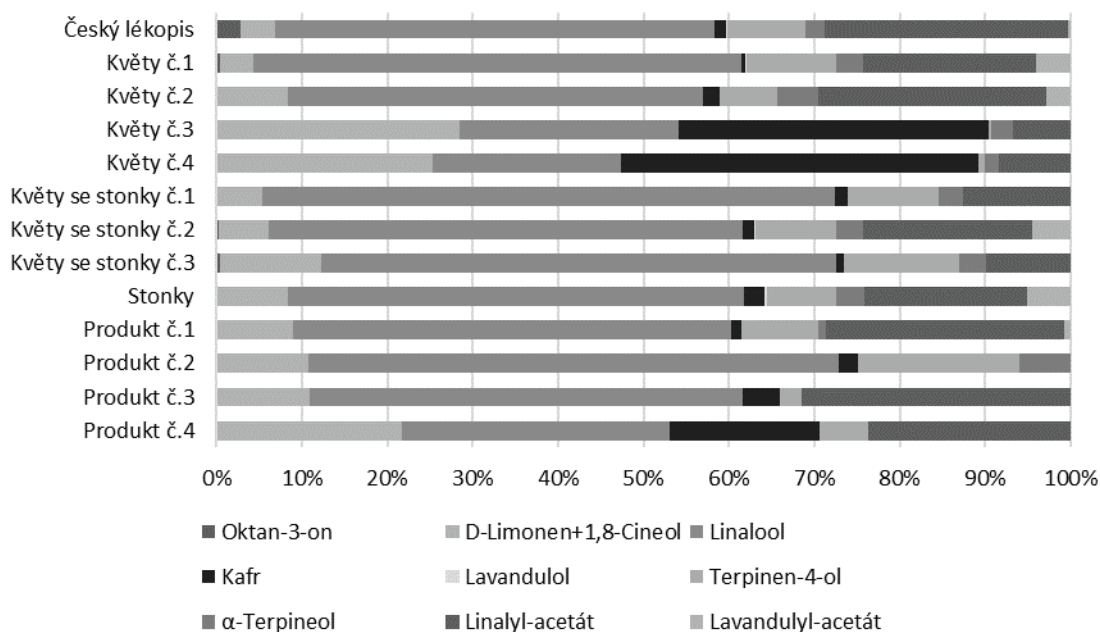
obsahuje pouze zanedbatelné množství (2 ml/litr výrobku) (není uvedeno na obr. 1).

Získané vzorky silic byly analyzovány metodou GC/MS pro získání profilu těkavých látek a následně bylo vypočítáno jejich relativní zastoupení. Nejvíce těkavých látek obsahuje z rostlinné suroviny květ se stonkem (okolo 40 těkavých látek), nejméně pak samotný stonek (do 30 těkavých látek). Z výrobků z Levandulového údolí (ale i v porovnání se surovinou) má nejbohatší zastoupení těkavých látek produkt č. 1 (100% BIO esenciální olej z levandule Chodouňské, přes 55), jejichž profil je výrazně odlišný od ostatních analyzovaných vzorků.

Český lékopis definuje požadované relativní zastoupení u 10 těkavých látek (viz tab. I), porovnání relativního zastoupení těchto látek u analyzovaných vzorků silic je uvedeno na obr. 2. Jak je patrné, vzorky silic z květů č. 1 a č. 2 svým relativním zastoupením odpovídají požadavku Českého lékopisu. Oproti tomu vzorky z květů č. 3 a č. 4 mají vysoký obsah kafru (36,4 % a 41,9 %) a sumy D-limonenu + 1,8-cineolu (28,4 % a 25,3 %) na úkor nižšího obsahu linaloolu a nesplňují v tomto směru požadavky Českého lékopisu (kafur <1,2 %, D-limonen <1,0 % a 1,8-cineol <2,5 %). Z tohoto lze usoudit, že se u těchto



Obr. 1. Obsah silice v analyzovaných vzorcích levandule

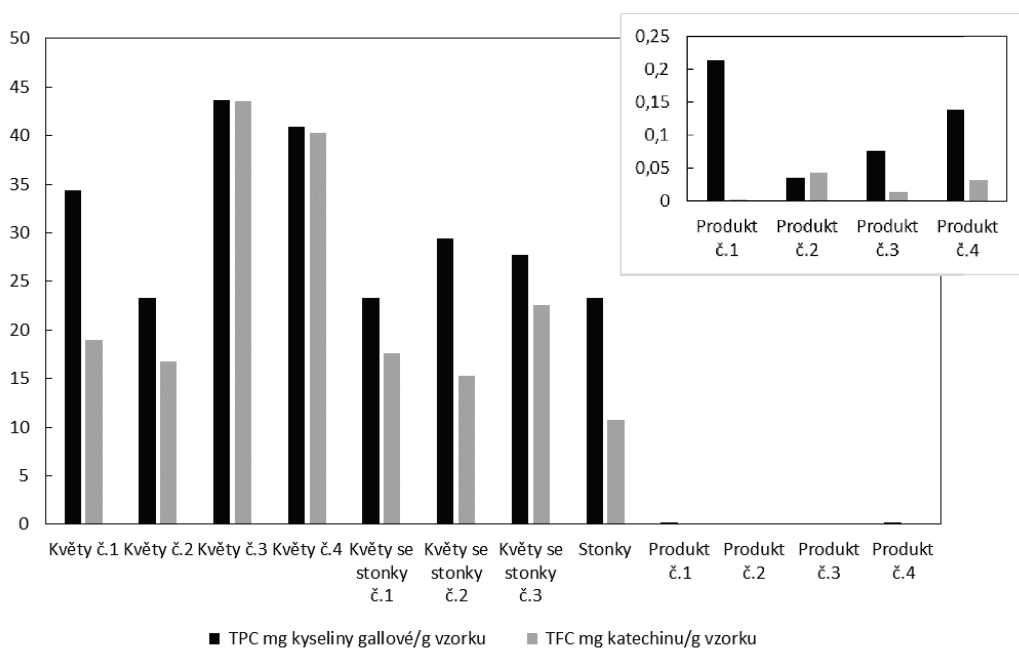


Obr. 2. Porovnání relativního zastoupení těkavých látek v analyzovaných vzorcích silic

dvou vzorků nejedná o levanduli lékařskou, ačkoliv to vzorek květy č. 4 na obalu deklaruje. Původ tohoto vzorku je z Albánie, což by mohlo být vysvětlením rozdílného zastoupení těkavých látek, protože výsledky nejsou v rozporu se zjištěním dalších autorů (viz tab. I). Evidentně zde hraje velkou roli odrůda, místo a podmínky pěstování a způsob izolace těkavé frakce. Jak uvádí cit.⁶, obsahové zastoupení látek se liší v závislosti na druhu levandu-

le lékařské, ale i meziročně v rámci pěstované odrůdy. Z tohoto důvodu je obtížné porovnávat různé roční produkce i typy odrůd levandule mezi sebou.

U výrobků esenciálních olejů z Levandulového údolí (produkt č. 1 a č. 3) je profil těkavých látek ze získané silice téměř totožný s profilem sušených bylin (květy, příp. květy se stonky). Naproti tomu produkt č. 2 – levandulový hydrolát – má rozdílný profil. V tomto produktu se



Obr. 3. Porovnání obsahu fenolů (TPC) a flavonoidů (TFC) u analyzovaných vzorků

nevyskytuje linalyl-acetát, nejvíce zastoupená látka levandulové silice, což je v souladu s literaturou³.

Mezi významné obsahové složky levandule patří fenoly, konkrétně flavonoidy, jejichž obsah se pohyboval od 23 mg TPC/g resp. 10 mg TFC/g u stonků do 43 mg TPC i TFC/g u květů (viz obr. 3). Tyto látky však z důvodu vysoké polaritativy a netěkavého charakteru nepřecházejí během destilace s vodní parou do silice ani hydrolátu. Zjištěné obsahy fenolů a flavonoidů ve vzorcích levandule jsou ve shodě s dostupnou literaturou⁷.

Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda se kvalita levandule lékařská pěstované v České republice liší od hlavních producentů, jako je Francie či země z Balkánského poloostrova (Bulharsko, Albánie) porovnáním s literaturou a proměřením omezeného množství vzorků dostupných z tržní sítě (viz tab. II). Vzhledem k tomu, že kosmetický průmysl nezpracovává jen čistý květ, jako tomu je ve farmaceutickém průmyslu, byla zároveň provedena bilance sledovaných biologicky aktivních látek v dalších částech rostliny (květy se stonky, stonky).

Výsledky ukazují, že majoritním zdrojem silice jsou podle očekávání květy (až 37 ml/kg), oproti tomu stonky obsahují pouze 1,5 ml silice/kg. Všechny analyzované vzorky květů levandule (květ č. 1–4) splňují požadavky Českého lékopisu na její minimální obsah, ale navzájem se liší až dvojnásobně. Stejně tak květy s květonosnými lody-

hami (květy se stonky), využívané v kosmetickém průmyslu, obsahují více jak 20 ml silice/kg s obdobným profilem těkavých látek jako silice z květů a z ekonomického hlediska je jejich využití v kosmetickém průmyslu smysluplné. Výskyt a relativní zastoupení těkavých látek silice závisí nejen na způsobu získávání silice a metodě stanovení, ale i na pěstované odrůdě, klimatických a geologických podmínkách^{3,5,6}. Přesto lze s velkou pravděpodobností tvrdit, že v případě vzorků květů č. 3 a č. 4 se nejedná o levanduli lékařskou, ale o jiný druh levandule, a to zejména pro vysoké relativní zastoupení kafru na úkor linaloolu a linalyl-acetátu. Tyto vzorky mají zároveň vyšší obsah fenolů a flavonoidů. Vzhledem k tomu, že výrobce na obale deklaruje, že se jedná o levandulový květ, vzorek květy č. 4 pak výslovně uvádí z *Lavandula angustifolia*, je zde riziko klamání spotřebitele ohledně botanického původu výrobku a tím spojených léčivých a aromatických vlastností výrobku. Stejně tak v případě vzorku francouzské silice (produkt č. 4) se s největší pravděpodobností nejedná o levanduli lékařskou. O jaké druhy levandule se jedná však nelze s určitostí říci.

LITERATURA

1. *Český lékopis 2023*. Grada, Praha 2023.
2. Wells R., Truong F., Adal A. M., Sarker L. S., Mahmoud S. S.: *Nat. Prod. Commun.* 13, 1403 (2018).
3. Prusinowska R., Śmigielski K.: *Herba Pol.* 60, 56 (2014).

4. ISO Standard 3515:2002: *Oil of lavender (Lavandula angustifolia Mill.)*.
5. Lawrence B. M.: *Perfum. Flavor.* 40, 42 (2015).
6. Pokajewicz K., Bialoń M., Svydenko L., Fedin R., Hudz N.: *Molecules* 26, 5681 (2021).
7. Dobros N., Zawada K., Paradowska K.: *Antioxidants* 11, 711 (2022).
8. Radulescu C. a 10 spoluautorů: *Anal. Lett.* 50, 2839 (2017).
9. Pekař A., Pyrzyńska K.: *Food Anal. Methods* 7, 1776 (2014).
10. <https://webbook.nist.gov/chemistry/>, staženo 10. 10. 2023.

I. Šístková^a, V. Kružík^a, I. Horskáková^a, H. Neumannová^b, and H. Čížková^a (^a *Department of Food Preservation, University of Chemistry and Technology Prague, Prague, Czech Republic,* ^b *Tři věže s. r. o., Lišnice, Czech Republic*) **Determination of Selected Biologically Active Substances on Lavender Grown in the Czech Republic**

Lavender as a herb and the lavender essential oil have a wide range of biological effects. They have been used in cosmetics and medicinal products since the times of ancient Greece and Rome. Nowadays, there is a wide range of products containing lavender on the market, either as such (lavender tea or biscuits or other snacks with lavender flowers) or containing lavender essential oil or aqueous solutions of lavender (cosmetics, drugstore goods, food or pharmaceutical preparations). This work focuses on the determination of the essential oil content, the representation of volatile substances and the determination of total phenols and flavonoids in samples of medicinal lavender from the Levandulové údolí and bought in the Czech shops.

Keywords: lavender, *Lavandula angustifolia*, essential oil, phenolics, flavonoids



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

CHEMICKÉ VZDĚLÁVÁNÍ NA STŘEDNÍCH ODBORNÝCH ŠKOLÁCH – MÍT JE, ČI NEMÍT? A JAKÉ?

SVATAVA JANOUŠKOVÁ^a, MARTIN ČAPEK ADAMEC^b, VÁCLAV PUMPR^c a DIANA CHRPOVÁ^d

^a Katedra učitelství a didaktiky chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 00 Praha 2, ^b Ústav učitelství chemie a humanitních věd, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Nezávislý odborník v oblasti didaktiky chemie, ^d Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6, Česká republika
svatava.janouskova@natur.cuni.cz

Došlo 1.2.24, přijato 28.3.24.

Chemické vzdělávání na úrovni středních odborných škol s omezeným rozsahem přírodovědného vzdělávání, včetně chemického, je pouze okrajově diskutované téma. V naší studii přinášíme informace o tom, jak může být chemie na středních odborných školách vyučována takovým způsobem, aby dále upevňovala a rozšiřovala přírodovědnou gramotnost žáků a tím i lepší orientaci v běžném životě, a přitom byla žáky dobře přijímána. Naši metodu jsme ověřili na jedné z pražských odborných škol typu M a výsledky této dílčí studie přinášíme zajímavé výsledky, které nás vedou k systematizování našeho přístupu a tvorby vhodné studijní opory pro žáky i metodiky pro učitele. Ukázkou dílčí části studijní opory rovněž přinášíme v textu.

Klíčová slova: chemické vzdělávání, střední odborné školy, přírodovědná gramotnost, demokratický vzdělávací přístup

Úvod

Diskuse o chemickém vzdělávání na středních odborných školách je poměrně omezená. Důvodem je skutečnost, že s výjimkou středních odborných škol, které vyučují žáky v chemických oborech, je rozsah chemického vzdělávání na středních odborných školách poměrně malý. Přitom počet žáků, kteří absolvují přírodovědné vzdělávání jako všeobecně vzdělávací předmět v rámci středních škol, není zanedbatelný. Ve školním roce 2022/23 činil podíl žáků vzdělávajících se v oborech odborného vzdělávání s maturitní zkouškou 46,4 %, tj. 214 925 žáků. Další pětina žáků (20,5 %, tj. 94 956 žáků) se účastnila odborného vzdělávání s výučním listem¹. Blížící se revize Rámcových vzdělávacích programů, včetně vzdělávacích programů středních odborných škol, nás staví před otázku, zda máme ve výuce přírodovědných oborů jako všeobecně vzdělávacích oborů včetně chemie pokračovat či nikoli. Pokud ano, jakým způsobem.

S ohledem na to, že přírodovědná gramotnost je konceptem, který je prosazován jak na úrovni EU (cit.²), tak OECD (cit.³), je málo pravděpodobné, že by přírodovědné obory ve všeobecném základu středních odborných škol absentovaly. Neznamena to nutně, že by chemie musela být jejich samostatnou součástí, ale pokud už taková příležitost existuje, je zřejmě zbytečné na ni rezignovat.

V našem příspěvku se zabýváme tím, jak je možné přistupovat k výuce chemie na středních odborných školách, kde je rozsah výuky chemie a dalších přírodovědných oborů minimální (tj. pro řadu oborů vzdělávání typu H – střední odborné vzdělání s výučním listem, M – úplné střední odborné vzdělání s maturitou, L – úplné střední odborné vzdělání s odborným výcvikem a maturitou) a na předmět chemie je nahlíženo jako na předmět „okrajový“. Vycházíme přitom ze zkušenosti aplikování námi navrženého přístupu na jedné z pražských středních odborných škol takového typu.

Výchozí situace

Halúzka⁴ uvádí, že situace ve výuce přírodovědných všeobecně vzdělávacích oborů je na středních školách, zejména středních odborných učilištích, na nízké úrovni. Přírodovědné předměty s velmi nízkou časovou dotací jsou na okraji zájmu žáků i vedení školy. Nejedná se totiž o profilující předměty. Motivace žáků je pro studium nízká, až 15 % žáků v průzkumu Ruska^{5,6} uvedlo, že jim přijde v běžném životě neužitečná a v témže průzkumu 72 % žáků hodnotilo předmět chemie jako průměrně oblíbený až nejméně oblíbený. I když je výsledek výzkumu neaktuální (od jeho realizace uběhlo 12 let) a navíc se v průzkumu jednalo o vzorek dostupný, nemáme důvod se

domnívat, že by se situace u žáků středních odborných škol nějak významně proměňovala.

Víme například, že motivovanost žáků do značné míry koreluje s jejich školní úspěšností, potažmo znalostmi^{7,8}. Pokud se podíváme na rozdíly v přírodovědné gramotnosti mezi různými typy středních škol, jak je zprostředkovává šetření cílové skupiny patnáctiletých žáků PISA (Programme for International Students Assessment), lze sledovat, že rozdíl mezi znalostmi žáků je signifikantní. Jistě není překvapující, že žáci víceletých gymnázií si v oblasti přírodovědné gramotnosti vedou nejlépe a žáci středních odborných škol bez maturity nejhůře. Co nás ale musí zarazit, je zhruba dvousetbodový rozdíl mezi oběma skupinami žáků. A to není zdaleka rozdíl jediný. Ve čtenářské gramotnosti činí rozdíl mezi žáky gymnázií a středních odborných škol bez maturity dvě gramotnostní úrovně (blíže cit.⁹). Můžeme se ptát, jak to souvisí s výukou přírodovědných oborů, resp. chemie, či přírodovědnou gramotností. Odpověď je nasnadě. Zhoršená schopnost čtení představuje jednak limit v učení se, ale je také limitem při řešení problémů spojených s přírodními vědami, se kterými se setká žák v psané podobě (blíže viz cit.¹⁰).

Dalším aspektem, který je třeba brát do úvahy, je aprobovanost učitelů. Rusek a spol.¹¹ na základě svého průzkumu uvádějí, že ve Středočeském kraji na SOŠ zakončených maturitou (např. obory vzdělávání M) vyučuje chemii 15 % neaprobovaných učitelů (jedná se o učitele, kteří obor chemie na VŠ nestudovali). Nicméně na SOŠ zakončených výučním listem (např. obor vzdělávání H) představuje podíl neaprobovaných učitelů 60 %. Jsou to opět učitelé, kteří obor chemie nestudovali. Novější a ucelenější data ze středních odborných škol nejsou k dispozici, ale víme, že na druhém stupni základní školy je neaprobovaných vyučujících chemie v průměru téměř 20 %, v některých krajích dokonce 50 % (cit.¹²). Lze předpokládat, že pro obory středních odborných škol, zejména těch, kde je chemie vyučována v malém rozsahu, bude situace ještě horší. Při malé hodinové dotaci pro výuku chemie totiž aprobovaný vyučující jen stěží získá plný úvazek, pokud nemá vystudovanou chemii v kombinaci s předmětem, který mu plný úvazek na střední odborné škole zajistí (např. matematika). Po ředitele škol je tak v řadě případů snazší volit pro přírodovědné předměty, v nichž se žáci neprofilují, neaprobované učitele.

A konečně jsou tu požadavky Rámcových vzdělávacích programů pro střední odborné vzdělávání. Pro střední odborné školy s maturitou, kde je chemie vyučována jako všeobecně vzdělávací předmět (typ M, L), je cílem přírodovědného vzdělávání především snaha naučit žáky využívat přírodovědných poznatků v profesním i každodenním osobním životě. Dále se vzdělávání zaměřuje na schopnost žáků klást si otázky o okolním světě a vyhledávat k nim relevantní, na důkazech založené odpovědi. Školy, kde je přírodovědné vzdělávání, resp. chemie, chápáno jako všeobecně vzdělávací předmět, volí mezi dvěma variantami. Varianta A je určena pro obory s vyššími nároky na chemické vzdělávání, varianta B pro obory, kde jsou nároky pro chemické vzdělávání nižší. Za celou dobu vzdělávání

musí být minimální rozsah pro celé přírodovědné vzdělávání 128 hodin (jako vzor využít RVP 63-41-M/02 resp. 65-41-L/01; cit.^{13,14}). Do přírodovědného vzdělávání patří fyzikální vzdělávání, chemické vzdělávání a biologické a ekologické vzdělávání. Dle našich zkušeností je ve většině případů chemie realizována po dobu 1 roku studia žáků (zpravidla 1. ročníku) s časovou dotací 1–2 hodiny týdně.

Pro střední odborné školy s výučním listem (typ H) je situace obdobná. Cíl přírodovědného vzdělávání je identický s tím pro typ škol M a L, stejně jako hodinová dotace na přírodovědné vzdělávání. Je zde však pouze jedna varianta chemického vzdělávání (jako vzor využít RVP 23-65-H/01; cit.¹⁵).

Pokud bychom měli shrnout, s čím se budou výuka chemie a vyučující na středních odborných školách s chemií jako všeobecně vzdělávacím předmětem potýkat, pak jsou to (a) nižší až nízká úroveň přírodovědné gramotnosti; (b) nízká motivovanost žáků pro vzdělávání se v přírodovědných oborech; (c) nízká časová dotace na výuku a (d) neaprobovanost učitelů. Otázkou tedy je, jak se k výuce chemie za takových podmínek postavit.

Metoda demokratického přístupu k výuce pro zvýšení motivace a znalostí žáků

Náš přístup k výuce chemie na středních odborných školách typu M, L, H, kde je chemie všeobecně vzdělávacím předmětem, vychází z premisy, že i v ne zcela příznivých podmínkách má význam chemii učit. Jako podstatné se nám však jeví naplňovat skutečně cíl, který si vytklly Rámcové vzdělávací programy pro střední odborné vzdělávání, tj. zvýšit schopnost žáků využívat přírodovědných poznatků v profesním i každodenním osobním životě a také jejich schopnost hodnotit některá s tím související přírodovědná témata. Právě vazba na běžný život umožňuje výstavbu poznatků (scaffolding knowledge) tak, aby se vytvořila pevná struktura pochopení daného tématu. Úkolem vyučujícího je pak korigování žákovských představ (nejen) o přírodovědných faktech, které žáky obklopují a o nichž si žák tvoří poznatky plynoucí ze zkušeností vlastních i komunity, ve které žijí¹⁶. A jak jsme uvedli výše, čím více přírodovědnému faktu žáci rozumí, tím více jsou motivováni pro další učení.

Typickými oblastmi, kde žák propojuje znalosti chemie s osobním životem, jsou témata zdraví, environmentální témata, či spotřebitelská témata. V profesním, ale i osobním životě se potřeba mezi jednotlivými obory studia bude významně lišit a zde bude vždy nutno reagovat na potřeby žáků konkrétních oborů a požadavky různých profesních sdružení, resp. trhu práce.

Kromě vhodného výběru tématu je třeba brát v úvahu také věk žáků. Na střední odborné školy nastupují žáci zpravidla v období vrcholící, či končící puberty, tedy mezi 15. až 16. rokem. Kromě toho, že žáci v daném období prochází výraznými fyzickými i mentálními změnami, dopadají na ně v současnosti řada událostí, jako jsou post-covidová skepse, klimatická změna, ekonomická krize, či

ozbrojené konflikty, které se jich nepříjemně dotýkají. U žáků lze pozorovat rezignaci a ztrátu zájmu. Jako vhodnou cestu z této situace popisují Öhman & Öhman¹⁷ či Ojala¹⁸ participativní a demokratické přístupy ve výuce. V pojetí těchto autorů to znamená, že žáci volí konkrétní témata projektů ve výuce i způsob práce na těchto projektech. Podle autorů se u žáků zvýšila motivovanost pro studium demokraticky vybraných témat, i jejich povědomí o studovaných tématech.

Otázkou je, jak k této demokratizaci přistoupit u pravidelné výuky, kde musí být splněny požadavky Rámco-

vých vzdělávacích programů pro střední odborné vzdělávání. Zde vycházíme z možnosti široké nabídky témat, které každý z výstupů v Rámcových vzdělávacích programech nabízí. Pro každý typ učiva musí být vybráno více různých kontextů a žáci demokraticky, tj. hlasováním, volí, který z kontextů jim vyhovuje nejlépe. Tímto přístupem žáci (do určité míry) přebírají zodpovědnost za vzdělávací obsah, se kterým se budou seznamovat. Rozumí také lépe tomu, jak je téma široké a jaká různá uplatnění v jejich profesním či osobním životě může mít.

Skleníkový efekt

Přemýšleli jste někdy nad tím, proč je teplota na Zemi relativně stabilní? Proč se dramaticky neliší mezi dnem a nocí? Je to díky naší atmosféře. Poměrně stálou teplotu nám pomáhají udržet tzv. skleníkové plyny. Že jsou špatné? Ne, tak jednoduché to není.

Skleníkový efekt atmosféry je zapříčiněn odlišnou propustností zemské atmosféry pro záření o různých vlnových délkách. Přes den atmosféra pohlcuje zejména krátkovlnné sluneční záření a prohřívá se tak zemský povrch i atmosféra sama. V noci naopak atmosféra pohlcuje dlouhovlnné záření, které vyzařuje zemský povrch. K tomu jí pomáhají skleníkové plyny, zejména vodní pára a oxid uhličitý.



Existují však ještě další skleníkové plyny. Těmi jsou oxidy dusíku (oxid dusný), ozón a metan. Ty společně s vodní parou jsou jak přírodního původu, tak lidmi produkovány. Kromě toho se ke skleníkovým plynům řadí také freony a fluorid sírový. Ty už produkuje jen člověk. Rovnováha v množství skleníkových plynů v atmosféře je důležitá, díky ní se Země nezahřívá ani neochlazuje nadměrně.

Úloha 1

Aktuálně se v médiích mluví o zesíleném skleníkovém efektu a klimatické změně. Čím je zesílení skleníkového efektu způsobeno?

Řešení

Je narušena přirozená rovnováha koncentrace skleníkových plynů v atmosféře. Rovnováha je narušena, protože do ovzduší vypouštěno velké množství skleníkových plynů za jejichž produkci je zodpovědný člověk.

Úloha 2

Uveďte největší zdroje skleníkových plynů – oxidu uhličitého, oxidu dusného a metanu, které se do ovzduší dostávají lidskou činností. Nejprve zkuste vymyslet tyto zdroje jen na základě vašich znalostí chemie. Pokud si nevíte rady, využijte internet.

Řešení

Oxid uhličitý – spalování fosilních paliv

Oxid dusný – hnojiva v zemědělství, spalování fosilních paliv

Metan – zemědělství – chov skotu, těžba fosilních paliv

Úloha 3

V médiích se často diskutuje tzv. uhlíková stopa. Dokonce existují různé typy kalkulaček, takže si můžeme spočítat i svou osobní uhlíkovou stopu. K čemu je v osobní rovině užitečný takový nástroj?

Řešení

Pokud známe naši spotřebu, která vede k produkci skleníkových plynů, můžeme opatřeními ve svém životě (např. méně často létat letadlem, jezdit hromadnými prostředky, omezit spotřebu masa), která přispívají ke snížení našich osobních emisí.

Úloha 4

Možná už jste slyšeli termín bělení korálů. Nebo jste slyšeli o tom, že koráli vymírají. S využitím portálu Fakta o klimatu nebo jiného vhodného zdroje vysvětlete, proč jak ovlivňuje růst korálů skleníkový efekt.

Řešení

Koráli jsou organismy, které tvoří vápenné skelety. Když se oceán zateple, koráli nemohou produkovat vápno a jejich skelety se rozpadají. Když jsou oceány v teplejší

Obr. 1. Ukázka karty pro tematický okruh oxidy

Námi vytvořený systém demokratického přístupu k výuce žáků je však poměrně náročný pro vyučující. Proto je zapotřebí, aby vznikly vhodné opory, tj. učební texty, které mohou využít vyučující jako inspiraci pro sebe i jako učební texty pro žáky. Tyto texty zároveň poskytují širokou rozmanitost témat, ze kterých žáci mohou demokraticky volit. Domníváme se proto, že učební texty by měly být zpracovány v podobě portfolia učebních karet.

Tyto karty by jednoduchou formou přiblížily téma žákům. Byly by stručné, aby se neztrácela motivace žáků z důvodů jejich nízké čtenářské gramotnosti, obsahovaly by ale podstatné informace. Karta by měla obsahovat **stručný úvodní text**, kterým se téma zařazuje do kontextu osobního či pracovního života. Dále by mělo navazovat stručně a jednoduše **vysvětlení chemického faktu** (pojmu, principu, zákona, jevu, procesu) a **systém úloh**, jejichž řešením žáci dospívají k dalším informacím o sledovaném faktu. Úlohy jsou rovněž vázány na běžný život a při jejich řešení žáci využívají také poznatky již dříve získané na úrovni nižšího sekundárního vzdělávání. Kde je to účelné, lze zařadit **jednoduchý pokus**, který žáci mohou realizovat i v domácích podmínkách, nebo jej lze realizovat v podmínkách školy, která nedisponuje laboratoří ani odbornou přírodovědnou učebnou. Smyslem úloh a pokusů je rozvíjet u žáků přírodovědnou gramotnost, tj. zejména jejich schopnost vysvětlovat chemická fakta (s pochopením jednoduchých vědeckých důkazů) a případně vyhodnocovat a navrhnout přírodovědný výzkum (v jeho elementární podobě). Příklad zpracování karty uvádíme na obr. 1.

Zkušenosti z ověření přístupu na pražské střední odborné škole

Námi navrženou metodu jsme ověřovali v prvním pololetí školního roku 2023/2024 na pražské střední odborné škole, konkrétně ve dvou třídách prvního ročníku této školy. V obou třídách vyučuje stejný vyučující. Škola je zaměřena na vzdělávání související zejména s aplikací znalostí ze společenskovedních oborů. Ověřování se zúčastnilo celkem 50 žáků (v jedné ze tříd se jednalo o 24 přítomných žáků a u druhé o 26 přítomných žáků). Předmětem ověřování bylo jednak zjišťování zvýšení zájmu o výuku chemie při demokratické volbě témat, jednak nastavení prvních vytvořených výukových karet pro tematický okruh Chemická látka a jejich směsi. Žáci vybírali z témat souvisejícími s příklady běžných směsí (např. suspenze a emulze v běžném životě, fyziologický roztok, vzduch jako směs různých látek, smog) a témat souvisejících s oddělováním složek směsí (např. filtrace, sedimentace a destilace v kuchyni, filtrace v různých druzích masek, čističky vzduchu, sedimentace červených krvinek, získávání soli z mořské vody). Uvedená témata byla zároveň nejčastěji volena žáky jako ta, která jsou zajímavá pro výuku, tj. alespoň 50 % žáků o ně jevílo v jedné nebo druhé třídě zájem.

Ověření zvýšení zájmu o výuku chemie probíhalo v rámci akčního výzkumu, konkrétně běžně užívanými kvalitativními metodami – skupinovým rozhovorem a zúčastněným pozorováním vyučujícího. Žákům byl předložen seznam témat z běžného života či jim známého okolí, z nichž mohli individuálně vybírat, přičemž byl stanoven minimální počet témat, která v každém z nabízených tematických okruhů musela být vybrána. Pro výuku byla zvolena ta témata, která měla největší počet hlasů. Vzhledem k tomu, že na střední škole mají žáci podobné zájmy díky úžeji specifikovanému studijnímu oboru studia, nebylo nalezení shody problematické. Nakonec s ohledem na počet vyučovaných hodin byla vybrána ta témata, kde byla shoda minimálně 75 % žáků v dané třídě. Pro daná témata byly připraveny karty. Žáci měli zpočátku obtíže princip možnosti volby pochopit, a navíc mezi nimi panovala skepse, zda se skutečně bude učit jen to, co vyberou. Jakmile však začala výuka a potvrdilo se jim, že jejich volba se zcela odrazila ve výuce, většina daný přístup ocenila.

Výuka probíhala tak, že učitel parafrázoval úvodní motivační text. Žáci si následně přečetli vysvětlující text samostatně a učitel jej po přečtení doprovodil stručným výkladem, který nešel příliš nad rámec uvedeného vzdělávacího obsahu. Žáci se mohli ptát, čemu nerozumí. Dále byly ve dvojicích řešeny úlohy pod textem. Využit bylo možno i internet, pokud žáci odpovědi neznali. Společně s učitelem pak byly naformulovány správné odpovědi, které si žáci zapsali.

Po aplikaci několika karet ve výuce byl s žáky veden rozhovor (suplovaná hodina za jiného vyučujícího). Dotazování bylo na to, zda chtějí v nastaveném systému pokračovat dál a zda je tento přístup pro ně zajímavý a motivuje je. Třetina žáků uvedla, že je nyní chemie více baví. Další třetina žáků uvedla, že se jejich vztah k chemii nezměnil, vnímají ji neutrálně. Oceňují ale, že si mohli vybrat témata, kterými se budou zabývat. Třetina žáků stále považovala chemii za nezábavnou a volba tématu je *de facto* nezajímala, nicméně volbu témat jsou ochotni provádět i nadále.

Možnost volby tématu se projevila i v samotné výuce. To vyplynulo ze zúčastněného pozorování vyučujícího. Žáci byli pozornější při výkladu a vyvíjeli větší úsilí při řešení úloh. Mírně se zvýšil rovněž počet dotazů. Oproti minulým letům se zlepšily vzdělávací výsledky žáků v testech.

Na kartách žáci oceňovali zejména stručnost a srozumitelnost textu (snadné zapamatování) a kontext provazující chemická témata s událostmi z běžného života. Pokusy ocenili spíše ve školním prostředí, pokud byly realizovány. Doma je nikdo nezkoušel. Úlohy se více než polovina žáků zdály přiměřeně obtížné. Konstatovali ale, že většinu odpovědí museli dohledávat na internetu, protože si informace z nižšího sekundárního vzdělávání nevybavovali, i když tušili, že by odpovědi znát měli. Systém nápověd, pokud byl u úloh k dispozici, využila třetina žáků. Asi dvě pětiny žáků hodnotily některé úlohy jako obtížné, byly to zejména ty, které obsahují výpočet. Žáci, které chemie nebaví, se k obtížnosti a způsobům řešení úloh nijak nevy-

jadřovali. Na základě zúčastněného pozorování lze konstatovat, že úlohy měli tito žáci tendenci spíše sami neřešit, případně je řešili bez většího zájmu.

V porovnání s předchozími roky, kdy žáci pracovali s klasickou učebnicí, ale lze konstatovat, že zájem o práci s textem i úlohami se zvětšil. Tři čtvrtiny žáků preferuje systém učebních karet před učebnicí nebo jinými tištěnými materiály. Někteří konstatovali, že v elektronické podobě by jim učební karta mohla být i strojově předčítána, což by ocenili.

Diskuse a závěr

Na základě zjištění lze konstatovat, že demokratický výběr tvorby učiva a učební karty jsou směrem, který může zvýšit atraktivitu výuky chemie na středních odborných školách s omezeným rozsahem výuky chemie. Z provedené sondy je zřejmé, že třetina žáků byla tímto přístupem zaujata a třetina ji hodnotila neutrálně. To je v souladu se závěry studií, které poukazují na nutnost věnovat pozornost výběru témat ve školním kurikulu s ohledem na různý zájem žáků, kteří se liší genderem, zájmy souvisejícími se studovaným oborem, osobními zájmy nebo styly učení (viz např. cit.¹⁹). Přirozeně, stále existuje skupina žáků, kteří tento přístup neocenují a chemie je i nadále nebaví. Lidé jsou sice ze své podstaty zvědaví, ale zvědavost má své hranice, které musí překonat naše ochota myslet²⁰. I když se pomocí karet snažíme o maximální jednoduchost textu i úloh, které mají potenciál přinést úspěch v pochopení obsahu i řešení úloh, vždy bude existovat skupina žáků, která z různých příčin k přemýšlení o tématu a k řešení úloh dovedena nebude²¹. I tito žáci ale hodnotí učební karty lépe než učebnice, a to zejména proto, že rozsah textu je malý a snadněji si ho zapamatují, mohou tedy spíše uspět při hodnocení (v testech). Obecně se žákům líbí, že mají k dispozici širší záběr témat, která jim jednoduchá fakta z jejich života vysvětlí, byť velmi jednoduchými poznatky z chemie.

Naše studie je první sondou, která ukazuje inovativní přístup k výuce chemie na středních odborných školách. Domníváme se, že rezignovat na chemii jako všeobecně vzdělávací předmět není potřeba. Naopak, střední škola by měla představovat potenciál, byť omezený, k tomu, aby žáci své poznatky lépe ukotvili a rozvinuli svou přírodovědnou gramotnost do té míry, že budou schopni lépe uchopit všednodenní témata, která je obklopují. Demokratický přístup k žákům v citlivém období dospívání umožní participaci na dění kolem sebe, o kterou usilují, ale zároveň tím do určité míry přebírají zodpovědnost za to, co se učí. Pozorovali jsme, že náš přístup zvyšuje motivaci některých žáků ve výuce a zlepšuje výsledky v dílčím hodnocení (testech) bez ohledu na to, zda jsou více motivováni, či nikoli. Lze tedy usuzovat, že námi navržený přístup má ve vzdělávání na středních školách potencionální využití. Bylo by ho však nutné aplikovat plošněji, aby výsledky měly relevantní výpovědní hodnotu.

LITERATURA

1. ČSÚ (2023). *Školy a školská zařízení 2022/23: Analytická část*. <https://www.czso.cz/csu/czso/analyticka-cast-9uf1m2n9u2>, staženo 15. 1. 2024.
2. Siarova H., Sternadel D., Szönyi E.: *Research for CULT committee – Science and scientific literacy as an educational challenge*. EU: Policy Department for Structural and Cohesion Policies Directorate-General for Internal Policies PE 629.188 – March 2019.
3. OECD: *An OECD Learning Framework 2030*, str. 23). Springer International Publishing 2019.
4. Halúzka M.: *Přístup žáků ke studiu chemie na různých typech středních škol. Dizertační práce*. Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2015.
5. Rusek M.: *Scientia in Educatione* 2(2), 23 (2011).
6. Rusek M.: *Scientia in Educatione* 4(1), 33 (2013).
7. Steinmayr R., Spinath B.: *Learning and Individual Differences* 19(1), 80 (2009).
8. Kriegbaum K., Becker N., Spinath B.: *Educational Research Review* 25, 120 (2018).
9. Blažek R., Janotová Z., Potužníková E., Basl J.: *Mezinárodní šetření PISA 2018*. Národní zpráva. 2019.
10. Reed D. K., Petscher Y., Truckenmiller A. J.: *Reading Research Quarterly* 52(2), 253 (2017).
11. Rusek M., Beneš P., Adamec M.: *Sborník přednášek 19. Mezinárodní konference o výuce chemie, Hradec Králové, IX - 2009*. 1. vyd. Gaudeamus, Hradec Králové 2009.
12. Lebeda: https://www.csicr.cz/CSICR/media/Prilohy/2022_p%C5%99%C3%ADlohy/Dokumenty/Ceske-skolstvi-v-mapach_everze.pdf, staženo 15. 1. 2024.
13. MŠMT (2007a). *Rámcový vzdělávací program 63-41-M/02, Obchodní akademie*.
14. MŠMT (2007b). *Rámcový vzdělávací program 65-41-L/01 Gastronomie*.
15. MŠMT (2007c). *Rámcový vzdělávací program 23-65-H/01 Strojník*.
16. Tanesini A.: *Philosophical Issues* 32(1), 367 (2022).
17. Öhman J., Öhman M.: *Environmental Education Research* 19(3), 324 (2013), <https://doi.org/10.1080/13504622.2012.695012>, staženo 15. 1. 2024.
18. Ojala M.: *The Journal of Environmental Education* 46(3), 133 (2015). <https://doi.org/10.1080/00958964.2015.1021662>, staženo 15. 1. 2024.
19. Hofstein A., Mamlok-Naaman R.: *Educación Química* 22(2), 90 (2011).
20. Willingham D. T.: *Why don't students like school?: A cognitive scientist answers questions about how the mind works and what it means for the classroom*. John Wiley & Sons, New Jersey 2021.
21. Taconis R., Ferguson-Hessler M. G., Broekkamp H.: *The Official Journal of the National Association for Research in Science Teaching* 38(4), 442 (2001).

S. Janoušková^a, M. Čapek Adamec^b, V. Pumpr^c, and D. Chrpová^d (^a *Department of Chemistry Education, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b *Department of Chemical Education and Humanities, University of Chemistry and Technology, Prague,* ^c *Independent expert in the field of chemistry didactics,* ^d *Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic*): **Chemistry Education in Secondary Vocational Schools – to Have It or Not to Have It? And what Kind?**

Chemistry education at the secondary school level, with limited science education including chemistry, is only a marginally discussed topic. In our study, we provide information on how chemistry can be taught in secondary vocational schools to further strengthen and extend students' science literacy while being well-received by students. We have tested our method in one of Prague's M-type vocational schools. This sub-study yielded interesting results that lead us to systematize our approach and develop suitable learning support for students and a methodology for teachers. We also present a sample of a sub-section of the learning support in the text.

Keywords: chemical education, secondary vocational schools, science literacy, democratic teaching approach



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

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově



 **Metrohm**
Česká republika



www.metrohm.cz

PŘIPOJ SE K NÁM A OBJEV SVĚT CHEMIE!

ASOCIACE MLADÝCH CHEMIKŮ

CO NABÍZÍME?

VZDĚLÁVÁNÍ: WORKSHOPY, SEMINÁŘE

NETWORKING: BUDUJ SÍŤ SPOJENÍ
MEZI MLADÝMI CHEMIKY

SPOLEČENSKÉ UDÁLOSTI:
KONFERENCE, SOUTĚŽE

STAŇ SE
ČLEMEM AMCH



AMCH
GROW TOGETHER



SLEDUJ NÁS
ONLINE



ZAPOJ SE DO ORGANIZACE AKCÍ
ASOCIACEMCSCH@GMAIL.COM

76. Sjezd chemiků

Ostrava

kampus VŠB-TUO

26. - 29. 8. 2024



<https://www.76sjezdchemiku.cz/>

OBSAH**ÚVODNÍK**

- Chemické povídání** 253
J. Masák

REFERÁTY

- Aerosolová hmotnostní spektrometrie** 254
R. Lhotka a P. Vodička
- Lipidizace jako nástroj pro vývoj peptidových léčiv** 263
A. Myšková, D. Sýkora, J. Kuneš a L. Maletínská
- Biochemický význam matrix Gla proteinu a jeho potencionální využití v klinické biochemii jako markeru** 270
M. Barna, J. Čepová, K. Dunovská, M. Fořtová, P. Melicherčík, R. Průša, R. Kizek a E. Klapková

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

- Využití Ramanovy spektroskopie pro hodnocení degradace vlákna z poly(*p*-dioxanonu) určeného pro lékařské účely** 277
D. Jezbera, J. Loskot, M. Nalezinková, A. Myslivcová Fučíková a A. Bezrouk
- Stanovení vybraných biologicky aktivních látek v levanduli lékařské vypěstované v České republice** 284
I. Šístková, V. Kružík, I. Horsáková, H. Neumannová a H. Čížková

VÝUKA CHEMIE

- Chemické vzdělávání na středních odborných školách – Mít je, či nemít? A jaké?** 290
S. Janoušková, M. Čapek Adamec, V. Pumpr a D. Chrprová

CONTENTS**EDITORIAL**

- Talking Using Chemistry** 253
J. Masák

REVIEW ARTICLES

- Aerosol Mass Spectrometry** 254
R. Lhotka and P. Vodička
- Lipidization as a Tool for Peptide Drug Development** 263
A. Myšková, D. Sýkora, J. Kuneš, and L. Maletínská
- Biochemical Significance of Matrix Gla Protein and Its Potential Use as a Marker in Clinical Biochemistry** 270
M. Barna, J. Čepová, K. Dunovská, M. Fořtová, P. Melicherčík, R. Průša, R. Kizek, and E. Klapková

ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS

- The Use of Raman Spectroscopy to Assess the Degradation of Poly(*p*-dioxanone) Fibre Intended for Medical Purposes** 277
D. Jezbera, J. Loskot, M. Nalezinková, A. Myslivcová Fučíková, and A. Bezrouk
- Determination of Selected Biologically Active Substances on Lavender Grown in the Czech Republic** 284
I. Šístková, V. Kružík, I. Horsáková, H. Neumannová, and H. Čížková

EDUCATION IN CHEMISTRY

- Chemistry Education in Secondary Vocational Schools – to Have It or Not to Have It? And what Kind?** 290
S. Janoušková, M. Čapek Adamec, V. Pumpr, and D. Chrprová

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 118 (2024), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 148, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 134 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUČÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2024 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce (Světlem aktivovaný komplex ruthenia vázaný na DNA kvadruplex, McQuaid K. T. a spol.; <https://www.rcsb.org/structure/5ls8>): M. Štětina • Dáno do tisku 25.4.2024.

Excellence in Chemistry Research



Why publish with *ChemistryEurope*?

- Gold Open Access
- Publishing charges waived
- Preprints welcome
- Rigorous peer-review

Meet the Editors



Luisa De Cola

Università degli Studi
di Milano Statale, Italy



Lars Christian Grabow

University of
Houston, USA

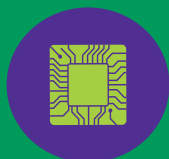


Ken Tanaka

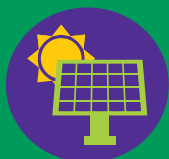
Tokyo Institute of
Technology, Japan

MERCK

SMALL MATERIALS BIG IMPACT



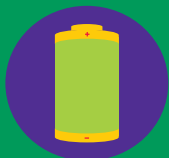
Printed
electronics



Solar energy
Photonics



Bio
sensors



Batteries
Fuel cells

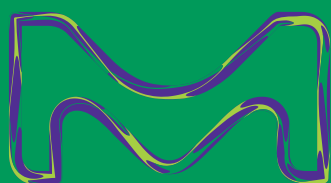
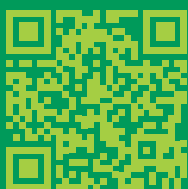


Carbon
nanomaterials



Self
assembly

Expertise at the nanoscale
SigmaAldrich.com/nanomaterials



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

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials