
Edice
Chemické
Lístky

Michal JURÁŠEK a Pavel DRAŠAR,

editoři sborníku

ORGANICKÉ

PŘÍRODNÍ LÁTKY

v zrcadle časopisu

CHEMICKÉ LISTY

1996-2000

Česká společnost chemická

a

redakce časopisu Chemické listy

Praha

2026

Dear readers, please cite the information from this collection as the original paper in Chem. Listy, as listed on the top of the first page of every contribution, e.g.

Author X.: Chem. Listy *111*, 23-57 (2000).

Vážení čtenáři, citujte prosím informace z tohoto sborníku jako původní článek v Chem. Listy, jak je uvedeno v horní části první stránky každého příspěvku, např.

Autor X.: Chem. Listy *111*, 23-57 (2000).



Organické přírodní látky v zrcadle časopisu Chemické listy, 1996-2000

Editoři: doc. Ing. Michal **JURÁŠEK, PhD.** a prof. RNDr. Pavel **DRAŠAR, DSc**.

Seznam autorů jednotlivých příspěvků je uveden na str. 214.
Typografická úprava: Claudie JIRÁTOVÁ.
Fotografie: RNDr. Zdeněk Putz CSc.
Vydání publikace bylo schváleno redakční radou časopisu Chemické listy.
Vydala: Česká společnost chemická.
Vydání prvé, počet stran 214, ediční číslo 12568-2026-06.
© Česká společnost chemická, redakce časopisu Chemické listy, Praha 2026.

ISBN 80-88307-33-4

ISBN elektronické verze (formát PDF) 978-80-88307-33-4

9 788088 307334

Chem. Listy 90,252 – 259 (1996)

NEOGLYKOPROTEINY – ZAJÍMAVÉ DERIVÁTY BÍLKOVIN

RADKO SOUČEK

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 7.VII.1995

Obsah

1. Úvod
2. Vznik neoglykoproteinů
   2.1. Tvorba Schiffovy báze
   2.2. Amadoriho přesmyk
   2.3. Reduktivní aminace
   2.4. Aktivované sacharidy
   2.5. Stanovení stupně glykace
3. Přehled následků molekulárních změn vyvolaných glykací
4. Některé příklady vlivu glykace na vlastnosti bílkovin
   4.1. Hemoglobin a albumin: změny afinity k přenášené molekule a přednostní místa glykace
   4.2. Krystalliny: změna konformační stability
   4.3. Glykované enzymy: vliv na rozpustnost a stabilitu
   4.4. Farmakologicky zajímavé přístupy: vliv na intermolekulární interakce
5. Závěr

1. Úvod

Naprostá většina bílkovin obsahuje větší či menší množství kovalentně vázaných sacharidů. Tyto tzv. glykoproteiny vznikají intracelulárně enzymovou glykosylací, kdy se na peptidový řetězec N- nebo O- glykosidovou vazbou váží lineární či rozvětvené oligosacharidové řetězce. Existuje však i třída bílkovin glykosylovaných neenzymově *in vivo* nebo *in vitro*; pro tento proces je používán termín "glykace" a produkty této reakce jsou zvány "glykované bílkoviny" čili "neoglykoproteiny", na rozdíl od prve zmíněných "glykoproteinů". Neoglykoproteiny se dnes těší značnému zájmu zvláště klinických biochemiků, farmakologů, ale i fyzikálních chemiků. Stárnutí, diabetes mellitus, oční katarakt či výzkumy cílené dopravy léčiv nebo stabilizace enzymů, to vše s touto skupinou bílkovin souvisí.

2. Vznik neoglykoproteinů

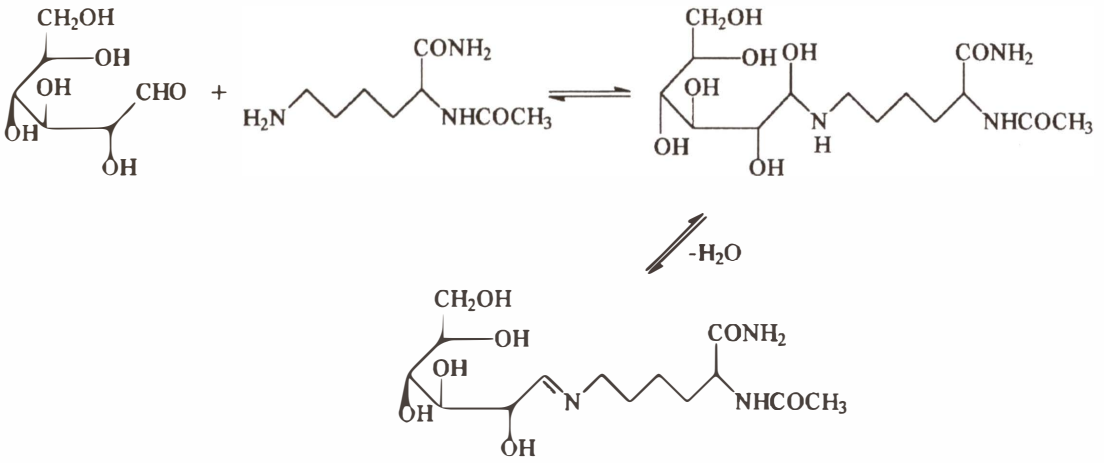
Neoglykoproteiny mohou vzniknout některým ze tří způsobů: Amadoriho přesmykem Schiffovy báze vzniklé z cukru a některé volné aminoskupiny bílkoviny, dále redukcí této Schiffovy báze a konečně reakcí aktivovaného sacharidu s různými skupinami povrchu bílkovinné molekuly.

2. 1. Tvorba Schiffovy báze

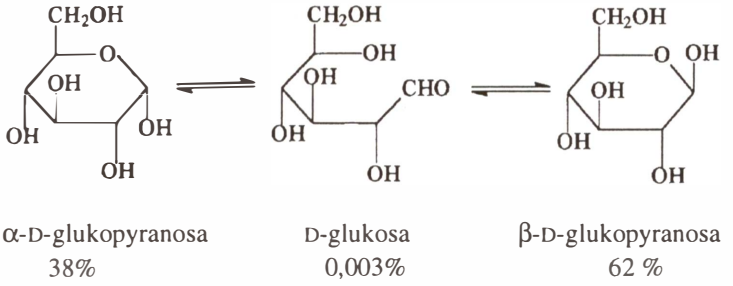
První dva jmenované způsoby mají první reakční krok, totiž tvorbu Schiffovy báze, společný. Ta vzniká např. z glukosy a volné α-aminoskupiny peptidového řetězce nebo ε-aminoskupiny některého lysylového zbytku. Jiné skupiny (např. hydroxylové, amidové, apod.) spontánně nereagují. Schiffova báze vzniká rovnovážnou reakcí (obr. 1) a je více či méně nestabilní. Rychlost této reakce závisí na pH: s jeho rostoucí hodnotou se tato rychlost zvyšuje, neboť je k dispozici více neprotonované formy aminu, tedy té formy, která reakci jedině podstupuje[1,2]. Rozdílná je také rychlost, s jakou tvoří Schiffovu bázi různé sacharidy a vůbec různé aldehydy[3]. Vliv zde mají nejen různé indukční efekty, ale i možnost a ochota různých cukrů tvořit poloacetalový kruh. Tak např. glyceraldehyd reaguje s aminoskupinou bílkoviny daleko rychleji než glukosa, neboť ta se ve své reaktivní acyklické formě vyskytuje v roztoku jen asi z 0,003 %[4] (obr. 2).

2. 2. Amadoriho přesmyk

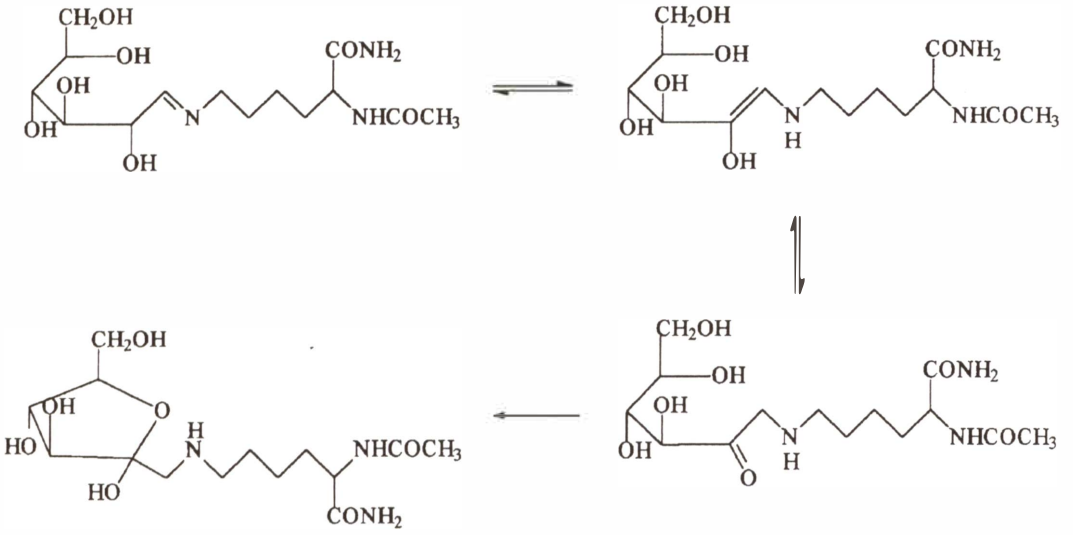
Tzv. Amadoriho přesmyk[5,6] Schiffovy báze je jedinou cestou, jak vznikají neoglykoproteiny *in vivo*. Výsledkem reakce glukosy a N^{α}-acetyllysinamidu není 1-(N^{ε}-(N^{α}-acetyllysinamidyl)) glukosa, ale 1-deoxy-1-(N^{ε}-(N^{α}-acetyllysinamidyl) fruktofuranosa (obr. 3).



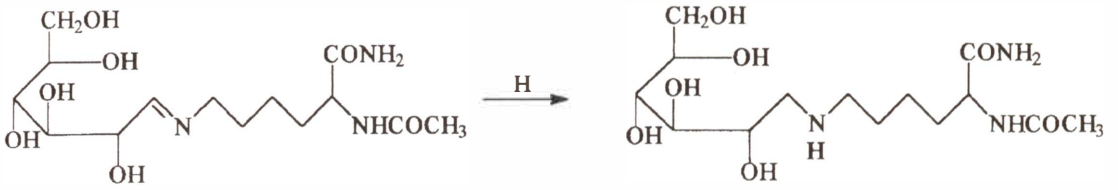
Obr. 1. **Tvorba Schiffovy báze z glukosy a N^{α}-acetyllysinamidu**



Obr. 2. **Rovnováha mezi cyklickou a acyklickou formou D-glukosy**



Obr. 3. **Amadoriho přesmyk Schiffovy báze vzniklé z glukosy a N^{α}-acetyllysinamidu**



Obr. 4. **Redukce Schiffovy báze glukosy a Nα-acetyllysinamidu**

Přesmyk probíhá mnohem pomaleji než tvorba Schiffovy báze[1,7]. Jelikož ta je navíc poměrně nestabilní, jsou podíly navázaného cukru (ve formě 1-deoxyfrukto-furanosy) velmi nízké i po delší době reakce. Tak např. hemoglobin, jehož molekula se pohybuje v krevním řečišti asi 120 dní při okolní běžné koncentraci glukosy 5 mmol.l^{-1}, má na konci své životní dráhy navázaných nejvýše jen 5 molekul sacharidu[8]. Připomeňme, že hemoglobin má k dispozici celkem 44 ε- a 4 α- aminoskupiny. Je tedy modifikováno nejvýše 10 % všech volných aminoskupin.

2. 3. Reduktivní aminace

Přidá-li se do roztoku směsi sacharidu a bílkoviny navíc redukční činidlo, zredukuje se vzniklá Schiffova báze na sekundární amin, a tak se zamezí jak jejímu zpětnému rozpadu tak Amadoriho přesmyku[9,10]. Proto se někdy tento zákrok sice nesprávně, ale účelně označuje jako "stabilizace Schiffovy báze". Správně jde o reduktivní aminaci či reduktivní alkylaci, to podle toho, ke které reagující složce přihlížíme. Výsledkem reakce např. glukosy a N$^{\alpha}$-acetyllysinamidu je 1-deoxy-1-(N$^{\varepsilon}$-(N$^{\alpha}$-acetyllysinamidyl)) glukosa (obr. 4).

Jako redukčního činidla se nejčastěji používají různé organické borany, borohydrid nebo kyanoborohydrid sodný[11]. Posledně jmenovaný má tu výhodu, že při pH 4-10 neredukuje aldehydovou skupinu, ale pouze Schiffovu bázi[12], a může být proto přidán do reakční směsi již na začátku. Borohydridový anion, kromě toho, že v neutrální oblasti redukuje aldehydy, je ve vodném prostředí méně stabilní než anion kyano-borohydridový[13]. Některé organické borany, jako např. pyridin boran, jsou, jak se ukázalo, sice silnějšími redukovadly Schiffových bází než kyanoborohydridy při současné netečnosti vůči aldehydům, ale redukují některé další reaktivní skupiny bílkoviny, např. přeměňují tryptofan na dihydrotryptofan[11].

Pokud je cílem připravit co nejvíce glykovanou bílkovinu, je reduktivní aminace vhodnější než dlouhodobá inkubace samotné bílkoviny s cukrem, tedy cesta Amadoriho přesmyku. Tak např. po inkubaci 0.2 mM albuminu s 60 mM glukosou a 300 mM $NaBH_3CN$ (tj. molární poměr cukr : lysin : redukovadlo asi 5:1:25) při pH 9,0 po dobu 200 hod. při 37 °C bylo glykováno 60 % přítomných ε-aminoskupin bílkoviny[11].

2. 4. Aktivované sacharidy

Třetí cesta přípravy neoglykoproteinů vychází z aktivovaných sacharidů. V průběhu let byly vyzkoušeny např. *p*-aminofenylisothiokyanáto-, fenyldiazonium-[14], azido-, 4-N-akrylamidofenyl-[15] a 2-imino-2-methoxyethyl-1-thio-[16] glykosidy. Výtěžky reakcí jsou srovnatelné nebo i lepší než u reduktivní aminace (tab. I). Určitou nevýhodou uvedených postupů je, že se kromě sacharidové funkce zavádí do bílkovinné molekuly další, převážně hydrofobní skupiny.

2. 5. Stanovení stupně glykace

Ke stanovení stupně glykace bylo vypracováno mnoho rozličných metod. Dříve než je však některá z nich využita, bývá obvykle reakční směs podrobena dialýze nebo gelové filtraci za účelem oddělení bílkoviny od nezreagovaných nízkomolekulárních složek. Pokud je pro další experimenty vyžadován čistý neoglykoprotein, bývá od neglykované bílkoviny oddělen pomocí afinitní chromatografie.

Pro stanovení stupně glykace jsou užívány především spektrofotometrické, ale i radiometrické, chromatografické, elektroforetické a bioafinitní metody[8,17,18]. Snad nejjednodušší a proto oblíbenou je tzv. fenolsírová metoda. Při ní se v prostředí koncentrované kyseliny sírové tvoří z cukru (ať vázaného na bílkovinu či volného) a fenolu barevný derivát 5-hydroxymethylfurfuralu, který se stanoví spek-

Tabulka I
Reakce různých glykosidů s hovězím albuminem

glykosid	výchozí poměr glykosid/lysin [mol/mol]	pH	doba inkubace [hod.] a teplota lázně [°C]	výtěžek podíl glykovaných lysinů [%]	odkaz
4-N-akryl-amidofenyllaktosa	2 : 1	9,5	100/37	30	15
2-imino-2--methoxyethyl-1-thiogalaktosa	17 : 1	8,5	0,5/25	60	16
glukosylfenyl-isothiokyanát	2,5 : 1	9,0	6/25	90	14

trofotometricky. Na podobném principu je založena thiobarbiturátová (TBA) metoda, kdy vzniklý 5-hydroxymethylfurfural reaguje s thiobarbiturovou kyselinou za vzniku barevné sloučeniny. V klinické praxi se při analýze osvědčila tzv. metoda NBT (Nitroblue tetrazolium), využívající specifických redukčních schopností fruktosaminu, vzniklého rozštěpením produktu Amadoriho přesmyku, který redukuje bezbarvou triaryltetrazoliovou sůl na barevný triarylformazan. Změna absorbance provázející tento děj je koncentraci fruktosaminu úměrná[18,19]. Radiometrické metody, ač oproti předcházejícím uvedeným náročnější na vybavení a čas, jsou přesnější a jako absolutní metody slouží ke kalibraci metod ostatních. Při radiometrickém stanovení se po rozštěpení bílkoviny a chromatografickém rozdělení hydrolyzátu měří radioaktivita 1-(N^{ε}-lysyl) glykosidu, jestliže byl předtím při glykaci použit ^{14}C značený sacharid[1] a nebo když byla Schiffova báze redukována ^{3}H značeným redukovadlem[20,21].

Jiným přístupem lze stanovit změnu náboje bílkoviny, která při glykaci nastane a která je úměrná počtu navázaných sacharidových jednotek. Mezi metodami elektroforézy na nosičích, izoelektrické fokusace a ionexové chromatografie dosáhla rutinního uplatnění v klinických laboratořích zvláště posledně jmenovaná[18].

Pokud jde jen o stanovení podílu glykované formy bílkoviny, lze mimo jiné chromatografické metody použít bioafinitní chromatografii[22], kde na nosiči zachycená *m*-aminofenylboronová kyselina (vážící obecně všechny vicinální dioly) váže neoglykoprotein, přičemž vše ostatní prochází kolonou bez zádrže. Komplex se dá uvolnit buď snížením pH či zavedením nějakého soutěžícího polyolu. Také tato metoda je široce rozšířena v klinické praxi.

3. Přehled následků molekulárních změn vyvolaných glykací

Neoglykoproteiny mívají oproti svým nemodifikovaným protějškům některé nové vlastnosti, které je činí hodnými zájmu. Mezi ně patří:
– zvýšení rozpustnosti ve vodě[23],
– změny odolnosti konformace k denaturaci[24],
– změny v afinitě k substrátu, transportované molekule či protilátce[8,21,25,26],
– změny v absorpčních a fluorescenčních vlastnostech[21,27,28,29,30].

Jevy na molekulové úrovni, které za těmito novými vlastnostmi vždy stojí, jsou:
– zvýšení hydrofility povrchu bílkoviny[31,32],
– změna izoelektrického bodu (nově vzniklé sekundární aminy mají nižší pK_a než původně přítomné aminoskupiny lysinů a mimo to se v případě vazby nabitých cukrů (např. sialových kyselin) přináší další náboj)[27,28],
– prostorové zastínění určité struktury původně exponované do prostředí[31],
– zavedení nové imunogenní struktury[15,26],
– zvýšení molekulové hmotnosti úměrné stupni glykace.

Někdy dochází :
– ke změně konformace peptidového řetězce[21,26,28],
– k intra- či intermolekulárnímu prokřížení bílkoviny přes jednu molekulu sacharidu[33,34,35],
– po delší době inkubace k tvorbě tzv. pokročilých produktů glykosylace (AGE – advanced glycosylation end products), které bývají řazeny mezi produkty Maillardových reakcí[19,34].

Uvedené molekulární změny nezpůsobují měřitelné změny vlastností jednotlivě, ale komplexně, takže např. ke změně konformační stability přispívá společně s hydrofilizací povrchu bílkoviny i zastínění určitých původně exponovaných hydrofobních oblastí, a také zesítění a konečně změna nábojových poměrů vedoucí k posunu izoelektrického bodu. Podobně zastínění určitých oblastí povrchu bílkovinné molekuly může vést nejen ke stabilizaci konformace a zvýšení rozpustnosti, ale i ke změnám v afinitě k různým ligandům. Pro lepší představu bude dobré některé z těchto vztahů dokumentovat na typických příkladech.

4. Některé příklady vlivu glykace na vlastnosti bílkovin

4.1. Hemoglobin a albumin: změny afinity k přenášené molekule a přednostní místa glykace

Glykace hemoglobinu a albuminu na sebe soustřeďuje od poloviny 70. let pozornost, neboť jde o významné krevní bílkoviny. Význam glykohemoglobinu vzrostl zvláště po té, co začal být místo přímého měření glykémie resp. glykosurie (tj. koncentrace volné glukosy v krvi resp. v moči) používán pro sledování kompenzace diabetických pacientů[8]. Podíl glykované formy oproti celkovému hemoglobinu totiž odráží koncentrace krevního cukru za celé sledované období, kdežto glykémie a glykosurie se rychle mění podle metabolické situace.

Nejprve si všimněme, jak glykace, pokud zasáhne klíčové místo, může ovlivnit vazbu jiných molekul na tyto bílkoviny. Nejznámější z glykohemoglobinů, označovaný A_{1c}, je modifikován glukosou na N-koncových valinech svých β-řetězců a následkem toho má zvýšenou afinitu ke kyslíku. Glukosa je totiž navázána v místě vazby allosterického efektoru, 2,3-bisfosfoglycerátu, který kyslíkovou afinitu přirozeně snižuje a nyní je mu tato funkce znemožněna. Jiná z glykoforem hemoglobinu, označovaná A_{1aII}, která je modifikována na stejných místech, avšak glukosa-6-fosfátem, má naopak afinitu ke kyslíku sníženu. Je to proto, že fosfátová skupina cukru imituje účinek fosfátových skupin 2,3-bisfosfoglycerátu.

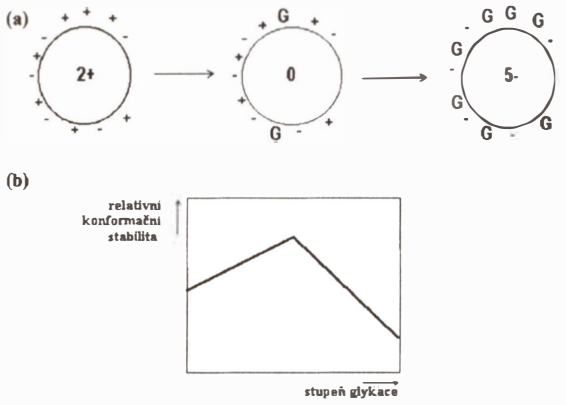
Přednostním místem glykace lidského albuminu[21,36] je ε-amino skupina Lys 525. Modifikace v tomto místě vede k poklesu afinity k bilirubinu a k vyšším mastným kyselinám, tedy k látkám běžně albuminem transportovaným. Je to proto, že Lys 525 hraje roli ve vazbě těchto látek na albumin, v případě mastných kyselin se pravděpodobně přímo účastní iontové vazby se záporně nabitým karboxylem.

Srovnáním míst glykace uvedených dvou bílkovin vyvstává otázka, které aminoskupiny jsou glykovány snadněji či obtížněji než jiné a proč. Proč je např. hemoglobin přednostně glykován na α-aminoskupině Val 1, kdežto albumin na ε-aminoskupině Lys 525? Jak bylo výše uvedeno, Schiffovu bázi vytvoří s aldehydovou skupinou cukru jedině neprotonovaná aminoskupina. Tvorba Schiffovy báze je tedy upřednostněna u aminoskupin s výjimečně nízkou hodnotou pK_a, jako např. u volné α-aminoskupiny konce β-řetězce hemoglobinu (pK_a=6,84 pro deoxy-Hb)[5,37]. Avšak jak vysvětlit fakt, že koncová α-aminoskupina α-řetězce hemoglobinu má také výjimečně nízkou hodnotu pK_a (7,79 pro deoxy-Hb), a přesto je glykována až v pořadí za jinými aminoskupinami včetně některých ε-aminoskupin lysylů, které mají pK_a mnohem vyšší (okolo 10)[8]? Ke shora uvedenému vysvětlení je totiž nutno navíc uvážit, že Schiffova báze vzniká vratnou reakcí a že následující krok, Amadoriho přesmyk, je katalyzován protony[2]. Pokud se tedy v okolí aminoskupiny vyskytují vhodné katalyzující skupiny, je taková aminoskupina pro glykaci zvýhodněna. Původně se jako s katalyzátory počítalo s karboxyskupinami glutamové a asparagové kyseliny[20]. Dnes se však předpokládá, že acidobazickou katalýzu mohou zprostředkovat spíše bazické aminokyselinové zbytky nacházející se s danou aminoskupinou v sekvenci.

4.2. Krystalliny: změna konformační stability

Krystalliny tvoří 90 % hmotnosti proteinů oční čočky a dovolují udržovat její průhlednost. Právě tato vlastnost bývá v pokročilém věku organismu narušena, neboť jako dlouhožijící proteiny mohou být molekuly krystallinů bohatě glykovány a následně intermolekulárně zesíťovány. Následkem toho dochází ke změnám v průhlednosti oční čočky. Na příkladu krystallinů[24,27,28] je patrné, jak může být glykace spojena se změnou konformační stability. (Pro připomenutí, za míru konformační stability se považuje Gibbsova energie nutná k převedení bílkoviny nacházející se ve vodném prostředí a při fyziologickém pH a teplotě ze sbaleného, nativního stavu do stavu rozbaleného, denaturovaného.) Je známo, že významným faktorem podílejícím se na udržení sbaleného stavu mohou být elektrostatické interakce[38,39]. Vychází se při tom z úvahy, že bílkovina je nejstabilnější při pH svého izoelektrického bodu, kdy je

počet odpudivých interakcí minimalizován. Dále, jak bylo naznačeno výše, p*K* aminoskupin bílkoviny se glykací výrazně sníží, a tak se v neutrální oblasti tyto aminoskupiny neprotonují. Následkem toho se přeruší některé stabilizující elektrostatické interakce a mohou se vyskytnout interakce odpudivé. To se zřejmě děje u bazického γ-krystallinu[24], jehož konformační stabilita se, jak postupuje glykace, nejprve zvýší (právě když dochází k vyrovnání opačných nábojů), ale nakonec sníží a je nižší než na počátku. Existence stabilnějšího mezistavu zatím nebyla experimentálně potvrzena a provedené pokusy vedly vždy k neoglykoproteinu o nižší stabilitě (obr. 5).



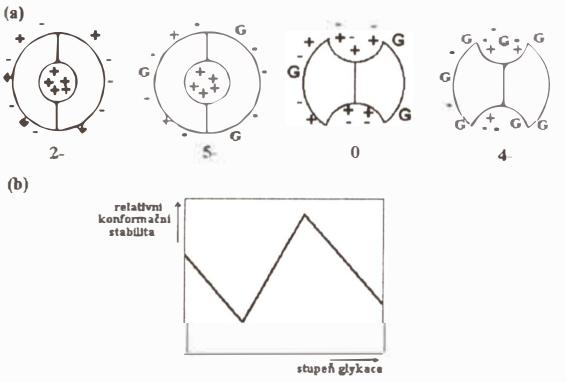
Obr. 5. **(a) Modelové schéma zachycující nábojové poměry v závislosti na stupni glykace bílkoviny typu γ-krystallinu.** Čísla představují čistý náboj bílkoviny. Slabší čarou je nakreslen hypotetický stav. (b) Tatáž situace schematicky přenesená do grafu závislosti relativní konformační stability na stupni glykace

U oligomerních bílkovin s náboji pohřbenými uvnitř globule se setkáváme s opačným jevem. Tak α-krystallin, kyselý oligomer, je (na rozdíl od dříve uvedeného γ-krystallinu) glykací stabilizován. Nabízí se následující vysvětlení[24]: Po prvotní destabilizaci a změně konformace vlivem glykace, jak k tomu došlo nakonec i u γ-krystallinu (viz obr. 5), se na povrch dostanou doposud pohřbené kladně nabité zbytky. Ty vytvoří nové stabilizující elektrostatické interakce, jejichž počet je oproti počátečnímu stavu vyšší, a tak je nová struktura stabilnější (obr. 6).

Vidíme tedy, že účinek glykace může být různý podle nábojově-konformačních vlastností dané bílkoviny.

4. 3. Glykované enzymy: vliv na rozpustnost a stabilitu

Široce byl studován vliv glykace na stabilitu enzymů a jejich rozpustnost. Zdá se, že hlavním prvkem je tu efekt hydrofilizace povrchu bílkoviny[31]. Při reakci s ketosami může dojít i k intermolekulárnímu zesítění, kdy jsou dvě molekuly bílkoviny vázány na jednu molekulu sacharidu přes uhlíky C_1 a C_2. Tím se zmenší specifický povrch bílkoviny, což může vést ke stabilizaci aktivní konformace. Glykací byly získány enzymy s vlastnostmi zajímavými zvláště pro biotechnologii: např. laktosylovaný trypsin[32], který si při svém fyziologickém pH udržuje až 70 % své aktivity i po 2hodinové inkubaci při 70 °C, zatímco nemodifikovaný enzym má po této době již jen asi 10 % původní aktivity. Při těchto modifikacích však může dojít i k nežádoucí modifikaci v oblasti aktivního místa. Na podkladě znalosti mechanismu enzymové reakce a struktury aktivního místa lze často vytipovat různé sloučeniny, které pak po dobu glykace stíní aktivní místo a tak je před glykací chrání.



Obr. 6. **(a) Modelové schéma zachycující nábojové poměry v závislosti na stupni glykace bílkoviny typu α-krystallinu.** Je tu znázorněna změna konformace podjednotek vedoucí k "vynoření se" dosud uvnitř pohřbených nábojů. Čísla představují čistý náboj bílkoviny. Slabší čarou jsou nakresleny hypotetické stavy. (b) Tatáž situace přenesená do grafu závislosti relativní konformační stability na stupni glykace

4. 4. Farmakologicky zajímavé přístupy: vliv na intermolekulární interakce

Na závěr uvedeme několik příkladů využití neoglykoproteinů v oblasti farmakologie. Ukázalo se např., že interleukin 2 modifikovaný reakcí s azidotriglykosidem, byl nejenom lépe rozpustný ve vodě a teplotně mnohem stabilnější, ale že měl i nové fyziologické vlastnosti[23]. Neoglykoprotein téměř ztratil terapeuticky nežádoucí

schopnost aktivovat proliferační cyklus T-lymfocytů, zatímco ostatní, v terapii nádorů žádané schopnosti[40], jako aktivace přirozených zabíječů, aktivace B-lymfocytů a indukce lymfokinem aktivovaných zabíječů, zůstaly zachovány nebo byly i zvýšeny. Změnu lze vysvětlit takto[23]: úseky interleukinového receptoru zprostředkovávající zachované aktivity jsou stále schopny interakce s glykovaným interleukinem, protože úsek na řetězci interleukinu, účastnící se této interakce, neobsahuje žádné modifikovatelné lysiny. Naopak, peptidová sekvence účastnící se normálně interakcí s jinými úseky receptoru, které vedou k nežádoucím aktivitám, modifikovatelné lysylové zbytky obsahuje, a tak je glykací pozměněna, a tudíž pro původní interakci ztracena.

Neoglykoproteinu bylo již několikrát užito jako nosiče molekuly léčiva. Šlo např. o cílenou dopravu antivirového 3'-azido-3'-deoxythymidin 5'-monofosfátu vázaného na glykovaný lidský albumin do lidských T_4-lymfocytů[41]. Na povrchu těchto buněk jsou přítomny cukr rozeznávající lektiny a ty neoglykoprotein i s léčivem váží. Albumin, obsahující léčivo a 22 mannos navázaných ve formě thiofosgenem aktivovaných *p*-aminofenylglykosidů, byl *in vitro* asi 30krát účinnější proti HIV-1 než konjugát neglykovaný. Mimořádně zajímavý je nález, že více glykovaný albumin, modifikovaný 40ti mannosovými jednotkami, vykazoval anti-HIV aktivitu samotný, bez léčiva[41]. To mohlo být způsobeno tím, že tento neoglykoprotein po vazbě na buňku bránil samotné interakci s virem.

Bílkoviny jako pouhého nosiče imunogenní vlastnosti sacharidu bylo použito i v jiných případech, např. při obecných studiích fyziologických funkcí sialových kyselin[42], při simulaci chování určitých antigenů[26] nebo při zavedení sacharidové funkce do membrány (např. ukotvení gangliosidů ve formě neoglykoproteinu)[43].

5. Závěr

Účelem tohoto přehledu nebylo vypočítat vše, čeho se doposud dosáhlo ve výzkumu necnzymové glykosylace bílkovin jak *in vivo,* tak *in vitro*, ale pouze upozornit na některé zajímavé body z této oblasti.

Viděli jsme tedy, že příprava neoglykoproteinů není nijak obtížná, že nelze účinek glykace zcela jednoznačně předpovědět a že z výzkumů glykace bílkovin lze mnohdy činit závěry o biologických a konformačních vlastnostech studované molekuly. Neoglykoproteiny mohou vhodně doplňovat informace získané při studiích přirozených glykoproteinů. Čtenář si mohl povšimnout, že neoglykoproteiny představují problematiku, ke které lze přistupovat z nejrůznějších úhlů zájmu.

LITERATURA

1. Higgins P. J., Bunn H. F.: J. Biol. Chem. *256*, 5204 (1981).
2. Lowrey C. H., Lyness S. J., Soeldner J. S.: J. Biol. Chem. *260*, 11611 (1985).
3. Zaugg R. H.: J. Biol. Chem. *252*, 8542 (1977).
4. Acharya A. S., Sussmann L. G.: J. Biol. Chem. *259*, 4372 (1984).
5. Harding J. J.: Advan. Protein Chem. *37*, 248 (1985).
6. Acharya A. S., Manning J. M.: J. Biol. Chem. *255*, 7218 (1980).
7. Baynes J. W., Thorpe S. R., Murtiashaw M. H.: Methods Enzymol. *106*, 88 (1984).
8. Rácz T., Vícha T., Pačin J.: *Diabetes mellitus a glykácia bielkovín.* Osveta, Martin 1989.
9. Schwartz B. A., Gray G. R.: Arch. Biochem. Biophys. *181*, 542 (1977).
10. Morehead H., McKay P., Watzel R.: Anal. Biochem. *126*, 29 (1982).
11. Wong W. S. D., Osuga D. T., Feeney R. E.: Anal. Biochem. *139*, 58 (1984).
12. Borch R. F., Bernstein M. D., Durst H. D.: J. Am. Chem. Soc. *93*, 2897 (1971).
13. Fager R. S.: Methods Enzymol. *81*, 288 (1982).
14. Reichert C. M.: Methods Enzymol. *242*, 108 (1994).
15. Romanowska A., Meunier S. J., Tropper F. D., Lafemiere C. A., Roy R.: Methods Enzymol. *242*, 90 (1994).
16. Lee Y. C., Stowell C. P., Krantz M. J.: Biochemistry *15*, 3956 (1976).
17. Fluckiger R., Gallop P. M.: Methods Enzymol. *106*, 77 (1984).
18. Burtis C. A., Ashwood E. R. (eds.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, str. 980. Philadelphia 1994.
19. Shaw S. M., Crabbe M. J. C.: Int. J. Peptide Protein Res. *44*, 594 (1994).
20. Watkins N. G., Thorpe S. R., Baynes J. W.: J. Biol. Chem. *260*, 10629 (1985).
21. Shaklai N., Garlick R. L., Bunn H. F.: J. Biol. Chem. *259*, 3812 (1984).
22. Klenk D. C., Hermanson E. T., Krohn R. I.: Clin. Chem. *28*, 2088 (1982).
23. Subramaniam S., Linna T. J.: Methods Enzymol. *242*, 47 (1994).

24. Luthra M., Balasubramanian D.: J. Biol. Chem. *268*, 18119 (1993).
25. Tsai C. S., White J. H.: Biochem. J. *209*, 309 (1983).
26. Roy R., Laferniere C. A., Pon R. A., Gamian A.: Methods Enzymol. *247*, 351 (1994).
27. Beswick H. T., Harding J. J.: Biochem. J. *246*, 761 (1987).
28. Beswick H. T., Harding J. J.: Biochem. J. *223*, 224 (1984).
29. Sakurai T., Takahashi H., Tsuciya S.: FEBS Letters *176*, 27 (1984).
30. Ganea E., Dain J. A., Rhoads D. E.: Rev. Roum. Biochim. *29*, 173 (1992).
31. Mozhaev V. V., Melik-Nubam N. S., Šiksnis V., Martinek K.: Biocatalysis *3*, 189 (1990).
32. Vaňková H., Pospíšilová M., Tichá M., Turková J.: Biotechnol. Techniq. *8*, 375 (1994).
33. McPherson J. D., Shilton B. H., Walton D. J.: Biochemistry *27*, 1901 (1988).
34. Ponger S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 2684 (1984).
35. Eble A. S., Thorpe S. R., Baynes J. W.: J. Biol. Chem. *258*, 9406 (1983).
36. Iberg N., Fluckiger R.: J. Biol. Chem. *261*, 13542 (1986).
37. Garner M. H., Bogaedt R. A., Gurd F. R. N.: J. Biol. Chem. *250*, 4398 (1975).
38. Alber T.: Annu. Rev. Biochem. *58*, 765 (1989).
39. Stinger D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 4176 (1991).
40. Šterzl J.: *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*, str. 106, 118; ČIS, Praha 1993.
41. Melema G. et al.: Biochem. Pharmacol. *40*, 2603 (1990).
42. Roy R., Laferriere C. A.: Can. J. Chem. *68*, 2045 (1990).
43. Mahoney J. A., Schnaar R. L.: Methods Enzymol. *242*, 17 (1994).

R. Souček *(Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague):*
Neoglycoproteins - the Interesting Derivatives of Proteins

The article briefly reviews genesis, nature, methods of determination and application of nonenzymatically glycosylated, or glycated, proteins, often referred as neoglycoproteins. The new properties of the protein molecule which result from glycation are discussed with respect to the changes on molecular level. The extensive part of the article is dedicated to the increased affinity of oxygen in glycohemoglobin, the specific sites of glycation in albumin and the changes of conformational stability in glycated crystallins.

Chem. Listy *90*, 486 – 496 (1995)

KYSELINA ROSMARINOVÁ A JEJÍ BIOLOGICKÁ AKTIVITA

VĚRA HOLZMANNOVÁ

Ústav lékařské chemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Došlo dne 22.III.1996

Obsah

1. Úvod
2. Výskyt, izolace, chemické vlastnosti a metody stanovení
3. Biologické účinky
   3.1. Antioxidační aktivita
   3.2. Protizánětlivá aktivita
   3.3. Antimikrobiální aktivita
   3.4. Ostatní
4. Závěr

1. Úvod

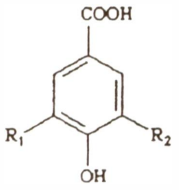
Kyselina rosmarinová (RK) patří do skupiny fenolických kyselin, které se v rostlinách vyskytují jednak jako deriváty kyseliny benzoové (typ C_6-C_1), jednak jako fenylpropanoidy (typ C_6-C_3), kde nejvýznamnějšími zástupci jsou deriváty kyseliny skořicové. Oba typy kyselin jsou v rostlinách nacházeny buď jako volné, hlavně C_6-C_1, nebo vázané jako estery, amidy nebo glykosidy, hlavně C_6-C_3. Deriváty kyselin hydroxyskořicových, zvláště kyselina rosmarinová, jsou chemotaxonomicky zajímavé pro čeleď Lamiaceae (hluchavkovité)[1]. Vzorce nejrozšířenějších fenolických kyselin obou typů jsou uvedeny na obr. 1. Řada z těchto kyselin je intenzivně studována z hlediska možného využití v lékařství, kosmetice a potravinářství, zejména jako přírodních antioxidantů.

Kyselina rosmarinová, α-[[3-(3,4-dihydroxyfenyl)-1--oxo-2-propenyl]-oxy]-3,4-dihydroxy-[R-(E)]-benzenpropanová kyselina, [CAS-20283-92-5], je ester kyseliny kávové s kyselinou D-3-(3,4-dihydroxyfenyl)mléčnou[2]. Její struktura byla určena na základě odbourávacích reakcí v roce 1958 (lit.[3,4]). Poprvé byla RK isolována z rozmarýnu[3] (*Rosmarinus officinalis*), meduňky[5] *(Mellisa officinalis)*, máty[5] *(Mentha piperita)* a šalvěje[5] *(Salvia officinalis)*. Řada rostlin, jejichž významnou obsahovou látkou je RK, se používá v evropském a asijském lidovém léčitelství po více než 2000 roků. Extrakty těchto rostlin jsou aktivní složkou fytoterapeutických přípravků, např. antivirotik Lakinal®(Slovakofarma) a Lomaherpan®(Lomapharm).

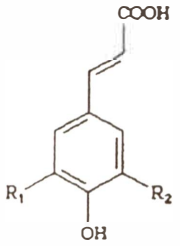
2. Výskyt, izolace, chemické vlastnosti a metody stanovení

Biosyntéza RK v rostlinách (obr. 2) vychází z fenylalaninu a tyrosinu[6]. Je zajímavé, že obě C_6-C_3 jednotky RK se tvoří z rozdílných aminokyselin. Fenylalanin je přeměňován na kyselinu skořicovou, z ní na kyselinu *p*-kumarovou a dále na kyselinu kávovou. Tyrosin přechází přes 3,4-dihydroxyfenylalanin a kyselinu 3,4-dihydroxyfenylpyrohroznovou na kyselinu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)mléčnou a v posledním kroku je z obou prekurzorů syntetizována RK. Biogenese RK u buněčné kultury *Coleus blumei* je diskutována v práci[7] a u kultury *Anchusa officinalis* v lit.[8].

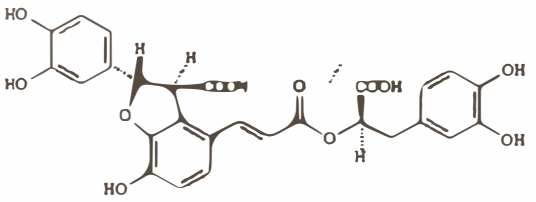
RK se vyskytuje nejvíce v rostlinách čeledí Lamiaceae (hluchavkovité), Boraginaceae (brutnákovité), Apiaceae (mrkvovité), Rubiaceae (mořenovité) a Plantaginaceae (jitrocelovité). RK byla dále nalezena v kapradinách rodu *Blechnum*[9] a meších rodu *Anthocerotae*[10]. Přehled rostlin, které obsahují RK, je uveden v tabulce I. Kyselinu rosmarinovou je možné v zajímavém výtěžku získat také z buněčných kultur rostlin, např. *Hyssopus officinalis*[11], *Mentha spicata*[11], *Mentha longifolia*[11], *Lavandula angustifolia*[11], *Plectranthus caninus*[11], *Rosmarinus officinalis*[11], *Salvia officinalis*[11], *Lithospermum erythrorhizon*[12]. Získávání RK buněčnými kulturami *Coleus blumei* je věnován přehledný článek Petersena[13]. V 30-litrovém reaktoru bylo dosaženo výtěžku 5 g kyseliny v litru kultivačního media, což odpovídá obsahu RK 20% suché váhy buněk[14]. Kyselina rosmarinová je z biologického materiálu extrahována



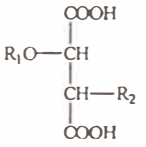
$R_1 = R_2 = H$, 4-hydroxybenzoová
$R_1 = OH$, $R_2 = H$, protokatechová
$R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, vanilová
$R_1 = R_2 = OH$, gallová
$R_1 = R_2 = OCH_3$, syringová



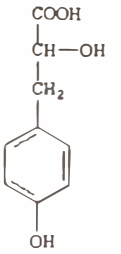
$R_1 = R_2 = H$, *para*-kumarová
$R_1 = OH$, $R_2 = H$, kávová
$R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, ferulová
$R_1 = R_2 = OCH_3$, sinapová



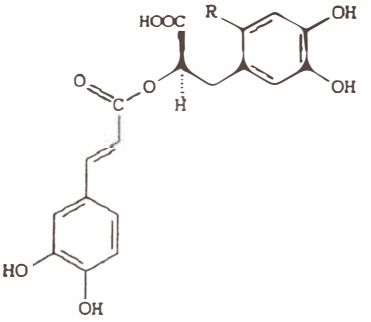
lithospermová



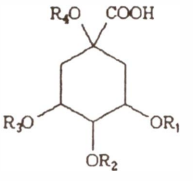
R_1 = kafeoyl, $R_2 = H$, kafeoyljablečná
R_1 = kafeoyl, $R_2 = OH$, kafeoylvinná



4-hydroxyfenyl-α-hydroxypropanová

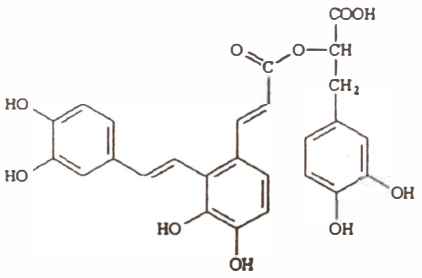


R = H, rosmarinová
R = 4-hydroxybenzyl, 2-kafeoyloxy-[4,5-dihydroxy-2-(4-hydroxybenzyl)fenyl]propanová

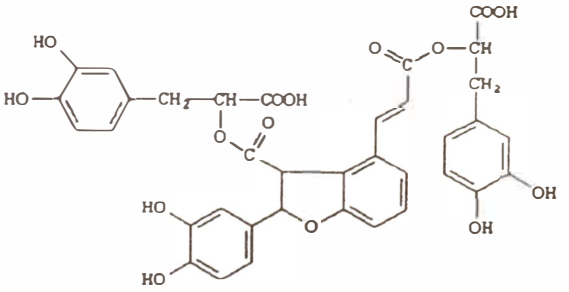


R_1 = kafeoyl, $R_2 = R_3 = R_4 = H$, chlorogenová
R_3 = kafeoyl, $R_1 = R_2 = R_4 = H$, neochlorogenová
$R_2 = R_4$ = kafeoyl, $R_1 = R_3 = H$, cynarin
$R_1 = R_3$ = kafeoyl, $R_2 = R_4 = H$, 3,5-di-O-kafeoylchinová
$R_1 = R_2$ = kafeoyl, $R_3 = R_4 = H$, 3,4-di-O-kafeoylchinová

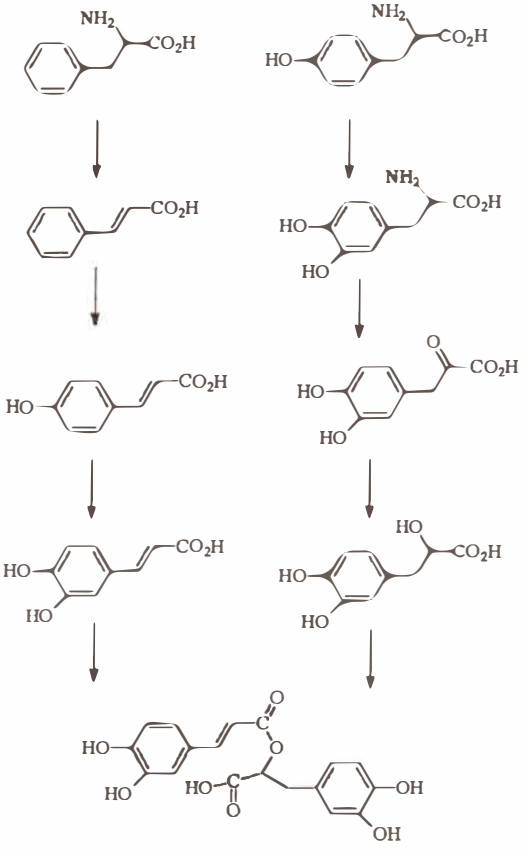
Obr. 1. **Fenolické kyseliny**



šalvějová A



šalvějová B



Obr. 2. **Biosyntéza kyseliny rosmarinové v rostlinách rodu Mentha (lit.[6])**

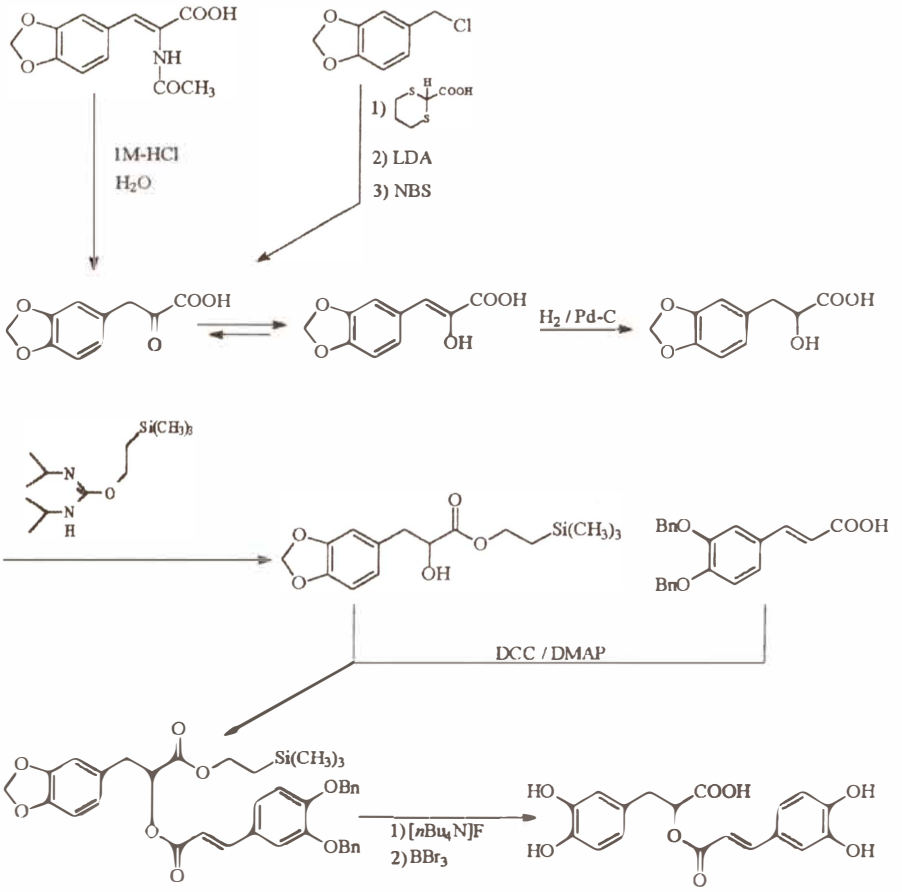
nejčastěji methanolem[12, 15-19] nebo acetonem[20], méně často vodným methanolem[21, 22], vodným ethanolem[7, 23, 24] a vodou[25, 26]. Z odparku rozpuštěného ve vodě je kyselina srážena buď octanem olovnatým[3, 6, 23, 27] nebo extrahována ethylacetátem[10, 17, 23], etherem[15, 21] a případně dočištěna chromatografií na silikagelu[17], Sephadexu-LH 20 (lit.[12, 18, 22]), polyamidu[17, 19, 22], nízkotlakou chromatografií[20, 22] na reversní fázi C-8 nebo C-18 nebo preparativní HPLC[18]. Byla popsána i separace na pevné fázi polystyrenovým nosičem Amberlit XAD-2 (lit.[25]).

Jinou možností získání RK je chemoenzymatická syntéza. Synteticky připravený kafeoylkoenzym A acyluje kyselinu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)mléčnou za katalýzy synthasou kyseliny rosmarinové[28]. Byly popsány také dvě úplné syntézy (obr. 3). V obou je klíčovou sloučeninou piperonylpyrohroznová kyselina získaná buď z kyseliny β-(3,4-methylendioxy)-α-acetamidoskořicové[29] nebo pomocí Coreyovy-Seebachovy metody z piperonylchloridu[30]. Kyselina je hydrogenována na kyselinu piperonylmléčnou a ta je po chránění karboxylu kondenzována (N,N'-dicyklohexylkarbodiimid) s dibenzyletherem kyseliny kávové. Po odstranění chránících skupin byla získána racemická RK.

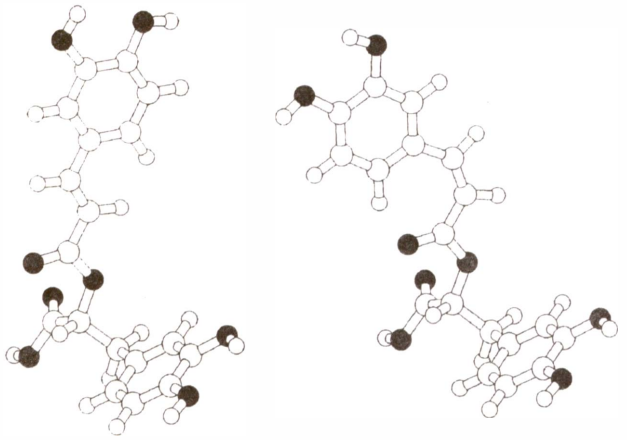
Základní fyzikální konstanty RK jsou: b.t.172 °C, $[\alpha]_D^{20}$ +122 ° (c1,2; ethanol), UV: λ_{max} 286 (shoulder), 323 nm (lit.[15]). Krystaluje z vody, v roztoku je málo stabilní, kromě hydrolýzy na kyselinu kávovou a D-3-(3,4-dihydroxyfenyl)mléčnou izomerizuje vlivem denního světla na rovnovážnou směs *cis*- a *trans*-derivátu.

Strukturní vzorce u *cis*- a *trans*-izomerů RK jsou uvedeny na obr. 4. Tvary molekuly byly optimalizovány molekulárním modelováním s využitím kvantově chemické metody PM3.

Pro identifikaci a stanovení RK byly použity metody papírové[3,15,16], tenkovrstevné[12,15,21], vysokoúčinné ten-



Obr. 3. **Chemické syntézy kyseliny rosmarinové.** NBS = N-bromsukcinimid, LDA = diisopropylamid lithný, DCC = dicyklohexylkarbodiimid, DMAP = 4-dimethylaminopyridin, Bn = benzyl



Obr. 4. **Molekula kyseliny *cis*- a *trans*-rosmarinové modelovaná programem MOLGEN 4.0**

kovrstevné chromatografie[31], plynové[19,32] a vysokoúčinné kapalinové chromatografie[12,16,21-24,27,33,34,90], dále ultrafialová[15,17] a infračervená spektroskopie[15,17], jaderná magnetická[17,35,36] a elektronová spinová rezonance[37] a hmotnostní spektrometrie[17,19,35]. Detekce RK při tenkovrstevné chromatografii na silikagelu je možná UV světlem[12,19,21], chloridem hlinitým[19,21] a chloridem železitým[19]. Nejprůkaznější detekce je s $FeCl_3$, kdy vzniká temně zelená skvrna. RK se dá stanovit fotometricky při 330 nm (log e 4,08). Jiná možnost je fotometrické stanovení[38] barevného

komplexu s Fe^{2+} při 572 nm (log ε 3,58). Bylo popsáno stanovení RK plynovou chromatografií[19,32], ale vzhledem k nutnosti derivatizace není tato metoda v současnosti využívána. V poslední době je pro analýzu RK nejvíce používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi, nejčastěji typu C-18, méně často C-8. Jako mobilní fáze slouží směsi kyseliny octové nebo fosforečné (nutnost zábrany ionizace), případně acetátového nebo fosfátového pufru s methanolem nebo acetonitrilem. Detekce se provádí při 330 nm a kratších vlnových délkách, eluce je izokratická[11,15] nebo gradientová[21-24,27,33,90].

3. Biologické účinky

Kyselina rosmarinová vykazuje antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální účinky. Čistá RK zatím není složkou žádných farmaceutických přípravků, řada fytoterapeutik však obsahuje extrakty standardizované na tuto sloučeninu[39].

3. 1. Antioxidační aktivita

Pro hodnocení antioxidačních účinků RK byla použita jako modelová reakce redukce radikálu difenylpikrylhydrazylu (DPPH)[24,40,41]. Pro RK byla nalezena inhibiční koncentrace IC_{50} 2,7 $mg.ml^{-1}$. Brand-Williams a spol.[42] studovali kinetiku a mechanismus redukce DPPH kyselinou rosmarinovou a dalšími 19 antioxidanty, např. kyselinou askorbovou, či deriváty kyseliny kávové. RK redukuje radikál DPPH do 30 min a její účinek je srovnatelný s α-tokoferolem (vitaminem E). Deriváty kyseliny kávové reagují pomaleji, ale vykazují stechiometrii 4-6 radikálů DPPH oproti dvěma pro RK. Práce[43,44,45] použily redukci DPPH k hodnocení antioxidačních účinků rostlinných extraktů a jejich aktivitu korelují s obsahem RK. Byla sledována inhibice lipoxygenasa-dependentní peroxidace kyseliny linolenové kyselinou 3,5-dikafeoylchinovou (IC_{50} $2{,}0.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$), RK ($2{,}0.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$), geraninem ($2{,}8.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$), vitaminem E ($3{,}7.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$), kyselinou chlorogenovou ($7{,}5.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$), kávovou ($7{,}5.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$) a ferulovou ($2{,}5.10^{-6}$ $mol.l^{-1}$) (lit.[46]). Pořadí inhibiční aktivity dobře korelovalo s pořadím schopnosti zhášet radikály získaným na modelu DPPH. Při měření ESR v nezávislém pokuse všechny kyseliny poskytovaly relativně stabilní ESR signály, které byly přiřazeny radikálu vzniklému jednoelektronovou oxidací dihydroxyfenylové skupiny. Autoři tedy usuzují, že mechanismus zhášení radikálů se běžně uplatňuje v chemických a biologických peroxidačních systémech. Derivát RK, 2-kafeoyloxy-3-[2-(4-hydroxy-benzyl)-4,5-dihydroxyfenyl]propionová kyselina izolovaná z *Origanum vulgare,* vykázal větší antioxidační aktivitu nežli RK na modelu inhibice reakce kyseliny linolenové s thiokyanatanem železitým[17]. Obě kyseliny byly hodnoceny jako lepší antioxidanty než vitamin E. Srovnání antioxidačního účinku kyselin rosmarinové, šalvějové A a šalvějové B, izolovaných z *Salvia miltiorrhiza,* na modelu lipoperoxidace indukované systémy NADPH/vitamin C a Fe^{2+}/cystein u potkaních mikrosomů izolovaných z mozku, jater a ledvin ukázalo, že všechny tři kyseliny mají srovnatelný inhibiční účinek[47,48]. Ke stejnému závěru vedly i výsledky u xanthin/xanthin oxidasového modelu[47] a potkaních erytrocytů hemolyzovaných H_2O_2 (lit.[48]). Na modelu lipoperoxidace indukované CCl_4 nebo Fe^{2+}/cystein u potkaních hepatocytů kyseliny vykazovaly aktivitu v následujícím pořadí šalvějová A > šalvějová B > RK. Studované kyseliny významně snižovaly produkci malondialdehydu a tvorbu superoxidového radikálu O_2^-. RK inhibuje sojovou lipoxygenasu (IC_{50} $8{,}3.10^{-4}$ $mol.l^{-1}$) a 15-lipoxygenasu z králičích retikulocytů (IC_{50} 2.10^{-5} $mol.l^{-1}$) (lit.[49]). Mechanismus inhibice obou enzymů je podobný, živočišná lipoxygenasa je vůči RK citlivější. Inhibiční koncentrace IC_{50} 3.10^{-5} $mol.l^{-1}$ byla změřena pro 12-lipoxygenasu z krevních destiček potkanů[50]. Antilipoperoxidační účinek RK je obsahem dvou japonských patentů[51,52]. Americký patent z roku 1994 chrání použití RK jako antioxidační složky v kosmetických přípravcích zlepšujících elasticitu kůže[53]; v japonském patentu[54] je navrhována RK jako složka antialergické diety. Autoři si RK cení jako přírodního antioxidantu s velmi nízkou toxicitou (LD_{50} u myší 561 $mg.kg^{-1}$, i. v.). Použití RK v potravinářském průmyslu však zatím není ekonomicky výhodné. Pro potravinářství jsou perspektivní extrakty rostlin s vysokým obsahem RK a dalšími látkami s antioxidačními účinky. Literatura týkající se této problematiky není do článku zahrnuta.

3. 2. Protizánětlivá aktivita

Protizánětlivý účinek RK byl poprvé zmíněn v práci Graczy a spol.[27], kteří zjistili, že RK inhibuje tvorbu malondialdehydu u lidských trombocytů intoxikovaných N-ethylmaleinimidem. RK (1 $mmol.l^{-1}$) je slabým inhibitorem cyklooxygenasy a 12-lipoxygenasy (lit.[2]). Van Kessel a spol.[55] popsali v roce 1985 inhibiční účinek RK na vznik kyslíkových radikálů a chemotaxi u lidských leukocytů. RK inhibuje chemiluminiscenci prasečích a lidských

Tabulka I

Přehled rostlin, ve kterých byla nalezena RK. Tučně jsou vyznačeny rostliny s obsahem RK větší než 2%

Čeleď Rod	Taxon
Lamiaceae syn.Labiatae	
Acinus	*Acinus*[1], *A. alpinus*[40], *A. arvensis*[40]
Agastache	*Agastache*[1], *A. foeniculum*[79], *A. rugosa*[79]
Amaracus	*Amaracus*[1]
Calamintha	*Calamintha*[1], *C. cretica*[79], *C. grandiflora*[40], *C. nepeta*[40], *C. silvatica ascendes*[40], *C. silvatica silvatica*[40,41]
Cedronella	*C. canariensis*[79]
Clinopodium	*Clinopodium*[1], *C. vulgare vulgare*[40]
Conradina	*C. verticillata*[79]
Cunila	*C. origanoides*[79]
Drococephalum	*D. moldavica*[41]
Glechoma	*Glechoma*[1,37], *G. hederacea*[40,41]
Hedeoma	*H. pulegioides*[79]
Hymenocrater	*Hymenocrater*[1]
Hyptis	*H. verticalata*[20,58]
Hyssopus	*Hyssopus1*, *H. officinalis*[5,40,41,79], *H. species*[80]
Lavandula	*Lavandula*[1], *L. angustifoliaangustifolia*[40,41], *L. X burnatie*[41], *L X intermedia*[40], *L. latifolia*[40,41], *L. spicata*[5], *L. stoechas stoechas*[40]
Lophanthus	*Lophanthus*[1]
Lycopus	*Lycopus*[1], ***L. europaeus***[24,37,40,41,75], *L. virginicus*[74,79]
Meehania	*Meehania*[1]
Mellisa	*Mellisa*[1,16,19], ***M. officinalis officinalis***[24,33,40,41,62,63,71,74,79]
Mentha	*Mentha*[1,19,37], ***M. aquatica***[40], ***M. arvense***[6,40,79], *M. citrata*[79], *M. x gentilis*[79], *M. x gracilis*[79], ***M. logifolia***[40,79], ***M. x piperita***[6,9,40,41,79,88], ***M. pulegium***[40,41], *M. requienii*[40], *M. rotundifolia*[79], ***M. spicata***[5,40,41], ***M. suavolens***[40]
Micromeria	*Micromeria*[1]
Monarda	*Monarda*[1], *M. citriodora*[79], *M. didyma*[41,79], *M. fistufolia*[41,79], *M. pectinata*[79], *M. punctata*[79]
Nepeta	*Nepeta*[1], *N. cataria*[40,41], *N. latifolia*[40], *N. mussinnii*[79], *M. nuda*[40], *N. species*[81]
Ocimum	*O. basilicum*[41], *O. sanctum*[82]
Origanum	*Origanum*[1,19], ***O. majorana*** *syn. Majorana*[1,40,41], *O. onites*[79], *O. tytthantum*[79], ***O. vulgare vulgare***[5,17,24,40,41,79]
Orthosiphon	*O. aristatus*[16,22], *O. stamineus*[41]
Perilla	*Perilla*[1], *P. frutescens*[57,79]
Perovskia	*Perovskia*[1], *P. atriplicifolia x abrotanoides*[79]
Poliomintha	*P. loniflora*[79]
Prunella	*Prunella*[1,37], ***P. grandiflora grandiflora***[40,44], *P. grandiflora pyrenaica*[40,44], ***P. hyssopifolia***[40,44], ***P. laciniata***[40,44], *P. spicata*[83], ***P. vulgaris***[24,40,41,44,79]
Pycnanthemum	*P. muticum*[79], *P. pilosum*[79], *P. torrei*[79], *P. virginianum*[79]
Rosmarinus	*Rosmarinus*[1,19], ***R. officinalis***[3,5,23,24,33,40,41,62,79]

Tabulka I (pokračování)
Přehled rostlin, ve kterých byla nalezena RK. Tučně jsou vyznačeny rostliny s obsahem RK větší než 2%

Čeleď Rod	Taxon
Salvia	*Salvia*[1,16,19,21], *S. aethiopsis*[40], *S. cavaleria*[84], *S.c levelendii*[79], ***S. glutinosa***[40], ***S. hormonalis***[5], *S. chinensis*[85], *S. lavandulifolia gallica*[40,41], *S. lyrata*[79], *S. miltiorrhizae3*[1,48,76], *S. nemorosa nemorosa*[40], ***S. officinalis***[24,33,40,41,79], *S. plebria*[83], ***S. pratensis***[40], ***S. sclarea***[40,41], ***S. triloba***[41], ***S. verbenaca***[40], *S. verticillata*[40],
Satureja	*Satureja*[1], *S. hortensis*[5,40,41], *S. montana montana4*[0,41], *S. viminea*[79]
Schizonepeta	*Schizonepeta*[1]
Thymus	***Thymus***[1,89], *T. caespitosus*[40], ***T. froelichianus***[40], *T. herbabarona*[79], *T. nitens*[40], *T. polytrichus britannicus*[40], *T. pulegioideds similialpes*[40], *T. serpyllum*[5,41], ***T. vulgaris***[40,41,79], *T. zheguliensis*[86]
Ziziphora	*Ziziphora*[1]
Boraginaceae	
Anchusa	*Anchusa*[37], *A. officinalis*[41]
Borago	*Borago*[37], *B.officinalis*[41]
Echium	*Echium*[37], *E. vulgare*[41]
Ehretia	*E. philippinensis*[59]
Lycopsis	*Lycopsis*[37]
Lithospermum	*L. officinalis*[41,74]
	L. ruderale[36]
Myosotis	*Myosotis*[37]
Omphalodes	*Omphalodes*[37]
Pulmonaria	*Pulmonariaf*[37]
	P.officinalis[41]
Symphytum	*Symphytum*[37], *S. officinalis*[27,33,41]
Apiaceae	
Sanicula	***S. europaeus***[15,37,41,78]
Asteraceae	
Artemisia	*Artemisia*[46]
Gentianaceae	
Gentiana	*Gentiana lutea*[23]
Daucaceae	
Astrantia	*A. major*[78]
Eryngium	*E. amethystinum*[78], *E. bourgatii*[78], *E. bromeliifolium*[78], *E. campestre*[41,78], *E. dichotomum*[78], *E. giganteum*[78], *E. maritimum*[78], *E. planum*[78]
Rubiaceae	
Hamelia	*H. patens Jacq.*[18]
Plantaginaceae	
Plantago	*Plantago*[87]

polymorfonukleárních leukocytů (PMN-L) indukovanou zymozanem nebo forbolmyristátacetátem[56]. Japonští autoři prokázali, že u lidských PMN-L mají kyseliny rosmarinová, kávová a šest dalších derivátů kyseliny kávové inhibiční účinek na metabolickou přeměnu kyseliny arachidonové katalyzovanou 5-lipoxygenasou[57]. Nejúčinnější z testovaných látek byla RK, která inhibuje tvorbu 5-HETE (kyselina 5-hydroxy-6,8,11,14-eikosate-traenová) IC_{50} $2{,}14.10^{-4}$ $mol.l^{-1}$ a tvorbu leukotrienu LTB_4 IC_{50} $5{,}56.10^{-5}$ $mol.l^{-1}$. Žádná z kyselin nebyla vůči PMN-L toxická. Výsledky jsou zajímavé z hlediska možného použití derivátů kyseliny kávové v terapii alergických zánětů, jako např. astmatických onemocnění. Stabilizující účinek RK na membránu slepičích vajec rovněž potvrzuje protizánětlivý efekt této kyseliny[58]. Kyselina rosmarinová inhibovala tvorbu histaminu u potkaních mastocytů IC_{50} $1{,}8 . 10^{-5}$ $mol.l^{-1}$, vyvolanou sloučeninou P. 48/80 (lit.[59]). U jejího methylesteru dochází k 35% snížení inhibiční aktivity. Protizánětlivý účinek RK byl prokázán také v *in vivo* pokusech na potkanech[60]. V této práci byla rovněž studována biodostupnost RK po intravenosní aplikaci a bylo zjištěno, že po 30 min je RK detegovatelná v mozku, srdci, játrech, slezině a pevných tkáních. Nejvyšší hladina RK byla nalezena v plících (13x vyšší nežli v krvi), pak v slezině, srdci a játrech. Při topické aplikaci na kůži je penetrace RK 8x vyšší u ethanolického roztoku ve srovnání s vodným (3 mg RK/20 cm^2). U pokusných zvířat byla RK nalezena v kůži, krvi, svalech a kostní tkáni. Protizánětlivý účinek RK byl ověřen i u opic[61]. Při lokální aplikaci na gingivu dutiny ústní zde došlo ke statisticky významné redukci zánětu a byl zaznamenán rovněž antiplakový účinek. Značná pozornost byla věnována vlivu RK na komplementový systém (obranný systém tvořený souborem plazmatických proteinů doplňující protilátky pro odstraňování nežádoucích antigenů) v krvi u různých obratlovců. Inhibiční účinek na aktivitu enzymů komplementu je zpravidla spojován s *in vivo* protizánětlivým účinkem studovaných látek[2]. RK je inhibitorem vepřové C3-konvertasy (IC_{50} $1{,}4.10^{-3}$ $mol.l^{-1}$) a snižuje aktivitu serinové proteasy a elastasy[62]. Signifikantní inhibice lýzy erytrocytů ve zředěných lidských a králičích sérech je dosaženo při koncentraci RK 1.10^{-6} $mol.l^{-1}$ (lit.[63]). Autoři předpokládají, že je inhibována i tvorba C5-konvertasy. Výsledky publikované v pracích[62, 63] potvrdili Lasure a spol.[64]. RK je používána jako standard při testování antikomplementové aktivity fenolických látek jak klasickou tak alternativní cestou[65]. RK snižuje v koncentračním rozmezí 0,316 - 3,16 $mg.kg^{-1}$, i. m., otok tlapky potkana indukovaný faktorem kobřího jedu[62]. Naproti tomu kyselina nemá při aplikaci 0,1 - 10 $mg.kg^{-1}$, i. m., žádný inhibiční účinek na otok vyvolaný terc.butylhydroperoxidem. Výsledky tohoto pokusu potvrzují selektivní působení RK na komplementový systém. RK výrazně inhibovala v dávce 1 $mg.kg^{-1}$, i. v., a 10 $mg.kg^{-1}$, i. m., kožní anafylaktickou reakci u potkanů a v dávce 20 $mg.kg^{-1}$, i. v., akutní aktivaci komplementu indukovanou endotoxinem u králíků[66]. RK snižuje syntézu prostacyklinu a thromboxanu A_2 a ovlivňuje endotoxinem vyvolanou arteriální hypotenzi a trombocytopenii. Přípravek s protizánětlivým účinkem, který obsahuje jako aktivní složku RK, je předmětem německého patentu[67]. Pro RK je udávána akutní toxicita 316 $mg.kg^{-1}$, p. o., u myši. V koncentraci 0,1 $mg.kg^{-1}$, p.o., snižuje RK otok tlapky potkana vyvolaný karageninem o 22%. Stejný efekt má indometacin aplikovaný v dávce 3,2 $mg.kg^{-1}$, p. o. Patentově chráněna je galenická forma komplexu RK s fosfatidylcholinem nebo jeho hydrogenovanou formou, nebo jeho vápenatou solí v poměru 1 : 2. Tato forma nevyvolávala u potkanů acidózu žaludečních štáv a LD_{50} pro myši je 1000 $mg.kg^{-1}$, p. o. (lit.[68]).

3. 3. Antimikrobiální aktivita

V lidovém léčitelství je řada rostlin, které obsahují větší množství RK, používána při mikrobiálních onemocněních[69]. Vůči nepatogenním bakteriím, *Bacillus subtilitis*, *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus,* je minimální inhibiční koncentrace (MIC) RK tisíckrát vyšší než-li např. MIC ampicilinu[58]. Na možnou funkci RK jako fytoalexinu upozorňuje rozsáhlá studie o inhibičních účincích kyseliny kávové a jejich derivátů na 9 rostlinných patogeních bakterií a plísní[70]. Stanovení MIC bylo provedeno v pevném médiu pro houby, v kapalném médiu a agarovou difuzní metodou pro bakterie. Inhibiční aktivita RK proti houbám (*Sclerotinea sclerotiorum a Botrytis cinerea*) byla sledována při dvou hodnotách pH 5 a 7. Gram-pozitivní bakterie byly citlivější než Gram-negativní. RK neměla žádný účinek na *Staphylococcus aureus*[56]. Problematická je v literatuře udávaná antivirová aktivita kyseliny rosmarinové[71]. Fytofarmaka, která obsahují extrakt z *Mellissa officinalis* (meduňky lékařské) standardizovaný na RK, jsou doporučována k léčbě oparů způsobených virem Herpes simplex. Údaje prokazující antivirovou aktivitu RK lze získat pouze z patentové literatury[72,73]. Německý patent[72], který chrání přípravek s aktivitou vůči Herpes simplex, obsahuje kyselinu v komplexu s liposomy. Patent maďarských autorů[73], komplexní dermatologický přípravek k použití proti

kožním zánětům, indukovaným viry, obsahuje vedle jiných přírodních látek i RK.

3. 4. Ostatní

Některé rostliny z čeledi Lamiaceae (rod *Lycopus, Mellissa a Lithospermum*) jsou používány v lidovém léčitelství proti lehčím až středně těžkým formám hyperthyreosy[74]. Pro tyto rostliny je charakteristický vysoký obsah RK (tab. I). Ze sekundárních metabolitů těchto rostlin působily kyseliny rosmarinová a egalová a luteolin-7β-glukosid jako inhibitory jodthyronin-5' a jodthyronin-5-dejodasy, zatím co kyselina skořicová a její deriváty byly neaktivní. Stejné výsledky byly získány s celkovým extraktem *Lycopus europaeus* (karbinec evropský). U potkanů po aplikaci extraktu p.o. se statisticky významně snížila hladina thyroxinu a trijodthyroninu[75]. Podle autorů je biologický účinek vázán na RK.

Kyselina rosmarinová má mírné antikoagulační účinky[76]. U potkanů po aplikaci p.o. byla prokázána statisticky významná inhibice agregace krevních destiček a došlo ke zvýšení fibrinolytické aktivity.

Kyselina rosmarinová má mírný imunostimulační účinek na T-lymfocyty a chrání tyto buňky v přítomnosti komplementu proti toxickému účinku hydrokortisonu[77].

4. Závěr

Z ekonomického hlediska jsou pro izolaci kyseliny rosmarinové výhodné především rostliny čeledí Lamiaceae a Boraginaceae. RK je biologicky aktivní netoxická látka vykazující antioxidační účinky, v pokusech *in vitro* větší než α-tokoferol, spojené s mírným protizánětlivým účinkem a dále má účinky mírně antimikrobiální. Pro farmaceutický průmysl je tato látka perspektivní jako antioxidans u léčebných kosmetických přípravků, či protizánětlivá a antimikrobiální složka v přípravcích ústní hygieny. Pro potravinářský průmysl je kyselina rosmarinová jako antioxidant z cenového hlediska nezajímavá. V tomto odvětví, ale i ve farmaceutickém průmyslu jsou však používány extrakty rostlin s vysokým obsahem této kyseliny.

Autorka si dovoluje vyslovit poděkování prof. V. Šimánkovi a dr. J. Vičarovi (oba Ústav lékařské chemie LFUP Olomouc) za cenné poznámky a diskusi, dr. P. Baričičovi a dr. M. Mackovi (oba Komenského 15, Modra 900 01) za výpočet prostorových modelů cis- a trans-izomerů kyseliny rosmarinové.

LITERATURA

1. Litvinenko V. I., Popova T. P., Simonjan A. V., Zoz I. G., Sokolov V. S.: Planta Med. *27*, 372 (1975).
2. Parnham M. J., Kesselring K.: Drugs of the Future *10*, 756 (1985).
3. Scarpati M. L., Oriente G.: Ricerca sci. *28*, 2329 (1958).
4. Scarpati M. L., Oriente G.: Ricerca sci. *30*, 255 (1960).
5. Herrmann K.: Arch. Pharm. *293*, 1043 (1960).
6. Ellis B. E., Towers G. H. N.: Biochem. J. *118*, 291 (1970).
7. Petersen M., Hausler E., Karwatzki B., Meinhard J.: Planta *189*, 10 (1993).
8. De-Eknamkul W., Ellis B. E.: Microb. Util. Renewable Resour. *6*, 64 (1989).
9. Harborne J. B. : Z. Naturforschg. *21b*, 604 (1966).
10. Takeda R., Hasegawa J., Shinozaki M.: Tetrahedron Lett. *31*, 4159 (1990).
11. Banthorpe D. V., Bilyard H. J., Brown G. D.: Phytochemistry *28*, 2109 (1989).
12. Fukui H., Yazaki K., Tabata M.: Phytochemistry *23*, 2398 (1984).
13. Petersen M.: Biotechnology in Agriculture and Forestry *26*, 69 (1994).
14. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H. (Nattermann) DE 3 247 610 (1984).
15. Hiller K.: Pharmazie *20*, 574 (1965).
16. Gracza L., Ruff P.: Arch. Pharm. *317*, 339 (1984).
17. Kikuzaki H., Nakatani N.: Agric. Biol. Chem. *53*, 519 (1989).
18. Aquino R., Ciavatta M. L., De Simone F., Pizza C.: Phytochemistry *29*, 2358 (1990).
19. Reschke A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. *176*, 116 (1983).
20. Kuhnt M., Rimpler H., Heinrich M.: Phytochemistry *36*, 485 (1994).
21. Adzet T., Canigueral S., Iglesias J.: Biochem. Syst. Ecol. *16*, 29 (1988).
22. Sumaryono W., Proksch P., Wray V., Witte L., Hartmann T.: Planta Med. *57*, 176 (1991).
23. Verotta L.: Fitoterapia *56*, 25 (1985).
24. Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Carnat A.: Pharm. Acta Helv. *66*, 185 (1991).

25. Hans A., Jantzen T.: DE 34 30 251 (1984).
26. Napp W., Günther B. R., Losch R., Christ B.: DE 32 34 312 (1982).
27. Gracza L., Koch H., Löffler E.: Arch. Pharm. *318*, 1090 (1985).
28. Pabsch K., Petersen M., Rao N. N., Alfermann A. W., Wandrey C.: Recl. Trav. Chim. Pays-Bas *110*, 199 (1991).
29. Albert B. M.: Dissertation, Universität des Saarlandes 1989, citováno podle Zinsmeister H. D., Becker H., Eicher T.: Angew. Chem. *30*, 134 (1991).
30. Ott M.: Diplomarbeit, Universität des Saarlandes citováno podle Zinsmeister H. D., Becker H., Eicher T.: Angew. Chem. *30*, 130 (1991).
31. Li J., He L. Y., Song W. Z.: Yao Hsueh Hsueh Pao *28*, 543 (1993).
32. Bassane V., Casadebaig J., Jacob M.: Int. J. Pharm. *63*, 57 (1990).
33. Gracza L., Ruff P.: Arch. Pharm. *320*, 1249 (1987).
34. De Tommasi N., De Simone F., De Feo V., Pizza C.: Planta Med. 57, 201 (1991).
35. Kelley Ch. J., Mahajan J. R., Brooks L. C., Neubert L. A., Breneman W. R., Carmack M.: J. Org. Chem. *40*, 1804 (1975).
36. Kelley Ch. J., Harruff R. C., Carmack M.: J. Org. Chem. *41*, 449 (1976).
37. Pedersen J. A.: Phytochemistry *17*, 775 (1978).
38. Lopez-Arnaldos T., Lopez-Serrano M., Ros Barcelo A., Calderon A. A., Zapata J. M.: Fresenius J. Anal. Chem. *351*, 311 (1995).
39. Martindalle. The Extra Pharmacopeia, 30. vydání, London (1993).
40. Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Duband F., Carnat A.: Fitoterapia *62*, 166 (1991).
41. Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Carnat A. P.: Ann. pharmaceutiques francaises *48*, 103 (1990).
42. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Food Sci. Technol. *28*, 25 (1995).
43. Lamaison J. L., Petitjean -Freytet C., Carnat A. P., Carnat A.: Plant. Méd. Phytothér. *22*, 231 (1988).
44. Lamaison J. L., Petitjean -Freytet C.: Plant. Méd. Phytothér. *24*, 152 (1990).
45. Chipault J. R., Mizuno G. R., Hawkins J. M., Lundberg W. O.: Food Res. *17*, 46 (1952).
46. Fujita Y., Uehara I., Morimoto Y., Nakashima M., Hatano T., Okuda T.: Yakugaku Zasshi *108*, 129 (1988).
47. Huang Y. S., Zhang J. T.: Yaoxue Xenbao *27*, 96 (1992).
48. Liu G. T., Zhang T. M., Wang B. E., Wang Y. W.: Biochem. Pharm. *43*, 147 (1992).
49. Langner A., Bekemeier H.: Pharmazie *42*, 351 (1987).
50. Langner A., Giessler A. J., Bekemeier H.: Pharmazie *42*, 352 (1987).
51. Masayoshi K, Toshihiko Y., Hiroshi S., Ryoko K: Jpn. 04 208 221 (1990).
52. Masayoshi K., Toshihiko Y.: Jpn. 04 187 631 (1990).
53. Castro J. R.: US 00 5 393 526 (1994).
54. Jiro A., Junichiro A., Kazuhiro I.: Jpn. 01 121 217 (1987).
55. Van Kessel K. M. P., Kalter E. S., Verhoef J.: Agents Actions *17*, 375 (1985).
56. Verweij-Van Vught A. M. J. J., Appelmelk B. J., Groeneveld A. B. J., Sparrius M., Thip L. G., Mac Laren D. M.: Agents Actions *22*, 288 (1987).
57. Kimura Y., Okuda H., Okuda T., Hatano T., Arichi S.: J. Nat. Prod. *50*, 392 (1982).
58. Kuhnt M., Pröbstle A., Rimpler H., Bauer R., Heinrich M.: Planta Med. *61*, 227, (1995).
59. Simpol R. L., Otsuka H., Ohtani K., Kassai R., Yamasaki K.: Phytochemistry *36,* 91 (1994).
60. Ritschel W. A., Starzacher A., Sabouni A., Hussain A. S., Koch H. P.: Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. *11*, 345 (1989).
61. Van Dyke T. E., Braswell L., Offenbacher S.: Agents Action *19*, 376 (1986).
62. Englberger W., Hadding U., Etschenberg E., Graf E., Leyck S., Winkelmann J., Parnham M. J.: Int. J. Immunopharmacol. *10*, 729 (1988).
63. Peake P. W., Pussell B. A., Martyn P., Timmermans V., Charlesworth J. A.: Int. J. Immunopharmacol. *13*, 853 (1991).
64. Lasure A., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. J.: Planta Med. *59*, A668 (1993).
65. Cimanga K., De Bruyne T., Lasure A., Van Poel B., Pieters L., Berghe D. V., Vlietinck A.: J. Nat. Prod. *58*, 372 (1995).
66. Bult H., Herman A. G., Rampart M.: Brit. J. Pharmacol. *84*, 317 (1985).
67. Zenk M., Etschenberg E., Graf E.: DE 29 52 114 (1979).
68. Wirty-Peitz F., Prohst M., Winkelmann J.: DE 29 52 115 (1979)
69. Madaus G.: *Lehrbuch der biologischen Heilmittel Band I-III*. Georg Olms Verlag, Hildesheim-New York 1979.

70. Ravn H., Andary C., Kovacs G., Molgaard P.: Biochem. Syst. Ecol. *17*, 175 (1989).
71. Koch-Heitzmann I., SchultzeW.: Dtsch. Apoth. Ztg. *124*, 2137 (1984).
72. Röding J., Meusel U.: DE 41 21 388 (1991).
73. Meszaros J. D., Hangay G., Kelen A., Keserü P., Demeter V. J., Friedman E., Alberti E., Kovacs G., Kardics I.: WO 9325 209 (1992).
74. Aufmkolk M., Koehrle J., Gumbinger H., Winterhoff H., Hesch R. D.: Horm. Metab. Res. *16*, 188 (1984).
75. Winterhoff H., Gumbinger H. G., Vahlensieck U., Kemper F. H., Schmitz H., Behnke B.: Arzneim.-Forsch. *44*, 41 (1994).
76. Zou Z. W., Xu L. N., Tian J. Y.: Yao Hsuech Hsuech Pao *28*, 241 (1993).
77. Sawicka T., Drozd J., Prosinska J., Borkowski B.: Herba Pol. *40*, 31 (1994).
78. Hiller K., Kothe N.: Pharmazie *22*, 220 (1967).
79. Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Duke J. A., Walker J.: Plant. Méd. Phytothér. *26*, 143 (1993).
80. Zotov E. P., Dranik L. I. , Khazanovich R. L.: Deposited Doc.1976, VINITI 251, C. A. *88*: 71448e (1978).
81. Saez E., Rodriguez M. J., Barmejo P., An. R. Acad. Farm. *51*, 597 (1985).
82. Noerr H., Wagner H.: Planta Med. *58*, 574 (1992).
83. Chang Ch. H., Ming Ch. Ch., Chih Ch. Ch., Pan Ch. Y., Yen H. H.: Chung-hua Yao Hsuch Tsa Chih *41*, 49 (1989).
84. Zhang H. J., Li L. N.: Planta Med. *60*, 70 (1994).
85. Quian T., Li L.: Phytochemistry *31*, 1068 (1992).
86. Andrzejewska-Golec E., Swiatek L.: Herba Pol. *32*, 19 (1986).
87. Kurkin V. A., Zapesochnaya G. G., Krivenchuk P. E., Plaksina I. T.: Khim. Prir. Soedin. *1988*, 594.
88. Duband F., Carnat A. P., Carnat A., Petitjean-Freytet C., Clair G., Lamaison J. L: Ann. Pharm. Fr. *50*, 146 (1992).
89. Adzet T., Vila R., Canigueral S.: J. Ethnopharmacol. *24*, 147 (1988).
90. Guédon D. J., Pasquier B. P.: Agric. Food Chem. *42*, 679 (1994).

V. Holzmannová *(Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc):*
Rosmarinic Acid and its Biological Activity

The review concerns occurrence, isolation, properties, methods of determination, and biological activities of rosmarinic acid. Rosmarinic acid is a phenolic acid found mostly in plants of the families *Lamiaceae*, *Boraginaceae* and *Apiaceae* which exhibits significant antioxidant, antiinflammatory and antimicrobial activities. The antioxidant activity is higher than that of vitamin E making rosmarinic acid attractive for pharmaceutical and cosmetic industries. The antiinflammatory activity has been proved both *in vitro* and *in vivo* and may be used in the therapy of allergic inflammations.

Chem. Listy 90, 859 – 862 (1996)

FLA V ANOLIGNANY – NOVOVĚKÁ CHEMIE LÉČIVÉ ROSTLINY ZNÁMÉ JIŽ PŘED KRISTEM

ALEXANDR JEGOROV

Galena a.s., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Došlo dne 18.VI.1996

Obsah

1. Úvod
2. Struktura flavanolignanů
3. Farmakologické účinky
4. Závěr

1. Úvod

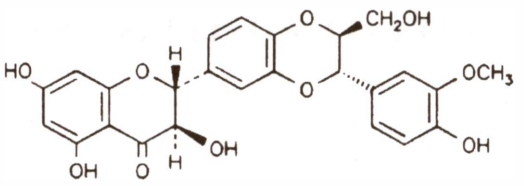
Ostropestřec mariánský – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L., Asteraceae) patří mezi nejdéle známé lečivé rostliny. Pravděpodobně poprvé je popisován ve spisech Theophrasta (4. st. p.n.l.) pod názvem "Pternix" a poté např. v Dioskuridově "Materia medica" (1. st. n.l.) a ve spiscích Pliniových (1. st. n.l.). Zatímco mnohé medicinské poznatky byly zapomenuty v temnotách středověku a poté byly znovu objevovány, ostropestřec mariánský je popisován ve všech významných herbářích léčivých rostlin, např. abatyše Hildegardy z Bingenu (1098–1179), Hieronyma Bocka (1593), Jacobuse Theodoruse (1664), Mattioliho (1626), Valentiniho (1719), Von Hallera (1755) a dalších až do současnosti. Již od této doby jsou také známy podpůrné účinky semen ostropestřece při různých chorobách jater. Bez nadsázky tedy můžeme říci, že od doby, kdy byly léčivé účinky této rostliny poprvé nalezeny až do současnosti, kdy se podařilo izolovat aktivní komponenty a objasnit alespoň částečně jejich mechanismus účinku, uplynulo již více než dva tisíce let.

2. Struktura flavanolignanů

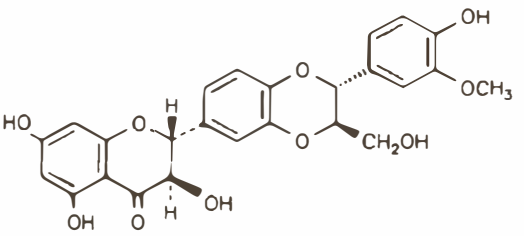
V roce 1952 se Herzogovi a Hagedornovi podařilo zjistit, že aktivní složkou semen ostropestřece jsou látky flavonoidní povahy[1]. Struktura dvou flavanonů – silybinu (původně označeného jako substance E_6, obr. 1) a silydianinu (E_5) pak byla objasněna o 8 let později Janiakem a Hänselem[2]. Dalšími komponentami směsi flavonoidů, souhrně označované jako silymarin[3], jsou silychristin[4] a iso-silybin[5,6]. Všechny tyto látky jsou tvořeny flavanonem taxifolinem (dihydrokvercetin) k němuž je oxidativní adicí připojena molekula koniferylalkoholu. Vzhledem k tomu, že koniferylalkohol je rovněž obvyklou složkou ligninu, dostal tento nový typ flavonoidů souhrnné označení flavanolignany[2].

Silybin, silydianin, silychristin a iso-silybin tvoří spolu s taxifolinem a kvercetinem podstatnou část flavonoidů extrahovaných ze semen fialově kvetoucího ostropestřece. Jako minoritní složky byly izolovány analogické flavony odvozené od kvercetinu, např. dehydrosilybin[4,7], které pravděpodobně vznikají v důsledku snadné oxidace flavanonů na flavony. Z bíle kvetoucí variety *Silybum marianum* byly izolovány 3-deoxy-flavanolignany silandrin, silymonin, silyhermin a neosilyherminy A a B[8-10], které se v semenech fialově kvetoucího ostropestřece nevyskytují. Ostropestřec mariánský není jedinou rostlinou, v níž byly flavanolignany nalezeny. Např. hydnocarpin (3-deoxy-dehydroisosilybin, revise[10] původní struktury[11,12]) a methoxyhydnocarpin byly izolovány ze semen *Hydnocarpus wightiana* (Flacourtiaceae), americanin z *Phytolacca americana* (Phytolaccaceae)[13] a xanthonolignoid kielcorin byl izolován z kořenů rostlin rodu *Hypericum* (Guttiferae)[14].

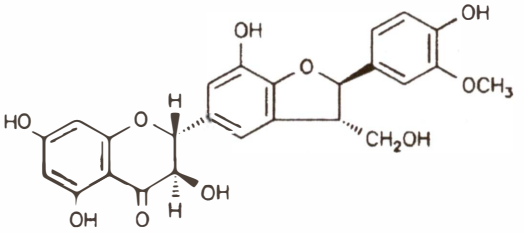
Zatímco biosyntéza flavonoidů z fenylalaninu představuje řadu velmi specifických enzymatických reakcí[15], nízká stereospecifita následné oxidativní adice koniferylalkoholu je v souladu s předpokládaným radikálovým mechanismem této reakce probíhající jak *in vitro*, tak *in vivo*[5,6,16]. Struktura flavanolignanů je pak neobyčejnou ukázkou stereochemických možností oxidativní adice olefinu (koniferylalkoholu) na fenol (taxifolin). Tvorba 1,4-benzodioxanů, při níž reagují obě sousední fenolické skupiny (3', 4'), poskytuje čtyři stereomery nalezené v přírodní směsi: dva silybiny, kde je α-uhlík koniferylakoholu vázán na 3'-O a dva iso-silybiny u nichž je α-uhlík koniferylakoholu vázán na 4'-O náležející C-kruhu taxifolinu. Vzhledem k přítomnosti dalších chirálních center v molekule mají



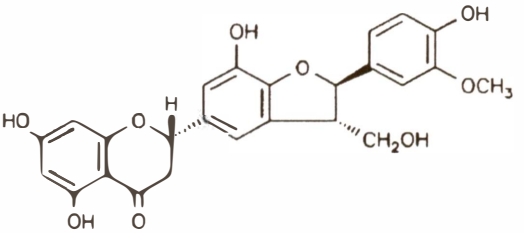
(+)–Silybin



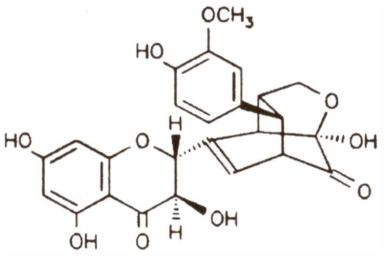
(+)–Iso–silybin



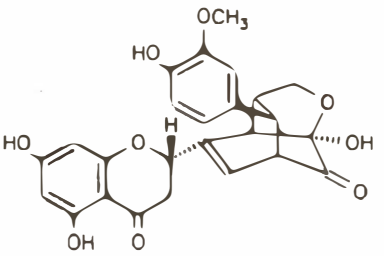
(+)–Silychristin



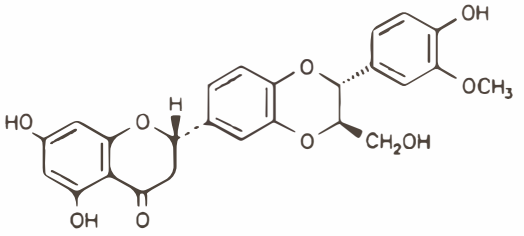
(+)–Silyhermin



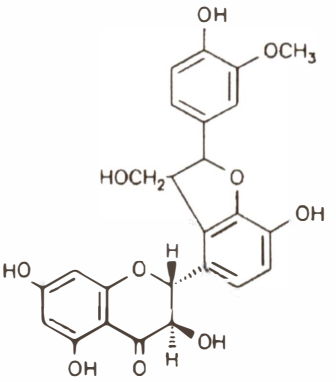
(+)–Silydianin



(+)–Silymonin



(–)–Silandrin



(+)–Iso–silychristin

Obr. 1. **Struktury vybraných flavanolignanů**
(v případě existence dvou stereomerů, např. u silybinu, je zobrazen pouze jeden)

jednotlivé stereomery odlišné vlastnosti a lze je tudíž rozlišit kapalinovou chromatografií v achirálním systému. Podle pořadí eluce byly jednotlivé silybiny a iso-silibiny označeny A a B. I když byly jednotlivé komponenty A a B úspěšně rozděleny preparativní chromatografií ve formě glykosidů, jejich absolutní chiralitu se nepodařilo dosud vyřešit vzhledem k tomu, že se ani u rozličných derivátů silybinů A nebo B (acetyl, benzoyl, bromobenzoyl, glykosyl) nepodařilo připravit monokrystaly vhodné pro RTG-difrakci[17]. Absolutní konfiguraci se však podařilo vyřešit u přírodního (-)-silandrinu, u něhož bylo prokázáno, že se nejedná o směs stereomerních 3-deoxy-iso-silybinů, ale pouze jeden z nich (2*S*,2'*R*,3'*R*)[18].

Koniferylalkohol se může adovat rovněž na pozici jedné ze dvou OH skupin C-kruhu taxifolinu (3' nebo 4') a současně na jeden ze sousedících uhlíků (2' nebo 5') jako je tomu v případě silychristinu (4'-O-α, 5'-C-β), iso-silychristinu (3'-O-α, 2'-C-β), silyherminu (4'-O-α, 5'-C-β = 3-deoxy-silychristin) nebo neo-silyherminu A (3'-O-α, 2'-C-β = 3-deoxy-iso-silychristin), viz obr. 1. Ještě lepší trojrozměrnou představivost vyžadují struktury silydianinu a silymoninu (3-deoxy-silydianin), kde je koniferylalkohol navázán na třech místech C-kruhu taxifolinu (5'-C-α, 2'-C-β, 3'-O-γ-O). Tento typ adice vede k jedinému stereomeru, jehož absolutní konfigurace byla prokázána RTG-difrakcí[19,20].

3. Farmakologické účinky

Ostropestřec marianský, jeho semena, listy plody i kořeny jsou po staletí užívány v tradiční evropské medicíně na léčení různých chorob jater. Systematické studie aktivních komponent se datují zhruba od 60. let a pokračují dodnes. Z hlediska hepatoprotektivního účinku při akutních otravách lze rozlišit dva hlavní účinky flavanolignanů a sice ochranný efekt na jaterní buněčné membrány a antioxidační efekt[21]. Při akutní otravě např. toxiny muchomůrky zelené brání přítomnost silymarinu navázání toxinů na buněčný povrch a aktivnímu transportu dovnitř buňky. Vliv silymarinu na propustnost membrán se zde jeví jako primární ochranný efekt a jeho včasné podání podstatně zvyšuje naději na přežití[22,23]. Účinnek dalších jaterních jedů, např. CCl_4, thalných solí, ethanolu, paracetamolu a dalších spočívá v tvorbě volných radikálů. Při tomto typu otrav převažuje účinek silymarinu jako lapače volných radikálů, jeho inhibiční účinek na různé oxygenasy a peroxidasy a naopak pozitivní efekt na stabilizaci koncentrace neredukovaného glutathionu[21]. V souladu s tím jsou silymarin, jeho jednotlivé konstituenty nebo deriváty zahrnuty do standardních medicinských postupů při akutních otravách.

Silymarin se neváže pouze na buněčné membrány, ale proniká rovněž do buněčných jader, kde působí jako stimulátor syntézy bílkovin a stimulátor syntézy DNA. Stimulace proteosyntézy je významným krokem umožňujícím opravu poškozených buněčných struktur a náhradu enzymů poškozených jaterními toxiny. Stimulace syntézy DNA vede k aktivaci buněčného dělení a regeneraci jaterních buněk[21]. Zdá se, že právě tento efekt činí flavanolignany výjimečnými léky se specifickým účinkem na obnovu jaterního parenchymu i u chronických poškození jater.

Vzhledem k tomu, že řada farmakologických studií byla provedena se souhrnem flavanolignanů označovaném jako silymarin, naskýtá se logicky otázka, který z nich je nejaktivnější. Odpověď není zcela jednoduchá a závisí jednak na použitém modelu, jednak na biologické dostupnosti jednotlivých flavanolignanů. Například v *in vitro* testu na ochraný účinek proti poškození CCl_4 vykázaly pozitivní účinek silybin, silandrin, silymonin a silyhermin, v menší míře silydianin a silymonin. Při hodnocení týchž flavonoidů na ochraný účinek proti poškození galaktosaminem byl účinek silydianinu a silymoninu významně vyšší[24]. V souhrnu lze říci, že jednotlivé flavanolignany vykazují podobný účinek, jak je rovněž patrné z řady studií, kde je srovnáván účinek surového souhrnu – silymarinu a čistého silybinu[21]. Iso-silybin je však pravděpodobně nejméně aktivní[25].

Použití silybinu, který lze nejsnáze získat v čistém stavu, omezuje především jeho velmi nízká rozpustnost. V současnosti je proto studována celá řada derivátů s vyšší rozpustností, např. silybin-fosfatidylcholinový komplex[25], silybin-β-cyklodextrinový komplex[26], silybin dihemisukcinát[27] nebo silybin 11-O-fosfát[28]. Není bez zajímavosti zmínit, že rovněž například syntheticky získaný dimer silybinu vykazuje přibližně desetinásobný ochranný účinek proti poškození jaterních buněk jedním z toxinů muchomůrek – falloidinem[29,30].

4. Závěr

Ohlédneme-li se za rostlinou známou tisíce let, nemůže nás nepotěšit výjimečná stereochemie oxidativní adice koniferylalkoholu na taxifolin, která dala vzniknout celé skupině nových látek – flavanolignanů. S ohledem na to, že jednotlivé kultivary *Silybum marianum* produkující i ne-

produkující flavanolignany vykazují stejnou vitalitu, vzrůst i napadení škudci, zdá se, že tyto látky nemají pro rostlinu žádný význam. Snad o to více bychom si měli tohoto bodláku vážit my neboť jsme to my chemici, kteří mají statisticky významněji poškozená játra.

Tato práce byla napsána za podpory grantu MŠ VF 96085.

LITERATURA

1. Herzog M., Hagedorn P.: Dtsch. Apoth. Ztg. *92*, 985 (1952).
2. Janiak B., Hänsel R.: Planta Med. *8*, 71 (1960).
3. Wagner H., Diesel P., Seitz M., Riess-Maurer I., Arzneim. Forsch. *24*, 466 (1974).
4. Wagner H., Seligmann O., Hrhammer L., Seitz M., Sonnenbichler J.: Tetrahedron Lett. *22*, 1895 (1971).
5. Merlini L., Zanarotti A., Pelter A., Rochefort M. P.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. *1979*, 695.
6. Arnone A., Merlini L., Zanarotti A.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. *1979*, 696.
7. Bandopadhyay M., Pardeshi N. P., Seshadri T. R.: Indian J. Chem. *10*, 808 (1972).
8. Szilági I., Tétényzi P., Antus S., Seligmann O., Chari V. M., Seitz M., Wagner H.: Planta Med. *43*, 121 (1981).
9. Fiebig M., Wagner H.: Planta Med. *51*, 310 (1984).
10. Wagner H., Seligmann O., Lotter H.: *Flavonoids and Bioflavonoids*, str. 139. Elsevier, Amsterdam 1986.
11. Ranganathan K. R., Sesdari T. R.: Tetrahedron Lett. *36*, 3481 (1973).
12. Ranganathan K. R., Sesdari T. R.: Indian J. Chem. *12*, 993 (1974).
13. Woo W. S., Kang S. S., Wagner H., Chari V. M.: Tetrahedron Lett. *35*, 3239 (1978).
14. Nielsen H., Arends P.: Phytochemistry *17*, 2040 (1978).
15. Heller W.: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structure-Activity Relationship*, str. 25. Alan R. Liss, Inc. 1986.
16. Merlini L., Zanarotti A., Pelter A., Rochefort M. P., Hnsel R.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. *1980*, 775.
17. Křen V., Kubisch J., Jegorov A., soukromé sdělení.
18. Antus S., Baitz-Gács E., Snatzke G., Tóth T. S.: Liebigs Ann. Chem. *1991*, 633.
19. Abraham D. J., Takagi S., Rosenstein R. D., Shiono R., Wagner H., Hrhammer L., Seligmann O., Farnsworth, Tetrahedron Lett. *31*, 2675 (1970).
20. Wagner H., Seligmann O., Seitz M., Abraham D., Sonnenbichler J.: Z. Naturforsch. *31b*, 876 (1976).
21. Morazzoni P., Bombardelli E.: Fitoterapia *66*, 3 (1995).
22. Koppel C.: Toxicon *31*, 1513 (1993).
23. Beer J. H.: Schweiz. Med. Wochenschrift *123*, 892 (1993).
24. Wagner H.: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structure-Activity Relationship*, str. 545. Alan R. Liss, Inc. 1986.
25. Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G.: Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics *18*, 289 (1993).
26. Koch H. P., Wenkoff N.: Arch. Pharm. *325*, 311 (1992).
27. Mira L., Silva M., Manso C. F.: Biochem. Pharmacol. *48*, 753 (1994).
28. Pifferi G., Pace R., Conti M.: Farmaco *49*, 75 (1994).
29. Vogel G., Trost W.: Arzneim. Forsch. *25*, 392 (1975).
30. Frimmer M., Kroker R.: Arzneim. Forsch. *25*, 394 (1975).

A. Jegorov *(Galena a.s., Research Unit, České Budějovice):* **Flavanolignans – Modern Chemistry of Medicinal Plant Which Was Known Already before Christ**

Flavanolignans, a new group of flavonoids isolated from the medicinal plant *Silybum marianum*, is surveyed. Attention is paid to the unusual stereochemistry of oxidative coupling of taxifolin and coniferyl alcohol giving rise to a number of different structures of isobaric flavanolignans. Pharmacology of flavanolignans, their importance in the treatment of acute and chronic hepatic disorders, and their mechanism of action are briefly discussed.

Chem. Listy 91, 160 - 168 (1997)

LIGNIT - STRUKTURA, VLASTNOSTI A POUŽITÍ

BARBORA MIKULÁŠKOVÁ[a], LUBOMÍR LAPČÍK, JR.[a,b], a IVAN MAŠEK[a]

[a]Ústav spotřební chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Veslařská 230, 637 00 Brno, Katedra Životního prostředí a chemie, Fakulta technologická, Vysoké učení technické v Brně, nám. T. G. Masaryka, 762 72 Zlín

Došlo dne 6. VI. 1996

Obsah

1. Úvod
2. Definice lignitu jako materiálového systému
   2.1. Struktura, vlastnosti a obsah huminových kyselin v lignitech
   2.2. Složení jihomoravského lignitu
3. Lignit jako disperzní systém pro sorpci
   3.1. Adsorpce radioaktivních prvků a jejich nuklidů
   3.2. Adsorpce kationtů těžkých kovů
   3.3. Adsorpce pesticidů
4. Závěr

1. Uvod

Současným trendem rozvoje moderních vyspělých společností je snaha o maximální ekonomizaci všech procesů za současného snižování negativních zásahů do přírodního prostředí. Vývoj nových technologií se plánuje takovým způsobem, aby se většina všech vstupujících komponent průmyslově co nejvíc zhodnotila a všechny přípravné a obslužné operace a jejich materiálové vstupy se zároveň regenerovaly. Jedním z nejvážnějších problémů současnosti je odstraňování chlorovaných bifenylů (PCB), které se, jak je známo z literatury, inkorporovaly již do našeho cyklu v různých formách potravinového řetězce[1]. Proto je současnou snahou vyloučit tyto látky ze životního prostředí a následně je likvidovat. Závažnost tohoto problému je zejména v tom, že tyto látky pozměňují terciární a kvartérní strukturu komplexů nukleových kyselin, které jsou nositelkami základních výstavbových informačních jednotek živé tkáně, čímž může docházet ke snižování genetické kvality biologického materiálu. Dalšími nebezpečnými látkami, které ohrožují naše životní prostředí jsou těžké kovy (např. kadmium, olovo a pod.) a široká škála iontových sloučenin (obsahujících skupiny SO_3H, NR_3^+), které se v obrovských množstvích produkují v odpadních vodách. Jedná se zejména o rezidua různých tenzidů, používaných jak v průmyslu, tak i v domácnostech.

Vhodným potenciálním sorpčním materiálem z praktického hlediska průmyslového využití se zdají být různé formy uhlíkatých soustav. Jedním ze zdrojů těchto materiálů mohou být lignity a hnědá uhlí.

Lignit jako složitý makromolekulární systém získal v procesu transformace původní rostlinné hmoty specifické chemické složení, které determinuje dané povrchové vlastnosti, charakteristický volný objem mezi orientovanými složkami materiálu (kapiláry, mikrotrhliny), členitý povrch, na kterém jsou situovány defekty (paramagnetické radikály, volné valence, ionizovatelné skupiny). Nerovnoměrná disipace napětí v strukturálně rozmanitém povrchu související s přítomností nízkomolekulárních látek, a různě orientovaných molekul vody (jako základního „peptizačního činidla"), vyvolává časovou nestabilitu a je stálým zdrojem proměn[3-4].

Povrchové struktury předurčují samotný lignit jako sorbent, jehož vlastnosti se mohou pro tu kterou konkrétní aplikaci patřičně upravit následující chemickou, případně fyzikální transformací. Cílem této přehledné práce je shrnutí informací o fyzikálně-chemických vlastnostech původního lignitu jihomoravské provenience jakož i jeho významných součástí, mezi kterými dominantní postavení mají kyseliny huminové (dále jen HA) a fulvokyseliny (dále jen FA).

2. Definice lignitu jako materiálového systému

Lignit můžeme definovat jako přechodný organicko-minerální substrát na cestě přeměny od rostlinné fytomasy do vysokého stupně dehydrogenovaného/dehydratovaného

a současně deoxidovaného uhlí. Jedná se o morfologicky a molekulárně polydisperzní systém obsahující[4,5]:

- komplex cyklano/aromatických sloučenin s významnými reaktivními skupinami,
- velké množství vody situované jednak ve volném objemu lignitických partikulí (póry, mikrotrhliny původní mezibuněčné prostory pletivového systému mateřské hmoty), jednak vodu fyzikálně vázanou na oxidované uhlíkaté struktury,
- partikulární minerální útvary na bázi sloučenin křemíku, hliníku, železa a dalších prvků,
- makroskopické složky náhodného původu a výskytu.

Fyzikální model struktury lignitu zahrnuje:

- vláknité, destičkové a různě prostorově symetrické i nesymetrické složky o různém stupni prouhelnění,
- mikro a makro disipace příměsí,
- volný vnitřní objem zahrnující: kapiláry, mikrotrhliny, vakuoly.

Lignit tedy představuje složitý makromolekulární komplex především polyelektrolytů (huminové kyseliny, atd.), polysacharidů, polyaromátů, uhlíkatých řetězců modifikovaných sirnými a dusíkatými skupinami, obsahujících kyslíkaté články spojené s hlavními řetězci.

2.1. Struktura, vlastnosti a obsah huminových kyselin v lignitech

Huminové kyseliny jsou hlavní součástí hnědých uhlí a rašeliny a menší mírou se nacházejí i v černém uhlí. Vyskytují se jednak volné a jednak vázané na různé kovy, např. vápník, hliník nebo železo. Huminové látky tvoří širokou skupinu organických sloučenin, vznikajících z rozkládajících se rostlinných zbytků a organismů jak živočišného, tak rostlinného původu. V důsledku jejich složitosti se dá u nich jen obtížně definovat struktura. Podle nejnovějších poznatků lze huminové kyseliny považovat za koloidní chemické látky vzniklé kondenzací anebo polymerací jednodušších základních složek, spojených přímo nebo můstkovou vazbou. Otázka absolutní struktury huminových substancí je velmi diskutabilní, protože se jedná o heterogenní směs látek, jejichž složení závisí na zdroji, metodách extrakce a dalších parametrech, proto i naměřené vlastnosti jsou komplexem vlastností určujících daný systém. Při existenci velkého počtu rozdílných organických sloučenin v živých organismech vedou jejich degradační a rekombinační procesy téměř k nekonečnému počtu typů molekul. Proto není překvapující, že mají široký okruh vlastností. Základními stavebními prvky huminových kyselin jsou uhlík, vodík, kyslík a jejich množství v huminových látkách klesá podle původu a způsobu přípravy huminových kyselin[6].

Předpokládaná struktura těchto látek obsahuje řadu intramolekulárních i mezimolekulových vodíkových vazeb, které způsobují zvýšení jejich stability a umožňují vytváření sekundárních i terciárních struktur. Relativní molekulové hmotnosti se pohybují ve velmi širokém intervalu, přibližně od 700 až do $2x10^6$ Da. Obsah jednotlivých funkčních skupin silně závisí na molekulové hmotnosti.

Tato velká skupina látek se podle své rozpustnosti dělí na tři skupiny[7]:

1. huminové kyseliny, které jsou rozpustné v alkalických roztocích,
2. fulvokyseliny které jsou rozpustné jak v alkalických roztocích, tak i v kyselých roztocích,
3. huminové látky, nerozpustné ani v kyselých ani v alkalických roztocích.

Původně vzniklo rozdělení na fulvokyseliny a huminové kyseliny na základě různé extrahovatelnosti huminových látek alkalickými roztoky, s následujícím dělením okyseleného roztoku při pH = 1. Huminové kyseliny při tomto pH přecházejí v nerozpustné sloučeniny, kdežto fulvokyseliny zůstávají rozpustné.

Huminové kyseliny přes svůj různý původ a molekulární strukturu se dají charakterizovat jako látky skládající se z různých aromatických látek s alifatickými, kyslíkovými, dusíkovými a sirnými můstky, mající různé alifatické, peptidické i lipidické povrchové řetězce a chemicky aktivní funkční skupiny. Mohou být popsány jako kyselé aromatické polymery, obsahující karboxylové a fenolické hydroxylové skupiny ve své struktuře. Huminové kyseliny pocházející ze sedimentů a vodních kalů (tj. vznikajících v řekách, jezerech a mořích) obsahují značný počet struktur alifatických uhlovodíků. Společným znakem těchto sloučenin je jejich velká stabilita vůči degradaci a koloidní charakter. Jejich rezistence vůči degradačním procesům trvá často několik století až tisíciletí. Pro tuto jejich vlastnost se též někdy nazývají „vzdorující organické látky".

Tyto kyseliny mají ve své molekulové struktuře zabudovány jak hydrofobní, tak i hydrofilní oblasti, a proto mohou být adsorbovány na povrchu mnohých částic. V důsledku toho mají vliv na takové procesy jako je rozpustnost, koagulační vlastnost a růst krystalů. Mají acidobazické vlastnosti v široké oblasti pH a řadu pozoruhodných fyzikálních vlastností, jako jsou jejich agregační schopnosti, konformační změny i povrchově aktivní chování.

Huminové látky v terestriálních sedimentech (rašelina, uhlí) jsou obvykle výsledkem mikrobiálního a chemického rozkladu a resyntézy rostlinných zbytků. Na druhé straně ve vodě rozpustné a sedimentující huminové látky v mořích, řekách a jezerech jsou odvozeny převážně z vodní flóry. Obsah uhlíku a poměr uhlíku k dusíku je u těchto látek zpravidla vyšší.

Mezi nejběžnější metody používané pro charakterizaci huminových substancí patří elementární analýza a určení obsahu funkčních skupin. Pro určení acidity huminových kyselin se používají titrační metody (titrací NaOH). Potenciometrická titrace nám neposkytuje obecně známé křivky s inflexním bodem, nýbrž křivky s pozvolným sklonem a neidentifikovatelným bodem konce titrace, což je pro ně příznačné. První bod zlomu na titrační křivce odpovídá spotřebě hydroxylových iontů, při vyšších hodnotách pH (8-9) náleží spotřeba karboxylovým funkčním skupinám (většinou se tato oblast bere jako konečný bod titrace)[7].

Fulvokyseliny jsou méně polydisperzní a více hydrofilní v porovnání s huminovými kyselinami. Tyto vlastnosti s úplnou rozpustností těchto kyselin ve vodě při pH > 1 a s polyelektrolytickým charakterem vodných roztoků způsobuje vyšší chemickou a fyzikálně-chemickou aktivitu fulvokyselin.

2.2. Elementární složení jihomoravského lignitu

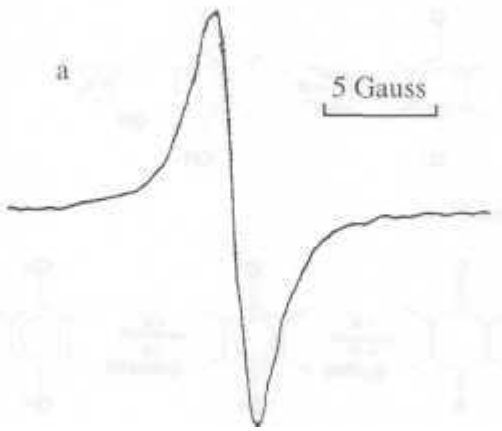
Důležitý pohled na strukturu a vlastnosti huminových látek nám poskytují neseparační a nedestruktivní spektroskopické metody, jakojsou NMR, EPR, měření fluorescence a IR spektroskopie[8-12].

^{13}C-CP/MAS NMR spektra čtyř různých molekulových frakcí huminových kyselin získaných permeační chromatografií ukázala, že podíl alifatických uhlovodíků klesá a naopak počet aromatických uhlovodíků roste s klesající molekulovou hmotností. Podobně obsahy alifatických skupin C-O a skupin C=O rostou s klesající molekulovou hmotností. Podobné trendy byly potvrzeny i nezávisle titračními metodami. Při porovnání funkčních skupin fulvinových látek a huminových látek se na základě ^{13}C NMR spekter potvrdil vyšší obsah aromatických uhlovodíků a nižší obsah alkoholických a karboxylových atomů uhlíků v huminových látkách v porovnání s fulvinovými látkami.

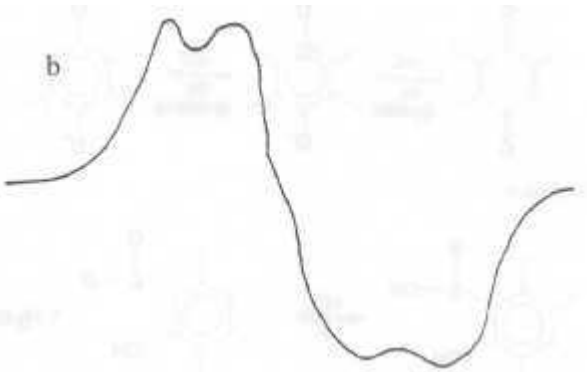
Původní lignit je diamagnetický. Typické EPR spektrum volných organických radikálů v huminových materiálech je singletového typu (obr. 1a). Částečně rozlišená EPR spektra s hyperjemnou interakcí se získala pro huminové látky obsahující kyslík v semichinonové jednotce interagující se dvěma vodíkovými jádry (obr. 1b).

Tabulka I
Složení jihomoravského lignitu

Látka	hm. %
Voda	48–50
Popel	11,6–13,2
Hořlavina	39,1–40,3
H	~ 2,15
C	25,91
O	10,92
S celková	0,81
S organická	0,48
S pyritová	0,27
N	~ 0,32
Halogenidy	< 0,01



Obr. 1a. Typické EPR spektrum organických radikálů v huminových látkách



Obr. 1b. Částečně rozlišené EPR spektrum s hyperjemnou interakcí s dvěmi ekvivalentními jádry vodíku

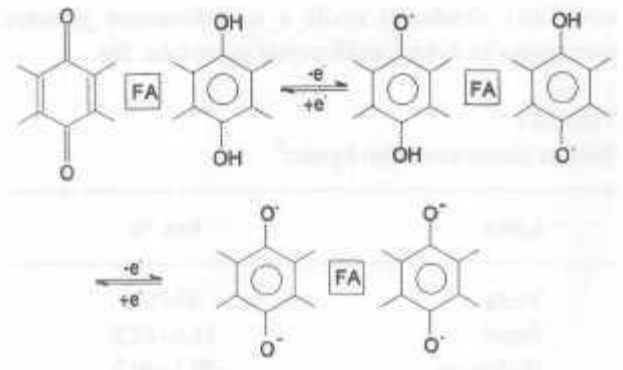
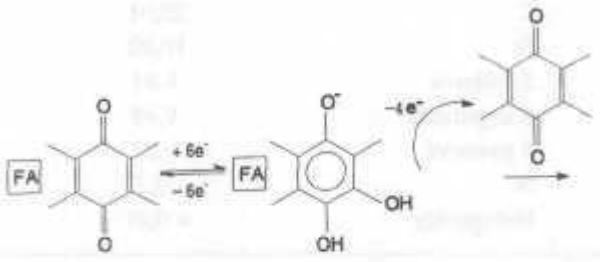


Schéma 1



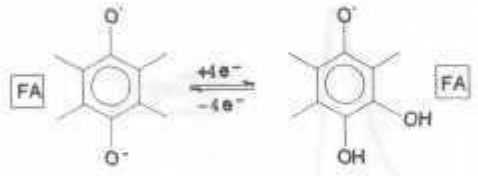


Schéma 2

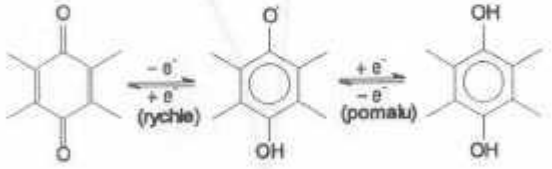


Schéma 3

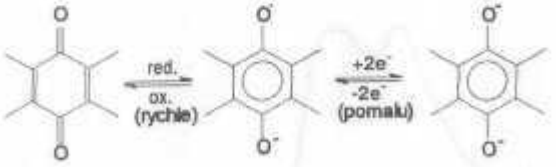


Schéma 4

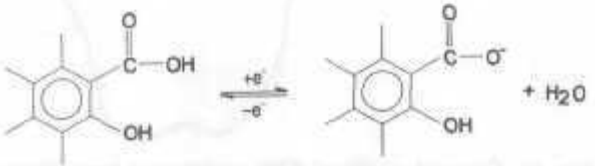


Schéma 5

Hodnoty g - faktoru (g ≈ 2,0028) jsou konzistentní s představou semichinoidních částic, konjugovaných s různě velkými kruhy aromatického charakteru. Jen malé rozdíly v šířce čar různých typů huminových látek mohou odrážet rozdíly v rozsahu delokalizace nespárovaného elektronu ze semichinoidního kyslíku na aromatické uhlíky.

Obsah radikálů u huminových látek je při vyšších hodnotách pH citlivý na pH a od pH > 6 výrazně roste. Tato závislost ukazuje na rovnováhu (kde FA značí fulvokyseliny) (schéma 1).

V alkalických prostředích mohou chinonové skupiny přítomné v huminových látkách redukovat radikálové anionty intervencí hydroxylových intů podle reakce[13,14] (schéma 2).

Ukázalo se, že acidobazické podmínky mají silný vliv na koncentraci volných radikálů v huminových látkách. Počet radikálů je silně ovlivněn hodnotou pH, což vede k následujícím rovnováhám[15"19]:

- v neutrálním prostředí (schéma 3)
- v zásaditém prostředí (schéma 4)

Při interakci huminových látek s ionty přechodných prvků jsou nejdůležitější karboxylové a fenolické hydroxylové skupiny. EPR spektroskopie přechodných prvků s huminovými látkami[20"33] ukazuje, že existuje mnoho různých koordinačních míst schopných vázat přechodné prvky různou silou.

Pro interakci s ionty přechodných prvků jsou nejdůležitější bidemtátní chelatující místa. Můžeme předpokládat, že v huminových látkách se především účastní interakce s přechodnými kovy tyto struktury (schéma 5).

Dále lze uvažovat, že se jedná o struktury obsahující dvě karboxylové skupiny na různých jádrech stejné makromolekuly, karboxylové a fenolické skupiny na různých jádrech nebo dvě karboxylové skupiny na různých polymerních makromolekulách. Méně pravděpodobná je interakce přechodných prvků se dvěmi reaktivními centry. Z uvedeného vyplývá velká variabilita vazby huminových látek s ionty přechodných prvků, což vede k velmi rozdílně silně vázaným přechodným prvkům. EPR studium paramagnetických iontů huminových látek zahrnuje hlavně ionty přechodných kovů Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, VO^{2+} (ref. [5]).

3. Lignit jako disperzní systém pro sorpci

Lignit jako složitý makromolekulární systém získal v procesu transformace původní rostlinné hmoty specifické povrchové vlastnosti dané[34]:

1. chemickým složením,

2. volným objemem mezi orientovanými složkami materiálu (kapiláry, mikrotrhliny),
3. členitým povrchem se situovanými defekty (paramagnetické radikály, volné valence, ionizovatelné skupiny),
4. nerovnovážnou, nerovnoměrnou disipací napětí,
5. přítomností orientovaných molekul vody jako základního peptizačního činidla.

Uvedené povrchodé vlastnosti předurčují lignit jako sorbent samotný, případně po vhodné úpravě. Lignit je z fyzikálně-chemického hlediska disperzní systém tvořený průnikem několika strukturních prvků navzájem propojených především prostřednictvím vody jako samostatné disperzní složky nebo disperzního prostředí. Vzájemná adheze jednotlivých složek má původ jednak ve struktuře výchozí fytoplazmy, (průnik tkáňových pletiv rostlinných buněk) a jednak v kompresi hmot při geologickém tvarování prouhelňujících se vrstev.

Aplikace lignitu jako adsorbentu má několik oblastí:

1. lignit jako adsorbent pro fyzikální sorpci plynů, kapalin, roztoků,
2. lignit jako adsorbent pro chemisorpci těžkých kovů, aniontů a organických sloučenin schopných reagovat s volnými karboxylovými skupinami, fenolickými skupinami a vytvářet komplexy,
3. lignit jako složka směsných adsorbentů, ve kterých se uplatňuje vedle adsorpčních schopností především jeho elasticita,
4. lignit jako výchozí materiál pro sorpci toxických organických látek.

V podobě, v jaké se lignit dobývá a dostává na povrch, je přímo aplikovatelný jen v omezeném počtu případů. Jako jeho první úprava, která v podstatné míře zvyšuje jeho užitní vlastnosti, je drcení a třídění podle velikosti částic, přičemž každá z frakcí může mít specifické použití buď přímo, nebo po určité fyzikálně-chemické úpravě. Při drcení a následném mletí vzniká systém organického substrátu, který může být oddělen od anorganické minerální doprovodné složky klasickými úpravárenskými procesy. Jedním z důležitých parametrů sorpčních materiálů je jejich specifický povrch a objem pórů. Na tato stanovení byla použita metoda BET (Brunnauerova-Emmetova-Tellerova) s měřením pomocí směsi helia a dusíku. V průměru se specifický povrch námi studovaného lignitu pohyboval v rozmezí 3 až 5 $m^2.g^{-1}$ a objem mikropórů v rozmezí 0,0015 až 0,0026 $cm^3.g^{-1}$, což jsou překvapivě malé hodnoty (např. pro aktivní uhlí se pohybují hodnoty specifického povrchu v rozmezí 50 až 300 $m^2.g^{-1}$). Uvedený rozdíl v hodnotách specifického povrchu lignitu a jiných sorbentů je způsoben odlišným a různým povrchovým opracováním jednotlivých materiálů a různým tvarem sorpčních partikulárních mikročástic (kulovité, destičkovité, válcovité, eliptické, Raschigovy kroužky).

Mechanické vlastnosti partikulárních sytému významně závisí na distribuci velikosti částic. Je všeobecně známé, že taktéž celkový objem volně sypaného sorpčního lože je určen touto distribucí. Proto pro úplnost charakteristiky byly stanoveny distribuční funkce pomocí laserového sedimentačního analyzátoru Analysette 22, firmy Fritsch (SRN) a sedimentografu SG4 REGEA, Brno (ČR).

Z možných využití lignitu v technologické praxi se tento článek bude zabývat lignitem jako sorpčním materiálem.

3.1. Adsorpce radioaktivních prvků a jejich nuklidů

Pro objasnění průchodu radioaktivních prvků prostředím byla studována tvorba komplexů s huminovou kyselinou[35-38]. Vazebné interakce aktinoidů Am^{3+}, Cm^{3+}, Eu^{3+} s huminát y byly studovány v práci[35]. Obecně lze reakce aktinoidů s huminovou kyselinou charakterizovat jako neutralizační reakce, které probíhají tím způsobem, že aktivním centrem pro navázání radioaktivního kationtu jsou karboxylové skupiny. Struktura této vazebné interakce byla studována UV spektroskopií, časově řízenou fluorescenční spektroskopií a ultrafiltrací.

Elektrostatické interakce mezi kovovými ionty a molekulou huminové kyseliny mohou být silnější, jestliže je negativní náboj lokalizován více na huminové kyselině. Z toho vyplývá, že vazba Am^{3+} s makromolekulou huminové kyseliny závisí na pH. Konstanty komplexity humátů závisí na původu huminové kyseliny, iontové síle a stupni její disociace. Reakce probíhá podle schématu Am^{3+} + HA = AmHA(III), kde HA obsahuje tři vazebná místa bez ohledu na fenolické nebo jiné výměnné protonové skupiny. Protonová výměnná kapacita a hodnota pK_a byla určena acidobazickou titrací.

Utváření jodo-organických sloučenin v přírodě reguluje pohyblivost radioaktivního jodu v prostředí. Jako modelové interpretace navázání radioaktivního $^{125}I^-$ na huminové substance v půdách a sedimentech bylo použito huminové kyseliny chemicky navázané na silikagel[36]. Adsorpční křivka pro ^{110}Ag má stejný průběh jako pro radioaktivní jod, ale hodnoty sorpce jsou vyšší z důvodu, že kapacita výměny kationtů je dvakrát větší než výměny aniotů.

Práce[37] se zabývá adsorpcí plutonia na huminovou ky-

selinu, jako velmi rozšířeného prvků vyskytujícího se ve velmi malých koncentracích v přírodním systému. Plutonium se může vázat na koloidní částice huminové kyseliny a tvořit tzv. radiokoloidy anebo vytvářet s huminovou kyselinou komplexy, kde karboxylové skupiny huminové kyseliny jsou ligandem. Průběh adsorpce na koloidní formy elementu M může být popsán: Pu(X) + koloid(M) → koloid (M, Pu).

Adsorpce plutonia závisí též na jeho oxidačním stupni, např. pro Pu(V) je možná pouze ve spojení s disproporcionací.

Sorpcí radioaktivního cesia se zabývá práce[38]. Huminová kyselina inhibuje sorpci radioaktivního cesia na jíly, protože huminová kyselina navázaná na povrchu jílu blokuje vazebná místa, na která by se mohly sorbovat ionty cesia.

3.2. Adsorpce kationtů těžkých kovů

Velké množství publikovaných prací se zabývá sorpcí kationtů těžkých kovů z vodných roztoků na huminové materiály[39"43]. Některé ionty kovů (Cu, Al, Fe, Hg) tvoří velmi stabilní sloučeniny s huminovými substancemi. Je zřejmé, že HA snižuje toxicitu těžkých kovů, což bylo zjištěno pomocí měření anodické rozpouštěcí voltametrie (ASV). V práci[39] se studovala interakce huminových kyselin se sedmi kationty, a to Mg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} a Fe^{3+}. Bylo zjištěno, že komplexační a tím i vazebná schopnost huminových kyselin s těmito kovy klesá v pořadí $Fe^{3+} > Al^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$. Tento poznatek není překvapivý, protože jak je známo, železitý kation má největší redoxní potenciál ze všech uvedených studovaných kationtů, přičemž jeho hodnota je u huminových kyseliny 0,7 V. To je blízké hodnotě redoxního potenciálu Fe^{2+}/Fe^{3+}, která je 0,77 V. Tyto výsledky se shodují i s našimi experimentálními výsledky (tabulka II), které se liší pouze v hodnotách pro ionty Al^{3+}.

Studium koordinace huminových ligandů nesoucích karboxylové a fenolické hydroxylové skupiny s kovovými ionty Co^{2+} a Ni^{2+} (CU (II) 2,6-dimethoxybenzoat [DMB]) je předmětem studia[40]. Kovové ionty mohou být spojeny s huminovou kyselinou procesem agregace, kde karboxylové skupiny jsou donorem. Při vazebné interakci kovů s heterocyklickou bází huminové kyseliny (L) dochází k vytvoření látek typu: $[M(2,6\text{-}DMB)_2L_2]$ nebo $[M(2,6\text{-}DMB)_2L(H_2O)_2]$. Tato struktura byla ověřena pomocí IR spektrometrie.

Oba kovové kationty nahrazují dvě karboxylové skupiny v hexakoordinační geometrii huminové kyseliny. K odhalení struktury těchto komplexů byla použita infračervená spektroskopie. V práci[41] byly zkoumány adsorpční a vazebné vlastnosti huminové kyseliny. Byly navrženy závěry o možnosti vlivu huminové kyseliny na analýzu a stanovení těžkých kovů (Cu, Cd, In, Pb) v roztoku. Tak např. měď tvoří s huminovou kyselinou převážně komplexy a to i při nízkých hodnotách pH. V neutrálním a alkalickém prostředí jsou komplexovány ionty kadmia a kobaltu.

Stanovením těžkých kovů v reálných vzorcích vody (tzn. navázaných na huminovou kyselinu) metodou konkurence ligandů spojenou s diferenční pulsní voltametrií, se zabývá práce[42], kde bylo potvrzeno, že ethylendiamin vytěsňuje huminovou kyselinu z jejích kovových komplexů tvorbou kineticky labilních sloučenin.

Stanovení konkurence těžkých kovů ve vodách pomocí koprecipitace s hydroxidem inditým bylo studováno v práci[42]. Těžké kovy v přírodních vodách existují v různých fyzikálně-chemických formách. Huminové a fulvokyseliny jsou hlavní organické látky nacházející se v přírodních vodách a interagují s kovovými ionty za tvorby ve vodě rozpustných komplexů. Koprecipitací s $In(OH)_3$ může být stanovena koncentrace Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Pb(II).

Tabulka II
Maximální naadsorbované množství (μmol/L) jednotlivých kovových iontů na různých přírodních materiálech

Vzorek	Popis vzorku	Sorbovaný kation						
		Al^{3+}	Cd^{2+}	Cr^{3+}	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Pb^{2+}	Zn^{2+}
1	původní lignit z 24.5.94	357	218	226	1450	479	164	144
2	plazmovaný lignit	345	244	233	1550	483	195	377
3	zeolit[a]	200	212	82	83	200	135	303
4	antracit	–	250	–	1450	–	1240	823
5	uhlí Merck	–	37	–	142	–	235	75

[a] Zeolit – Clinoptilolit, lokalita N. Hrabovec (Slovensko)

Obecným závěrem je skutečnost, že huminové a fulvokyseliny reagují s ionty těžkých kovů za tvorby negativně nabitých huminových komplexů.

3. 3. Adsorpce pesticidů

Řada prací se zabývá zjištěním optimálního dávkování pesticidů a jejich vlivem na znečištění půd toxickými polutanty[44-48] (tzn. jejich adsorpcí na huminové substance, které jsou hlavní součástí půd). Adsorpce pesticidů na huminové látky je jednou z nejdůležitějších překážek pro jejich biologickou aktivitu v půdách. Mez biologické účinnosti pesticidů v půdách závisí na jejich adsorpci huminovými substancemi.

V práci[44] byla zkoumána interakce pesticidů, polychlorovaných bifenylů a polycyklických uhlovodíků s huminovými a fulvokyselinami. Cílem této práce bylo objasnění pohybu těchto antropogenních substancí v prostředí. Adsorpční vlastnosti půd byly sledovány z dat získaných měřením pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

Práce[45] sleduje přítomnost fosforu a jeho uvolňování z půd po přídavku huminové kyseliny a EDDHA (ethylen(di-*o*-hydoxy)fenyloctová kyselina). Některé organické sloučeniny mají vliv na jeho rozpustnost v půdách, což se projeví snížením sorpce fosforu půdou. Přídavek chelatujícího členu EDDHA a huminové kyseliny limituje soprci fosforu půdou, protože se dělí o sorpční místa na aktivním povrchu půdy a zvyšuje uvolňování fosforu půdou. Při úpravě zeminy pomocí EDDHA a huminové kyseliny dochází ke zvýšení množství fosforu v půdě, zvláště jeho nerozpustné formy.

Adsorpce kationtů pesticidů na rozpustnou část přírodní a umělé huminové substance užitím metody dialyzační rovnováhy a infračervené spektroskopie byla studována v práci[46]. Cílem této práce bylo objasnění mechanismu jejich vzájemné interakce. Infračervená spektra ukazují na skutečnost, že přírodní fulvokyseliny adsorbují pesticidy z důvodu vyššího obsahu karboxylových skupin. Bylo potvrzeno, že tyto funkční skupiny v jejich struktuře jsou odpovědné za adsorpci v případě kationtů pesticidů. Zvýšení intenzity pásu při vlnočtu 1222 cm^{-1} indikuje, že karboxylové skupiny a fenolické hydroxylové skupiny jsou spojeny s pesticidy iontovou a vodíkovou vazbou a to mechanismem přenosu náboje.

Studium adsorpce pesticidu methomylu (S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimid) půdou a půdními složkami odebranými v jižním Španělsku je cílem práce[47]. Adsorpce byla popsána distribučním koeficientem (K_D) půda-voda. Se zvyšující se koncentrací roztoku methomylu se snižují hodnoty K_D, COŽ znamená, že adsorpce klesá se zvyšující se koncentrací methomylu. Adsorpce methomylu čistou půdou ukazuje na vyšší afinitu pesticidu k huminové kyselině než k minerálním jílům.

V práci[48] byla studována interakce glyphosatu (N-phosphomethyl glycin), který je užíván v zemědělství pro hubení jednoletých a trvalých plevelů, s komplexem železo-kyselina huminová (Fe-HA), z důvodu, že tento komplex interakcí s polyvalentními kationty může reprezentovat hlavní vazby glyphosphatu v půdách. Výsledky adsorpce získané z Freundlichovy adsorpční izotermy vedou k závěru, že nízké koncentrace glyphosphatu jsou adsorbovány mechanismem výměny ligandů obsahující fosforečné skupiny a železo v hydratační sféře Fe-HA komplexu. Při vyšších koncentracích glyphosphatu dochází k vytvoření vodíkových vazeb mezi karboxylovou skupinou ve struktuře Fe-HA a pesticidem.

4. Zaver

Lignit jako uhlíkatý materiál představuje složitý chemický systém složený ze základních složek původní prahmoty, tj. fytomasy, mezi kterými mají hlavní postavení celulózy a hemicelulózy, lignin jakož i jeho produkty vznikající jejich složitou geologicky přesně nejednoznačnou tranformací. Aromatická rezidua modifikovaná polykarboxylovými skupinami, postupně přecházejí do složitého systému huminových kyselin, jejichž obsah významným způsobem určuje nejen rozpustný podíl této hmoty, ale i sorpční schopnosti vázat kationty těžkých kovů případně i některé toxické látky (fenolické látky, ropné komponenty, polychlorované bifenyly a pod.). Z hlediska hospodářství, se jeví lignit jako zajímavá surovina pro určitý průmyslový výzkum. Získané poznatky z fyzikálně-chemických transformací těchto materiálů mohou být i užitečným východiskem pro vývoj postupů chemického zpracování hnědých uhlí různé pánevní provenience. Z uvedeného důvodu by česká chemická věřejnost měla iniciovat vznik komplexního výzkumného programu, orientovaného na ekonomické využití zásob lignitů a hnědých uhlí v naší zemi.

Autoři považují za milou povinnost poděkovat Ing. Petru Kaštánkovi a firmě Enviro Technology Today, s.r.o., Praha za finanční podporu tohoto výzkumu (HS 65 00 29/95), autor B.M. zvlášť děkuje za finanční podporu grantu Fondu VUT pro vědu a umění (grant 66 00 88/96).

LITERATURA

1. Kaštánek P.: *Ekologie dnes;* Zpravodaj firmy Enviro Technology Today, s.r.o., Praha 1996.
2. Tolgyessy Juraj a kol.: *Chemia, biologia a toxikologia vody a ovzdušia.* kap. 1. Veda, Bratislava 1984.
3. Tolgyessy J. Piatok M.: *Technológia vody, ovzdušia a tuhých odpadov,* kap. 1–3. STU, Bratislava 1994.
4. Falbe J.: *Chemierohstoffe aus Kohle,* str. 18. Izd. Chimija, Moskva 1980.
5. Lapčík L.Mašek I., Havlica J., Beran Z., Matoušek J., Veselý M., Šimek Z., Lapčík L., Jr., Mikulášková B., Kocmanová R., Hrabovská J., Voznica P., Pekař M.: *Souhrnná zpráva o vývoji nekonvenčních aplikací jihomoravských lignitů.* VUT, Brno 1994.
6. MacCarthy P., Clapp C. E., Malcolm R. L., Bloom P. R.: *Hutnic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings.* American Society of Agronomy, Inc., Soil Science of America, Inc. Madison 1990.
7. Stevenson F. J.: *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions,* str. 45. Wiley-lnterscience, New York 1982.
8. Senesi N.: Anal. Chim Acta *232,* 51 (1990).
9. Senesi N.: Anal. Chim Acta *232,* 77(1990).
10. Wang Z. D., Pant B. C, Langford C. H.: Anal. Chim. Acta *232,* 43 (1990).
11. Wershaw R. L., Pinckney D. J., Liaguno E. C, Vincente-Beckett V.: Anal. Chim. *232,* 31 (1990).
12. Cooper W. J., Zika R. G. (ed.): *Photochemistry of Environmental Aquatic System.* A.C.S. Symposium Series, No. 237. Washington D. C. 1987.
13. Steeling C, Tollin G.: Biochim. Biophys. Acta *112,* 377(1966).
14. Steeling C, Fitzpatrick J. D.: J. Org. Chem. *37,* 762 (1972).
15. Hayes M. B. H., Mac Charthy P., Malcolm R. L., Swift A. S. (ed).: *Humic Substances II.* Wiley-lnterscience, Chichester 1989.
16. Senesi N., Schnitzer M.: Soil. Sci. *123,* 224 (1977).
17. Hills P., Keen R., Lam K. C, Leung C. T., Orwell M. A., Stoky M., Turner E. (ed.): *Polutation in the Urban Environment.* Polmet 88, Vincent Blue Copy, Hong Kong 1988.
18. Senesi N., Chen. Y., Schnitzer M.: Soil. Biol. Biochem. 9, 397 (1977).
19. Krumbein E. W. (ed.): *Environmental Biochemistry and Geomicrobiology.* Ann Arbor Science, Ann Arbor 1978.
20. Mac Charthy P., Hayes M. B. H., Malcolm R. L., Swift A. S. (ed).: *Interaction with Metals, Minerals and Organic Chemicals.* Wiley-Interscience, Chichester 1991.
21. Chukov S. N., Gmov A. F.: Tr. Biol. Nauk. Issl. Lening. Univers. 35, 138 (1977).
22. Senesi N., Griffith S. M., Schnitzer M., Tounsend M. G.: Geochim. Cosmochim. Acta *41,* 969 (1977).
23. Cheshire M. V., Berrow M. L., Goodman B. A., Mundie C. M.: Geochim. Cosmochim. Acta *41,* 1131 (1977).
24. Senesi N., Sposito G.: Soil. Sci. Soc. Am. J. *48,* 1247 (1984).
25. Cressey P. I, Monk G. R., Powell H. K. J„ Tennent D. J.: J. Soil. Sci. *34,* 783 (1984).
26. Kalianou C. S., Yassoglou N. J.: Goderma *35,* 209 (1985).
27. Senesi N., Sposito G.: Water Oil Soil Pollut. *35,* 241 (1987).
28. Schnitzer M., Ghosh K.: Soil. Sci. *134,* 354 (1982).
29. Mc Bride M. B.: Soil Sci. Soc. Am. J. *46,* 1137 (1982).
30. Carpenter R.: Geochim. Cosmochim. Acta *47,* 875 (1983).
31. Gamble D. S. Schnitzer M., Skinner D. S.: Can. J. Soil Sci. *57,* 47 (1977).
32. Singer P. C. (ed.): *Trace Metals and Metal-Organic Interactions in Natural Waters.* Ann Arbor Science, Ann Arbor 1976.
33. Templeton III. G. D., Chasteeri N. D.: Geochim. Cosmochim. Acta *44,* 741 (1980).
34. Mikulášková B., Lapčík L. Jr„ Lapčík L., Mašek I., Salyk O., v knize: *Carbon and Carbonaceous Composite Materials: Structure-Property Relationships.* (Wright M. A., Palmer K. R., Marx D. T. ed.). World Scientific Publishing, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1996.
35. Kim J. I., Rhee D. S., Wimmer H., Buckau G., Klenze R.: Radiochimica Acta *62,* 35 (1993).
36. Guczi J., Angelova A., Bulman R. A., Szabo G.: Reactive polymers *17,* 61 (1992).
37. Guillaumont R., Adloff J. P.: Radiochimica Acta *58/59,* 53 (1992).
38. Maguire S., Pulford I. D., Cook G. T., Mackenzie A. B.: J. Soil. Sci. *43,* 698 (1992).
39. Mrinal K., Baruah, Mahesh C. Upreti: Fuel *73,* 273 (1994).
40. Strinna Erre L., Micera G., Gulinati B., Cariati F.: Polyhedron *11,* 101 (1992).
41. Plavšič M., Čosovič B.: Anal. Chim. Acta *284,* 539 (1994).
42. Labuda J., Saur D., Neeb R.: Fresenius J. Anal. Chem. *348,* 312 (1994).

43. Hiraide M., Hommi H., Kawaguchi Hiroshi: Anal. Sci. 7, 169 (1991).
AA. Szabo G., Farkas G., Bulman R. A.: Chemosphere 24, 403 (1992).
45. Bermudez D., Juarez M., Sanchez-Andreu J., Jorda J. D.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. *24,* 673 (1993).
46. Maqueda C, Morillo E., Martin F., Undabeytia T.: J. Environ. Sci. Health. *B28,* 655 (1993).
47. Cox L., Hermosin M. C., Cornejo J.: Chemosphere 27, 837 (1993).
48. Piccolo A., Gelano G., Pietramellara G.: The Science of the Total Environment *123/124,11* (1992).

B. Mikulášková[a], L. Lapčík, Jr.[a,b] and I. Mašek[a]
([a]Faculty of Chemistry, Technical University, Brno, [b]Faculty of Technology, Technical University, Zlín): **Lignite: Structure, Properties and Applications**

Lignite is the system of a coalified matter with the remaining parts of phytomass. Lignite is not only important as a source ofenergy but has a variety of other applications, e.g., as a sorption material. The sorption properties after certain mechanical and thermal treatment are similar in some respects (e.g., in maximum sorption capacity) to the sorption properties of charcoal.

Chem. Listy *91,* 846 - 857 (1997)

CHEMICKÉ SIGNÁLY ČMELÁKŮ

IRENA VALTEROVÁ a KLÁRA URBANOVÁ

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 21. VII. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Zařazení čmeláků a typy produkovaných sloučenin
3. Sexuální feromon královny a mateří tlumící látka
4. Obranné látky
5. Stopovací feromony
6. Dominantní signály dělnic
7. Označení zdroje potravy
8. Značkovací feromony samečků
   - 8.1. Předkopulační chování samečků
   - 8.2. Složení sekretu labiální žlázy
   - 8.3. Používané metody analýzy sekretu
   - 8.4. Podobnosti a rozdíly ve složení sekretu
   - 8.5. Chemotaxonomické studie
9. Závěr

1. Úvod

Chemická ekologie se jako vědní obor definovala poměrně nedávno (v 70. letech). Jde o typicky hraniční obor mezi tradičními disciplinami chemie a biologie, který se zabývá studiem chemicky zprostředkovaných interakcí mezi organismy. Nejvíce pozornosti je v chemicko-ekologické literatuře věnováno látkám, produkovaným hmyzem ke vzájemné komunikaci.

Čichové a chuťové vjemy hrají v životě hmyzu velmi důležitou roli. Hmyzí jedinci se jimi řídí ve všech fázích svého vývoje, rozmnožování a dalších činnostech, jako je např. vyhledávání potravy, vhodného partnera pro páření i místa pro nakladení vajíček a vývoj další generace. Dlouhodobým vývojem se vzájemně přizpůsobily zdroj chemické informace (specializovaná exokrinní žláza) a odpovídající receptor (tykadlo, jde-li o těkavý čichový signál, či makadlo příp. jinde umístěný chemoreceptor, jde-li o netěkavý chuťový signál). V tomto článku se zaměříme na chemické signály předávané mezi jedinci téhož biologického druhu, tj. na feromony.

Obzvlášť nepostradatelné jsou chemické signály uvnitř kolonie společenského (sociálního) hmyzu. Klasickým příkladem společenského hmyzu, vývojově nejvyššího a vzhledem k jeho užitečnosti i nejlépe prozkoumaného, je včela medonosná. Chemické signály předávané mezi jedinci včelího společenstva obsahují řadu důležitých informací a napomáhají udržet pořádek v hnízdě. Dělnice se vzájemně informují o zdroji potravy, o přítomnosti nepřítele, i vlastní hnízdo rozpoznávají podle vůně. Mateří látka, produkovaná včelí matkou a šířená ve včelstvu dělnicemi, nese informaci o matčině přítomnosti, brání vývoji další (konkurenční) královny a udržuje dělnice v „pracovní náladě".

Ve srovnání se včelami máme k dispozici mnohem méně znalostí o komunikaci vývojově nižších druhů společenského hmyzu, jako jsou čmeláci. Život uvnitř hnízda čmeláků je mnohem méně prozkoumán přes nespornou důležitost tohoto hmyzu pro opylování zemědělských plodin. V důsledku dlouhodobého společného vývoje rostlin a hmyzu se vzájemně přizpůsobil jednak tvar jazýčku a hmyzího těla vůbec, jednak tvar květu opylované kvetoucí rostliny tak, aby byly vytvořeny optimální podmínky jak pro opylení rostliny, tak pro uspokojení hmyzu hledajícího nektar a pyl. Čmeláci mají dlouhý jazýček, proto se stali nepostradatelnými pro opylení těch rostlin, které mají dlouhé trubkovité koruny (např. jetel, náprstník) a do nichž se včely nedostanou. Studium chování a komunikace čmeláků má proto významný praktický smysl.

2. Zařazení čmeláků a typy produkovaných sloučenin

Čmeláci (Bombicinae), patřící do čeledi včelovití (Apidae), jsou jednou z mnoha skupin v řádu blanokřídlých (Hymenoptera). Žijí především v severním mírném pásmu,

ale zasahují v menší míře i do subtropů a tropů. Zde se vyskytují zejména ve středních a vyšších horských polohách. Ve světě je známo přes 300 druhů čmeláků, nejvíce jsou rozšířeni v Asii. Na území bývalého Československa se vyskytuje téměř 30 druhů čmeláků[1].

Obecně jsou uznávány dvě skupiny - čmeláci patřící v tradičním pojetí do rodu *Bombus*[2] a pačmeláci, patřící do rodu *Psithyrus*. Čmeláčí matka po založení hnízda produkuje nejprve dělnice, které jí pomáhají v péči o další potomstvo. Teprve z dostatečně rozrostlého hnízda se později v létě rodí pohlavní jedinci - samečkové a mladé královny. Pačmeláci jakožto hnízdní paraziti se chovají podobně jako kukačky mezi ptáky. Pačmeláčí matky kladou vajíčka do hnízd čmeláků, nemají vlastní dělnice a jejich pohlavní jedinci se vyvíjejí a rodí jen díky péči dělnic hostitelského druhu čmeláka[3]. Jsou známy případy, kdy pačmelák parazituje pouze na určitém druhu čmeláka, jindy je výběr hostitele méně specializovaný a děje se z většího počtu druhů, vyskytujících se v dané lokalitě. U specializovaných dvojic parazit-hostitel je prokázáno, že vyhledávání hostitelského hnízda se děje na základě specifické vůně. Matky pačmeláků reagují na feromonem označený vchod do hnízda hostitele[4-6].

Z chemického hlediska jsou složky sekretů žláz produkovaných různými kastami čmeláků dosti jednoduché struktury[7]. Jde většinou o látky s alifatickým řetězcem délky 10-35 uhlíkových atomů, nasycené i nenasycené. Větvení řetězce bylo popsáno jen u uhlovodíků, jichž je čmeláky produkována bohatá škála. Ostatní alifatické látky (alkoholy, aldehydy, estery) nacházené u čmeláků mají řetězce nevětvené. Mezi uhlovodíky výrazně převažují sloučeniny s lichým počtem uhlíkových atomů, a to s nejvyšším zastoupením uhlovodíků o délce řetězce 23,25 a 27 atomů uhlíku. Mezi kyslíkatými látkami jsou vždy pouze takové, které mají sudý počet atomů uhlíku. U nenasycených látek je dvojná vazba vždy umístěna v liché poloze a má u dosud určených látek Z-konfiguraci. Z esterů mastných kyselin se u čmeláků vyskytují methyl- a ethylestery, vzácně byly popsány i isopropylestery. Z esterů odvozených od dlouhých alifatických alkoholů je čmeláky produkována pestřejší paleta látek počínaje acetáty, přes butyráty a hexanoáty až k esterům voskového typu s mastnými kyselinami o délce řetězce do 18 uhlíkových atomů. Kromě alifatických sloučenin se ve žlázách čmeláků nacházejí i látky isoprenoidní povahy - monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, vždy v oxidované formě jako alkoholy a jejich estery, případně aldehydy. Složení sekretů žláz je druhově specifické a soudí se, že i uvnitř téhož druhu existují rozdíly v některých signálech, jako je „voňavé" označení vchodu do toho kterého hnízda. Bohaté směsi složek sekretů různých žláz jednotlivých kast téhož druhu obsahují často tytéž látky, i když sekrety sdělují rozdílnou informaci. Specificity této „chemické řeči" se dosahuje mimo jiné i rozdíly v kvantitativním zastoupení jednotlivých složek, které si příjemce signálu správně dešifruje a zareaguje odpovídající změnou v chování.

3. Sexuální feromon samiček a mateří tlumící látka

Plodná samička, v české literatuře označovaná jako matka (královna), je základem čmeláčí kolonie. Na jejím těle je umístěna řada exokrinních žláz, z nich jako nejdůležitější se jeví mandibulární (kusadlová) žláza. Ta je u panenské samičky zdrojem sexuálního feromonu, působícího na krátkou vzdálenost. Extrakt této žlázy vyvolává u čmeláčích samců kopulační chování[8]. Chemická podstata sekretu v této fázi vývoje nebyla dosud studována. Analyzován byl však sekret mandibulární žlázy matky čmeláka zemního (*Bombus terrestris*), která již měla založeno hnízdo s dělnicemi[9]. Podle literatury je mandibulární žláza matky hlavním zdrojem mateří tlumící látky, která složitým mechanismem reguluje diferenciaci kast v kolonii[10]. Mateří látka, je-li přítomna v kolonii čmeláků v dostatečné koncentraci, inhibuje činnost přilehlých tělísek (corpora allata) u dělnic a tím i produkci juvenilního hormonu[11]. Při nízké koncentraci juvenilního hormonu v organismu dělnic je potlačen vývoj jejich vaječníků. Jakmile koncentrace mateří látky poklesne, rozeběhne se biosyntéza juvenilního hormonu a vaječníky dělnic se začnou zvětšovat, až tento vývoj vyvrcholí kladením vajíček dělnicemi. Tato vajíčka jsou ovšem neoplozená, a proto z nich vznikají (jako u všech blanokřídlých) pouze haploidní samci. Uvedené mechanismy jsou již detailně prozkoumány u včely medonosné a zdá se, že v principu platí i pro čmeláky.

Chemická podstata mateří látky je samozřejmě v popředí zájmu vědců i komerčních firem, které se zabývají pěstováním a prodejem malých čmeláčích kolonií pro opylování ve sklenících. Snahou je udržet hnízdo ve stadiu dělnic po co nejdelší dobu a bránit vývoji pohlavních jedinců, kteří již pro opylení nemají velký význam. Vhodná formulace mateří látky by mohla matku po určitou dobu nahradit. Chemicky ovšem vyřešení této otázky nebude jednoduché. Prozatím existuje jen jedna práce zabývající se analýzou mateří látky. V sekretu mandibulární žlázy čmeláka zemního autoři identifikovali na 500 sloučenin přede-

vším alifatické povahy[9]. Je zřejmé, že nalezení aktivních složek takovéto směsi bude pracná a dlouhodobá záležitost. Nejvíce zastoupenými složkami sekretu byly kyseliny 3--hydroxydekanová, 9-oktadecenová a oktadekanová. Chirální (3*S*)-hydroxydekanová kyselina měla vysokou enantiomerní čistotu přes 99 % e.e. Předpokládáme-li jistou podobnost se včelou medonosnou, mohli bychom očekávat, že aktivní bude kyselina 3-hydroxydekanová (včelí mateří látka obsahuje dvě aktivní složky - kyseliny 9-oxo--(2*E*)-decenovou a 9-hydroxy-(2*E*)-decenovou[12]). Konečnou odpověď na otázku aktivity však může dát jedině biologický test.

4. Obranné látky

Mandibulární žláza všech kast čmeláků má ještě další funkci[13]. Při ohrožení produkuje sekret, jehož složky jsou považovány za obranné látky. Hlavní složkou tohoto obranného sekretu je kyselina máselná, dále jsou v něm obsaženy alifatické 2-ketony s kratší délkou řetězce (C_5–C_9) a odpovídající 2-alkoholy. Monoterpenické alkoholy geraniol a citronellol byly také nalezeny v obranném sekretu. Zajímavé je, že obranný sekret se neliší složením u různých kast a dokonce není ani druhově specifický. U deseti studovaných druhů čmeláků a pačmeláků byly nalezeny tytéž látky vždy s výraznou dominancí kyseliny máselné. Nejde zde o sekret, který by kromě obrany současně plnil i funkci poplašného feromonu, jak tomu často bývá u jiných druhů společenského hmyzu (např. u termitů)[14], neboť na něj nereagují příslušníci téhož druhu změnou v chování.

5. Stopovací feromony

K orientaci uvnitř hnízda slouží čmelákům stopovací feromony. Nejvíce znalostí máme opět o čmeláku zemním, který zakládá hnízda v zemních dutinách. Ústí hnízda a především voňavá stopa vedoucí od vchodu k vlastnímu hnízdu jsou dělnicemi spolehlivě rozpoznány[15]. Vizuální orientace při návratu do hnízda je v konečné fázi méně důležitá. Zdrojem stopovacího feromonu je především Dufourova žláza, umístěná v zadečku dělnic. Jiné žlázy (v nohách) patrně také k signálu přispívají. Složení sekretu Dufourovy žlázy je druhově specifické[16]. Dokonce i mezi různými koloniemi téhož druhu existují rozdíly[17-18]. Jde především o kvantitativní rozdíly ve složení sekretu, tvořeném převážně uhlovodíky s řetězcem o 19–31 atomech uhlíku, nasycenými i nenasycenými. Liché délky řetězce vždy převažují, především s počtem uhlíkových atomů 23, 25, 27 a 29. Dále jsou v sekretu přítomny alifatické estery s různou délkou řetězce obou částí. Velikost molekul i počet složek (kolem 150) zaručují dostatečnou variabilitu ve složení feromonu pro jednotlivé druhy.

6. Dominantní signály dělnic

Dufourova žláza čmeláků je zajímavým orgánem vzhledem k jeho mnohostranné funkci. Označení vchodu a vnitřní chodby vedoucí k hnízdu je jen jednou z důležitých funkcí. Sekrety Dufourovy žlázy označují i společenské zařazení dělnic v kolonii. Stejně jako u včel i zde existuje dělba práce v kolonii, v níž ne všechny dělnice mají stejné postavení. V zásadě lze dělnice rozdělit do tří skupin - dominantní dělnice, u nichž se jako první začnou vyvíjet vaječníky v případě oslabení královny, dále podřízené dělnice a létavky, které zásobují hnízdo potravou[19]. Takováto dělba práce může dobře fungovat jen tehdy, není-li pochyb o tom, co má která dělnice na starosti a ke které skupině patří[20]. Kromě morfologických znaků (velikost těla) a způsobu chování se zde opět uplatňuje voňavá řeč. Zdrojem této informace je zřejmě více žláz[21]. Signifikantní rozdíly mezi studovanými skupinami byly pozorovány ve složení sekretů žláz umístěných v hlavě, Dufourovy žlázy i oplachu celého těla. To je v souladu se zjištěním Oldhama a spolupracovníků, že uhlovodíky v extraktu Dufourovy žlázy se složením velmi podobají uhlovodíkům v kutikule[22]. Složení sekretů skupiny dominantních dělnic se nejvíce podobalo sekretu královny, zatímco dělnice-zásobovačky se chemismem od nich diametrálně lišily[21].

7. Označení zdroje potravy

K označení zdroje potravy slouží čmelákům tarsální žlázy, umístěné v chodidlech[23]. Předávání informace o bohatých zdrojích potravy není u čmeláků tak důmyslně vyvinuto jako u včel, ani se dělnice chemicky nepřivolávají na pomoc s bohatou sklizní, jak to známe například u mravenců. Čmeláci prostě tím, že častěji navštěvují na nektar bohaté květy, zanechávají na nich stopy v podobě vyšší koncentrace složek sekretu tarsální žlázy. Ty jsou pro další dělnice znamením, že se vyplatí označený květ navštívit[24]. Složení sekretu zapadá do téže palety látek, se kterými jsme se již setkali v mandibulárních a Dufourových žlázách s tím

rozdílem, že v tarsální žláze jsou přítomny pouze uhlovodíky. I zde dominují látky s lichým počtem uhlíkových atomů C_{23}–C_{29}, méně zastoupeny jsou ostatní délky řetězce mezi 19 a 31 atomy uhlíku. Z nenasycených uhlovodíků byly zjištěny pouze monoeny, zato směs mnoha polohových izomerů. Odpověď čmeláků na testované směsi uhlovodíků byla závislá na použité koncentraci. Zvyšující se koncentrace stimulovala dělnice k dalším návštěvám květu, ale příliš vysoké koncentraci se dělnice vyhýbaly. Vysoká koncentrace „stop" tak může být znamením, že daný zdroj potravy je již vyčerpán[25].

8. Značkovací feromony samečků

8.1. Předkopulační chování samečků

Doposud nejvíce byly z chemického hlediska studovány značkovací feromony samečků[26]. Typické chování samců většiny čmeláků a pačmeláků se nazývá patrolování. Dospělci pačmeláků se v předkopulační fázi chovají stejně jako čmeláci. Poprvé popsal patrolující chování Newman již v roce 1851 (převzato z literatury[27]). Toto chování můžeme pozorovat od časného léta až do podzimu. Čmeláci oblétávají hranice svého teritoria a značkují je svým feromonem. Feromon je produktem cefalické části labiální žlázy, umístěné v hlavě[28]. Sekret je samečkem nanášen na okraje listů či suché květy a takto označená místa jsou pak lákadlem pro samičky téhož druhu k páření.

Období patrolujících letů i umístění značek závisí na druhu čmeláka a souvisí do jisté míry i s polohou hnízda. Některé druhy patrolují hned nad zemí, jiné až v korunách stromů. Mezidruhová teritoria bývají většinou dobře oddělena, ale trasy patrolujících čmeláků stejného druhu se mohou křížit[27]. Čmeláci mohou patrolovat až několik stovek metrů od svých rodných hnízd a jimi střežené území má velikost několika set m^2, jiní si zvolí vyvýšenou pozorovatelnu, ze které vyletují směrem ke kolem letícím živočichům ve snaze nepropást vlastní samičku. Setkání jedinců opačného pohlaví má opět umožnit feromon, jímž sameček pozorovatelnu označil[29]. Existují ale i druhy, které nepatrolují a na samičky svého druhu číhají přímo před ústím hnízda. I tyto druhy mají funkční labiální žlázu, přestože ji zdánlivě nepotřebují, vizuální orientace se zdá dostačující[30]. Složení značkovacího feromonu je pro každý druh specifické a funguje (spolu se segregací geografickou, prostorovou a časovou) jako jedna ze zábran mezidruhového křížení[26-31].

8.2. Chemické složení sekretu labiální žlázy

Sekret labiální žlázy je tvořen v některých případech několika málo sloučeninami, častěji jde ale o bohatší směsi s několika dominantními látkami a řadou minoritních složek. Nejvíce studií chemismu labiálních žláz bylo prováděno ve Švédsku[26]. Složení značkovacího feromonu je známo u více než 30 druhů čmeláků rodu *Bombus* (tabulky I, II a III) a 10 druhů pačmeláků rodu *Psithyrus* (tabulka IV). V taxonomii čmeláků a pačmeláků jsme se přiklonili k tradičnímu zařazení do dvou rodů *Bombus* a *Psithyrus* a k jejich dalšímu rozdělení na podrody[2]. Složení sekretů samčích labiálních žláz je oproti žlázám dělnic a královny jednodušší, ale co do typů sloučenin pestřejší (typické příklady jsou na obr. 1). Byla identifikována široká škála sloučenin zahrnující monoterpeny, sesquiterpeny, diterpeny, alifatické alkoholy, aldehydy a různé deriváty mastných kyselin. V sekretech byly dále nalezeny nasycené i nenasycené uhlovodíky s délkou řetězce 21-27 atomů uhlíku a s lichým počtem uhlíkových atomů. Feromonové složení je druhově specifické, ale v rámci jednoho druhu (např. *Bombus lucorum)* existují i formy, lišící se zbarvením, složením feromonu i místem výskytu[32]. V některých případech vedly rozdíly v chemickém složení značkovacího feromonu k rozdělení do poddruhů nebo dokonce k popisu nových druhů[33].

8.3. Používané metody analýzy sekretů

Základní analytickou metodou je spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Labiální žláza jednoho samečka však poskytuje dostatečně koncentrovaný vzorek nejen pro plynovou chromatografii, ale i pro sloupcovou chromatografii v mikroměřítku a následnou derivatizaci frakcí či separovaných složek. Z jedné žlázy lze extrakcí získat řádově desítky mikrogramů směsi. Po získání hmotnostního spektra, které poskytne první informaci o molekulové hmotnosti a typu sloučeniny, je nejčastěji řešeným problémem u nenasycených látek poloha a konfigurace dvojné vazby.

Poloha dvojné vazby se stanovuje ozonolýzou, přípravou aduktu s dimethyldisulfidem (DMDS) a v některých případech (alkoholy, aldehydy) oxidací na kyseliny a přípravou jejich methylesterů[40]. Produkty ozonolýzy nebo DMDS adukty se podrobí GC-MS analýze, zatímco u methylesterů se využívá ECL hodnot (Equivalent Chain Length), které

Tabulka I

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Megabombus*, *Subterraneobombus*, *Fervidobombus*, *Thoracobombus* a *Alpinobombus*)

Podrod	*Megabombus*		*Subterraneobombus*		*Fervidobombus*	*Thoracobombus*						*Alpinobombus*			
Látka[a]	*B. hortorum*	*B. consabrinus*	*B. subterraneus*	*B. distinguendus*	*B. sonorus*	*B. pascuorum*[b]	*B. humilis*	*B. muscorum*	*B. ruderarius*	*B. sylvarum*	*B. veteranus*	*B. alpinus*	*B. polaris*	*B. hyperboreus*	*B. balteatus*
Isoprenoidy															
Citronellol														x	
Farnesol	xxx														
2,3-Dihydrofarnesol														xx	
2,3-Dihydrofarnesal														x	
Geranylgeraniol	x		xxx		xx										
Geranylgeranial	xxx	xx		xxx											
Geranylcitronellol														x	xx
Geranylcitronellal			xxx												
Geranyllinalool				xx											
Alifatické alkoholy															
Dodekanol															x
Tetradekanol					xx	x									x
Hexadecenol						xxxΔ^{7}	xxxΔ^{9}	xxxΔ^{9}	xxxΔ^{9}	xxxΔ^{9}	xxx	xxxΔ^{9}	xxx		
Hexadekadienol												x	xxx		
Oktadecenol	xxΔ^{9}	x			xxxΔ^{11}		xxΔ^{9}	xxx	xxxΔ^{9}	x	xxx			xxxΔ^{9}	
Oktadekadienol														x	
Ikosenol							xx								
Aldehydy															
Hexadekanal						x									
Hexadecenal						xxxΔ^{7}	xxΔ^{9}								
Oktadecenal							xxxΔ^{11}								
Ikosenal							xx								
Estery															
Dodecylacetát															x
Dodecylbutyrát															xx
Tetradecylacetát															xxx
Tetradecylbutyrát															xx
Hexadecenylacetát							xx			xxxΔ^{7}	xxx	x			
Oktadecenylacetát								xxxΔ^{9}			xx				
Uhlovodíky															
Nonadecen	xxxΔ^{9}	xxxΔ^{9}													
Henikosan												x	x	x	
Henikosen												x			
Trikosan					xx	xx						x	x	x	x
Trikosen												x	x	x	x
Pentakosan					x	x									x
Pentakosen						x									
Literatura	34,35	35	34,35	35	30	34-38	35	34,35	35	35	35	39	39	39	39

[a] xxx - hlavní složka (> 10 %), xx - středně zastoupená složka (2-10 %), x - minoritní složka (1-2 %), Δ^{n} - poloha dvojné vazby, pokud je známa, [b] *B. pascuorum* je synonymem *B. agrorum*

jsou tabelovány pro daný typ kolony a vedou k určení polohy dvojné vazby. Dvojné vazby ve sloučeninách identifikovaných ve čmelácích se vyskytují v jedné z těchto pozic: 7, 9, 11, 13 nebo 15 podle délky řetězce. Sloučenin s větším počtem dvojných vazeb se vyskytuje méně. Poloha dvojné vazby je určena její polohou v mastných kyselinách, které jsou prekursory[40]. Přestože jde o poměrně jednoduché látky, naše znalosti o jejich biosyntéze ve žlázách čmeláků jsou minimální. Biosyntetické důvody patrně determinují i konfiguraci dvojných vazeb. K jejímu určení se

Tabulka II

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Pyrobombus*, *Kallobombus*, *Cullumanobombus* a *Melanobombus*)

Podrod	*Pyrobombus*								*Kallo-bombus*	*Cullumano-bombus*	*Melano-bombus*
Látka[a]	*B. monticola*	*B. scandinavicus*	*B. lapponicus*	*B. hypnorum*	*B. pratorum*	*B. huntii*	*B. jonellus*	*B. cingulatus*	*B. soroensis*	*B. cullumanus*	*B. lapidarius*
Isoprenoidy											
Geraniol					x					x	
Citronellol					x						
Geranylacetát					x					x	
Citronellylacetát					x						
Farnesen					x			x			
Farnesol					xxx	x		xxx			
2,3-Dihydrofarnesol						xxx	xxx	xxx			
2,3-Dihydrofarnesal							xx	x			
Farnesylacetát					xxx					x	
Geranylgeraniol					x					x	
Geranylcitronellol			xxx	xxx							
Geranylgeranylacetát				x	xx				xxx	xxx	
Alifatické alkoholy											
Dodekanol								x			
Tetradekanol											x
Hexadekanol	xx	x	xx	xxx	xxx	x					xx
Hexadecenol				xxxΔ^{9}							xxxΔ^{9}
Oktadecenol					xxxΔ^{11}	xxxΔ^{11}					
Aldehydy a estery											
Hexadekanal				x							
Hexadecylacetát	xx	xx									
Hexadecenylacetát	xxx	xxx									
Ikosylacetát			x								
Ethylhexadecenoát				x							
Uhlovodíky											
Henikosan			x								
Trikosan		x	xx			x					
Trikosen			x								
Pentakosen			x								
Pentakosan		x	x			x					
Literatura	26	33	33	34,40, 41	26,34, 40,41	30	26,41	41	34	34	34,37, 40

[a] xxx – hlavní složka (> 10 %), xx – středně zastoupená složka (2–10 %), x – minoritní složka (1–2 %), Δ^{n} – poloha dvojné vazby, pokud je známa

Tabulka III

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Bombus*, *Alpigenobombus* a *Confusibombus*)

Podrod	*Bombus*					*Alpigeno-bombus*	*Confusi-bombus*
Látka[a]	*B. terrestris*	*B. lucorum* (tmavá forma)	*B. lucorum* (světlá forma)	*B. patagiatus*	*B. sporadicus*	*B. wurflaini mastrucatus*	*B. confusus*[b]
Isoprenoidy							
2,3-Dihydrofarnesol	xxx						
2,3-Dihydrofarnesylacetát	x						
Geranylgeraniol		x					
Geranylcitronellol	xx						xxx
Geranylcitronellal							x
Geranylgeranylacetát		x				xxx	x
Geranylcitronellylacetát							x
Geranylcitronellylhexanoát							x
Geranylcitronellyloktanoát							xx
Geranylcitronellyldekanoát							xx
Alifatické alkoholy							
Tetradekanol	x						
Hexadekanol	x		x			x	
Hexadekadienol						x	
Oktadecenol							xΔ^9
Aldehydy a ketony							
Tetradekanal					x		
Hexadekanal						x	
2-Pentadekanon						x	
Kyseliny a estery							
Kyselina hexanová							x
Tetradecylacetát					xxx		
Hexadecylacetát			x		x		
Oktadecenylacetát							xxxΔ^9
Ethyldekanoát	x	x					
Ethyldodekanoát	xx	xxx	xx	xxx	x		
Ethyltetradekanoát	x	x	x				
Ethyltetradecenoát	xΔ^9	xΔ^9	xxxΔ^9				
Ethylhexadecenoát	x	x	x				
Ethylhexadekadienoát			x				
Ethylhexadekatrienoát			x				
Ethyloktadekanoát		x					
Ethyloktadecenoát		x	x				
Ethyloktadekadienoát		x					
Ethyloktadekatrienoát		x	x				
Methyloktadecenoát							xΔ^9
Uhlovodíky							
Henikosan		x	x				
Trikosan		xx	xx			xx	xx
Trikosen		x	x			x	
Pentakosan		x	xx				x
Pentakosen		xx	x			x	xΔ^7 i Δ^9
Literatura	26,34,40,42	32	32,37	34	34	43	29

[a] xxx - hlavní složka (> 10 %), xx – středně zastoupená složka (2-10 %), x – minoritní složka (1-2 %), Δ^n – poloha dvojné vazby, pokud je známa, [b] ve stopovém množství (< 1 %) byly dále nalezeny látky: kyselina oktanová, ethyl-9-oktadecenoát, ethyloktadekanoát, oktadecylacetát, geranylcitronellyldodekanoát, geranylcitronellyltetradekanoát, pentakosadien, heptakosadien, 7-heptakosen a heptakosan

může využít prosté plynové chromatografie a srovnání se standardy, pokud jsou k tyto dispozici a pokud se retenční časy Z- a *E*-izomerů liší. Lišit se mohou i retenční časy DMDS aduktů Z- a *E*-izomerů. V poslední době se geome-

Tabulka IV
Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů pačmeláků (rod *Psithyrus)*

Látka[a]	*P. vestalis*[b]	*P. bohemicus*	*P. rupestris*	*P. campestris*	*P. barbutellus*	*P. insularis*	*P. sylvestris*	*P. quadricolor*[c]	*P. norvegicus*	*P. flavidus*
Isoprenoidy										
Citronellol		xx								
Farnesol					xxx					
Farnesylacetát					xx					
Geranylcitronellol	xx		xxx			xxx				
Geranylcitronellylacetát	xxx									
Geranylgeranylacetát			xx							
Alifatické alkoholy										
Tetradekanol			xx				x			
Tetradecenol			$x\Delta^{9}$							
Hexadekanol			xx			xx		x		
Hexadecenol		$xxx\Delta^{11}$	xxx				$xxx\Delta^{11}$		xx	xxx
Oktadecenol		$xx\Delta^{13}$		xx		$xxx\Delta^{11}$	x	xx	xxx	
Oktadekadienol		x								
Ikosenol	$xx\Delta^{15}$	$xx\Delta^{15}$		xxx						
Ikosadienol	x	xx								
Aldehydy										
Tetradekanal		x	x				xx	xx		
Hexadekanal		x	x				x	x		
Hexadecenal		$xx\Delta^{11}$						$xx\Delta^{11}$	xxx	
Oktadecenal	$x\Delta^{11}$	$xx^{d}\Delta^{11}$								
Ikosenal	$xx\Delta^{15}$	$x^{e}\Delta^{15}$								
Ikosadienal	xxx	xxx								
Kyseliny a estery										
Tetradecenová kyselina							xx	xx		
Oktadecylacetát					x					
Ikosadienylacetát	xx									
Ethyldodekanoát							x			
Ethyltetradekanoát							x			xx
Ethyltetradecenoát							$x\Delta^{9}$	x		xx
Uhlovodíky										
Henikosadien	$xxx\Delta^{5,9}$									
Trikosan	xx	xx				xx				
Pentakosan	x	xx				x				
Heptakosan	x	x								
Literatura	44,45	34,40,45,46	34,40,46	34,46	34,46	30	34,40,46	34,46	46	46

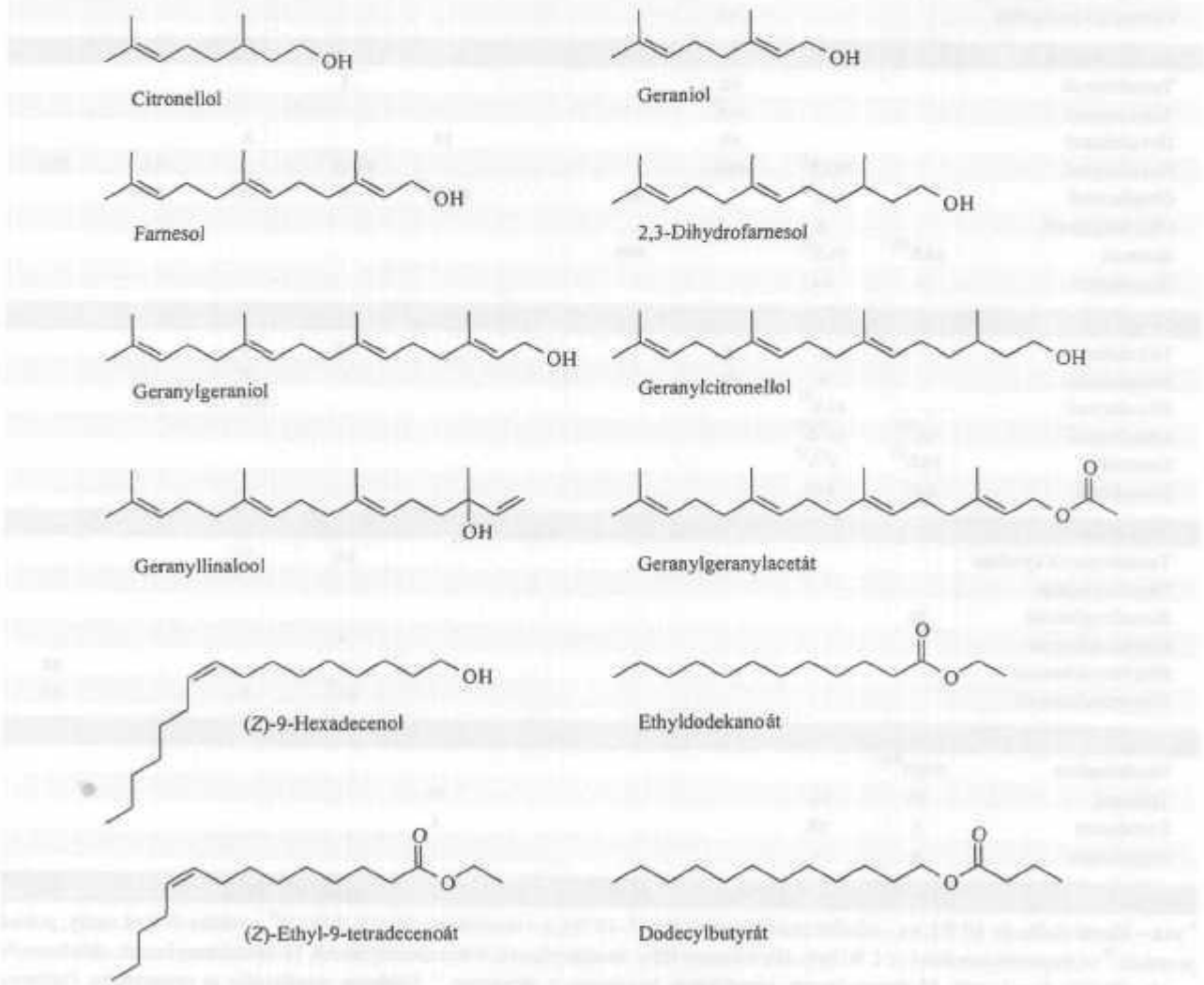
[a] xxx - hlavní složka (> 10 %), xx - středně zastoupená složka (2-10 %), x - minoritní složka (1-2 %), Δ^{n} - poloha dvojné vazby, pokud je známa, [b] ve stopovém množství (< 1 %) byly dále nalezeny látky: tetradecylacetát, 9-hexadecenylacetát, 11-hexadecenylacetát, oktadecenylacetát, oktadekadienylacetát, 15-ikosenylacetát, oktadekanal, hexakosan a oktakosan, [c] *Psithyrus quadricolor* je synonymem *Psithyrus globosus*, [d] v malém množství byl přítomen i Δ^{13} isomer, [e] v malém množství byl přítomen i Δ^{11} isomer

trie dvojné vazby určuje z infračerveného spektra měřeného v plynné fázi[47] (GC-FTIR). Ve všech dosud zkoumaných případech byla u složek čmeláčích sekretů nalezena Z-konfigurace dvojných vazeb.

Mezi isoprenoidními složkami sekretu jsou i chirální látky (citronellol, dihydrofarnesol, geranylcitronellol, geranyllinalool a odvozené estery). Doposud byla absolutní konfigurace určena pouze u jediné látky - 2,3-dihydrofarnesolu (terrestrolu) z druhu *B. terrestris*[48]. Syntézou srovnávacího vzorku, změřením optické rotace a přípravou diastereoizomerů bylo potvrzeno, že přírodní látka má konfiguraci 3*S*-(–). Přes nespornou důležitost znalosti absolutní konfigurace feromonových složek i dostupnost moderních technik, jako je chirální plynová chromatografie, nemáme dosud žádné informace o absolutní konfiguraci či enantiomerní čistotě ostatních chirálních látek u dalších druhů čmeláků.

8.4. Podobnosti a rozdíly ve složení sekretu

Pokusme se nyní o malou statistiku látek, produkovaných samečky v labiální žláze, a jejich distribuce v jednotlivých druzích (tabulky I–IV). Více než polovina druhů čmeláků používá isoprenoidní látky jako hlavní složku, a to jak volné alkoholy, tak jejich acetáty a odpovídající aldehydy. Nejčastěji se setkáváme s 2,3-dihydrofarnesolem, geranylcitronellolem a geranylgeranylacetátem. Také farnesol je často přítomen. I u pačmeláků má polovina dosud studovaných druhů v sekretu isoprenoidy, mezi nimiž je nejčastější výskyt geranylcitronellolu. 2,3-Dihydrofarnesol nebyl zatím u pačmeláků nalezen. Z alifatických sloučenin se nejčastěji setkáme s alkoholy, jejichž řetězce jsou nevětvené a hydroxyskupina je vždy v poloze 1. Nejběžnějšími



Obr. 1. **Typické příklady látek přítomných v sekretech labiálních žláz samečků čmeláků a pačmeláků**

alkoholy jsou hexadecenol (u 10 druhů čmeláků jako hlavní složka, dvojná vazba většinou v poloze 9) a oktadecenol (12 druhů *Bombus*). Podobně je tomu u pačmeláků, kde je navíc běžný i ikosenol. Aldehydy nacházíme u čmeláků jen vzácně (2 druhy, délka řetězce opět 16 a 18 uhlíkových atomů), zato u pačmeláků jsou aldehydy běžnější (14-20 uhlíkových atomů v řetězci). Zcela výjimečně byly nalezeny i ketony *(B. wurfleini mastrucatus)* s ketoskupinou v poloze 2 a s řetězcem o lichém počtu atomů uhlíku (15 a 17). Estery přítomné v labiálních žlázách jsou odvozeny buď od voskových alkoholů (acetáty, vzácněji i butyráty), nebo od mastných kyselin (methyl- a ethylestery). Acetáty alifatických alkoholů jsou prakticky všudypřítomné v rodu *Bombus* i *Psithyrus,* zatímco ethylestery mastných kyselin jsou typické pro čmeláky z podrodu *Bombus.* Pokud jde o přítomnost uhlovodíků v labiální žláze, je situace stejná prakticky ve všech druzích. Délky řetězce 23, 25 a 27 jsou nejběžnější. Stejněje tomu i u uhlovodíků v hmyzí kutikule.

U některých příbuzných druhů z téhož podrodu můžeme nalézt podobnosti v typech látek, ale není to vždy pravidlem. Pro podrod *Pyrobombus* jsou charakteristické mono-, sesqui- a diterpeny, přítomné ve většině druhů tohoto podrodu (tab. II). Rod *Alpinobombus* je charakterizován hlavně nerozvětvenými volnými alkoholy (tab. I). Z tabulky I je patrná podobnost dvou podrodů v levé části *(Megabombus* a *Subterraneobombus),* obsahujících isoprenoidy. Podrod *Thoracobombus* neobsahuje naopak vůbec isoprenoidy a dominují v něm C_{16} a C_{18}-alkoholy. U pačmeláků (tab. IV) jsou určité podobnosti vidět uvnitř podrodu *Ashtonipsithyrus* (druhy *P. vestalis* a *P. bohemicus)* i podrodu *Fernaldaepsithyrus* (4 druhy v pravé části tab. IV, *P. sylvestris* - *P. flavidus).* Genetická příbuznost se tedy projevuje jak v podobnosti morfologické, tak i v podobnosti produkovaných chemických látek.

8.5. Chemotaxonomické studie

Pokud se budeme jednotlivými rody zabývat podrobněji, je jistě velmi zajímavým druhem čmeláka *Bombus lucorum*[32]. Byl nalezen na téže lokalitě jižního Švédska ve dvou formách, morfologicky rozlišených na světlou a tmavou na základě různého zbarvení těla. V chemickém složení sekretu obou forem je také signifikantní rozdíl. U tmavé formy je hlavní složkou ethyldodekanoát, zatímco u světlé formy je to (Z)-9-ethyltetradecenoát (tab. III).

Podobný případ byl popsán i pro druh *Bombus lapponicus*[33]. V Evropě existuje celkem sedm forem tohoto druhu, lišící se zbarvením těla. Z chemického hlediska byly studovány dvě formy (světlá a tmavá) vyskytující se ve Švédsku. Chemická analýza jasně potvrdila existenci dvou forem, zřetelně se lišících ve složení značkovacího sekretu (tab. II). Tyto formy byly následně v literatuře definovány nejprve jako poddruhy, později byly rozděleny na samostatné druhy. Hlavní složkou světlé formy byl geranylcitronellol. Tmavá forma je charakterizována hexadecenylacetátem a zastoupen byl též hexadecylacetát. Na základě chemické analýzy a morfologických znaků jsou jedinci klasifikovaní jako světlí považováni za druh *B. lapponicus* a skupina tmavých jedinců je definována jako druh *B. scandinavicus*[41]. Tato práce je typickým příkladem využití chemické analýzy k určení a definování nových taxonů nebo k upřesnění charakteristiky již morfologicky rozdělených druhů (chemotaxonomie).

Statistické vyhodnocení přítomnosti různých sloučenin v sekretech labiální žlázy většího souboru druhů čmeláků i pačmeláků naznačuje podobnosti v chemismu u blízce příbuzných druhů[48]. Dokonce i dvojice parazit-hostitel, jako např. *Psithyrus rupestris* a *Bombus lapidarius,* mají v sekretech stejné typy látek[49]. Chemické výsledky tak mohou být podporou taxonomům, případně mohou upozornit na určité vztahy mezi druhy. Pro spolehlivé využití analytických dat k taxonomickým účelům by však bylo třeba zpracovat mnohem větší soubor dat, zahrnující i variabilitu uvnitř druhu. Pohled na data v tabulkách I–III potvrzuje správnost zařazení druhů do podrodů, ke kterému jsme se v taxonomii přiklonili.

9. Závěr

Podíváme-li se podrobně na přehled složek značkovacího feromonu čmeláčích samců, nenajdeme dva druhy, u nichž by složení sekretu bylo identické. I když jsou si některé sekrety složením podobné, vždy se liší přítomností minoritních složek nebo alespoň kvantitativním zastoupením látek. Dosud máme málo informací o geografických odchylkách ve složení sekretu uvnitř jednotlivých druhů. Zdá se, že v některých druzích tyto odchylky existují *(B. lucorum),* zatímco složení samčích značek jiných druhů je stabilní bez ohledu na lokalitu výskytu druhu *(B. pratorum, B. wurfleini)*[50]. Také individuální rozdíly ve složení sekretu u jednotlivých samečků téhož druhu nebyly studovány. Nejvíc ale dosud chybí zásadní informace o tom, které ze složek sekretu jsou funkčně důležité, zda jsou rozhodující jen hlavní složky či zda je pro biologickou aktivitu významná celá směs látek. Hlavními důvody jsou na jedné straně

nesnáze s realizací vhodného biologického testu, neboť samečkové čmeláků potřebují pro patrolování velký otevřený prostor a v umělých testovacích podmínkách se nechovají přirozeně. Dalším důvodem je i nedostupnost syntetických preparátů některých složek sekretu, konkrétně seskviterpenů a diterpenů, opticky čistých v dostatečném množství. Syntézy seskvi- a diterpenických složek sekretu byly provedeny buď v racemické formě, nebo i v opticky čisté formě[44,51,52]. Náročné syntézy však neposkytly větší množství látky, potřebné pro rozsáhlejší biologické testy. Proto je v oblasti chemických signálů čmeláků ještě stále dostatek prostoru pro další výzkum biologů i chemiků.

Autorky děkují RNDr. Oldřichu Hovorkovi a Mgr. Jiřímu Kindlovi za pomoc s taxonomií čmeláků a pačmeláků. Finanční podporu pro výzkum čmeláků u nás poskytla Grantová agentura České republiky (grant č. 203/95/0269).

LITERATURA*

1. Bouček Z., Šustera O., v knize: *Klíč zvířeny ČSR,* II. díl, (Kratochvíl J., ed.), str. 377. ČSAV, Praha 1957.
2. Richards O. W.: Bulletin of the British Muzeum (Natural History), Entomology *22,* 209 (1968).
3. Morse D. H., v knize: *Social Insects* (Hermann H. R., ed.), sv. III, str. 245. Academic Press, New York 1979.
4. Cederberg B.: Entomol. Tidskr. *100,* 128 (1979).
5. Cederberg B.: Ann. Ent. Fenn. *49,* 11 (1983).
6. Fisher R. M., Greenwood D. R., Shaw G. J.: J. Chem. Ecol. *19,* 77\ (1993).
7. Duffield R. M., Wheeler J. W., Eidkwort G. C, v knize: *Chemical Ecology of Insects* (Bell W. J., Cardé R. T., ed.), str. 387. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts 1984.
8. van Honk C. G. J., Velthius H. H. W., Röseler P.-F.: Experientia *34,* 838(1978).
9. Hefetz A., Taghizadeh T., Francke W.: Z. Naturforsch. *51c,* 409 (1996).
10. van Honk C. G. I, Velthius H. H. W., Röseler P.-F., Malotaux M. E.: Ent. Exp. Appl. *28,* 191 (1980).
11. Roseler P.-F., Roseler I., van Honk C. G. J.: Experientia *37,* 348 (1981).
12. Slessor K. N., Kaminski L.-A., King G. G. S., Borden J. H., Winston M. L.: Nature *332,* 354 (1988).
13. Cederberg B.: *Proc. VIII Int. Cong. IUSSI,* str. 77: Wageningen, Netherlands, 1977.
14. Vrkoč J., Křeček J., Hrdý I.: Acta Ent. Bohemoslov. *75,* 1 (1978).
15. Cederberg B.: Zoon 5, 143 (1977).
16. Tengö J., Hefetz A., Bertsch A., Schmitt U., Lübke G., Francke W.: Comp. Biochem. Physiol. *99B,* 641 (1991).
17. Foster R. L., Gamboa G. J.: Ethology *81,* 273 (1989).
18. Hefetz A., Tengö J., Lübke G., Francke W., v knize: *Sensory Systems of Arthropods* (Wiese K., ed), str. 469. Birkhäuser Verlag, Basel 1993.
19. Van Doorn A.: Neth. J. Zool. *37,* 255 (1987).
20. Van Doorn A.: Physiol. Entomol. *14,* 211 (1989).
21. Ayasse M., Marlovits T., Tengö J., Taghizadeh T., Francke W.: Apidologie *26,* 163 (1995).
22. Oldham N. J., Billen J., Morgan D.: Physiol. Entomol. *19,* 115(1994).
23. Schmitt U.: Experientia *46,* 1080 (1990).
24. Schmitt U., Lübke G., Francke W.: Chemoecology 2, 35 (1991).
25. Kato M.: Oecologia *76,* 364 (1988).
26. Bergström G., Svensson B. G., Appelgren M., Groth I., v knize: *Biosystematics of Social Insects* (Howse B., Clément J.-L., ed.), str. 175. Academic Press, London and New York 1981.
27. Svensson B. G.: Abstr. Upps. Diss. Fac. Sci. *549,* 1 (1980).
28. Kullenberg B.: Zoon Suppl. *1,* 31 (1973).
29. Hovorka O., Urbanová K., Valterová I.: J. Chem. Ecol. *23,* v tisku (1997).
30. Bergström G., Bergman P., Appelgren M., Schmidt J. O.: Bioorg. Med. Chem. *4,* 515 (1996).
31. Free J. B., v knize: *Pheromones of Social Bees* (Free J.B.,ed.), str. 157. University Press, Cambridge 1987.
32. Bergström G., Kullenberg B., Stallberg-Stenhagen S.: Chem. Scr. *4,* 174 (1973).
33. Bergström G., Svensson B. G.: Chem. Scr. *4,* 231 (1973).
34. Kullenberg B., Bergström G., Stallberg-Stenhagen S.: Acta Chem. Scand. *24,* 1481 (1970).
35. Appelgren M., Bergström G., Svensson B. G., Cederberg B.: Acta Chem. Scand. *45,* 972 (1991).
36. Bergström G., Appelgren M., Svensson B. G., Ágren L., Descoins C, Frerot B., Gallios M., Lettere M.: Apidologie *16,* 57 (1985).

* Obtížně dostupné entomologické práce jsou v plném znění k nahlédnutí v archivu autorek

37. Calam D. H.: Nature *221,* 856 (1969).
38. Descoins C, Frerot B., Gallios M., Lettere M., Bergström G., Appelgren M., Svensson B. G., Ágren L.: Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C. *3,* 149 (1984).
39. Svensson B. G., Bergström G.: J. Chem. Ecol. 5, 603 (1979).
40. Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A., Tornback B.: Comp. Biochem. Physiol. *88B,* 631 (1987).
41. Svensson B. G., Bergström G.: Insectes Soc. 24, 213 (1977).
42. Bergström G., Kullenberg B., Stallberg-Stenhagen S., Stenhagen E.: Arkiv Kemi *28,* 453 (1968).
43. Svensson B. G., Appelgren M., Bergström G.: Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C. *3,* 145 (1984).
44. Valterová I., Svatoš A., Hovorka O.: Collect. Czech. Chem. Commun. *61,* 1501 (1996).
45. Bergman P., Bergström G., Appelgren M.: Chemoecology 7, v tisku (1996).
46. Cederberg B., Svensson B. G., Bergström G., Appelgren M.: Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C. *3,* 161 (1984).
47. Attygalle A. B., Svatoš A., Wilcox C: Anal. Chem. *66,* 1696(1994).
48. Stallberg-Stenhagen S.: Acta Chem. Scand. *24,* 358 (1970).
49. Bellés X., Galofré A., Ginebreda A.: Apidologie *231,* 18 (1987).
50. Urbanová K., Valterová I.: nepublikované výsledky.
51. Ahlquist L., Stallberg-Stenhagen S.: Acta Chem. Scand. *25,* 1685 (1971).
52. Ahlquist L., Bergström G., Liljenberg C: Prog. Chem. Fats other Lipids *16,* 231 (1978).

I. Valterová and K. Urbanová *(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Chemical Signals of Bumblebees**

The review summarises chemical compounds found in exocrine glands of different castes of bumblebees. The sex pheromone of queens, queen pheromones, defence substances, trail pheromones, dominant signals of workers, marks of a food source, and male's marking pheromones are described. Attention is paid especially to the constituents of labial gland secretions of males. An overview is given of the chemistry of 32 species of bumblebees (genus *Bombus*) and 10 species of cuckoo bumblebees (genus *Psithyrus),* occurring in Europe and America. Similarities and differences in the chemical composition of secretions of related species within subgenera are discussed.

Chem. Listy 92, 197 - 208 (1998)

BIOLOGICKY AKTIVNÍ DEPSIPEPTIDY

JARMILA VINŠOVÁ[a] a EVŽEN KASAFÍREK[b]

[a]Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, [b]Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Kouřimská 17, 130 60 Praha

Došlo dne 13.III.1997

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika a rozdělení
3. Syntéza, chránící skupiny, kondenzační činidla a aktivační látky
4. Vedlejší reakce
5. Didepsipeptidy, lineární, cyklické, příklady syntéz
6. Tri-, tetra- až polydepsipeptidy
   6.1. Tridepsipeptidy
   6.2. Tetradepsipeptidy
   6.3. Polydepsipeptidy
7. Biologická aktivita
   7.1. Antibiotika
   7.2. Látky s antineoplastickým účinkem
   7.3. Fytotoxické sloučeniny
   7.4. Látky s antifungální aktivitou
   7.5. Insekticidní toxiny (destrukciny)
   7.6. Enzymové substráty
   7.7. Biodegradabilní nosiče

1. Úvod

Depsipeptidy jsou lineární nebo cyklické sloučeniny podobné peptidům, ve kterých je peptidická (amidická) vazba nahrazena vazbou depsipeptidickou (esterovou). Tato vzájemná podobnost obou struktur je odlišena rozdílnou chemickou reaktivitou a fyzikálně-chemickou povahou.

a) Depsipeptidická vazba je mnohem reaktivnější, tj. méně stabilní.

b) Enzymatické štěpení esterové vazby není výrazně selektivní jako je tomu u vazby peptidické. Esterová vazba je štěpena nespecificky jak esterázami tak i proteázami.

Podobně jako u peptidů, existují depsipeptidy v cyklických útvarech (zpravidla nejčastěji) od nejjednodušších sloučenin 2,5-morfolindionů (odpovídají cyklickým dipeptidům, 2,5-piperazindionům), přes tri-, tetra-, pentadepsipeptidy až po vyšší homology. Tyto sloučeniny jsou známy pozoruhodnými biologickými aktivitami (antifungální, protinádorová). Rozvoj chemie depsipeptidů náleží Šemjakinově škole. Izolací, stanovením struktury a jejich syntézou se značnou měrou zabývají také japonští autoři.

Kombinace esterové a amidické vazby je spojena s mnohými syntetickými problémy: selektivní chránění amino- a hydroxyskupin, optimalizace kondenzačních metod a minimalizování vedlejších reakcí. Sledování depsipeptidických struktur s cílem nových účinných farmak by mohlo být přínosem farmaceutické vědě.

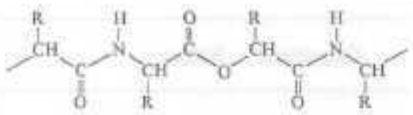
2. Charakteristika a rozdělení

Depsipeptidy jsou heterodetní heteromerní peptidy, u nichž je amidová vazba substituována vazbou esterovou. Heterokomponentou jsou bifunkční kyseliny a- nebo β-hydroxykyseliny. Amidová a esterová vazba jsou si strukturně velmi podobné. Hlavní rozdíly spočívají ve velikosti úhlu C'OC, který je o 10° menší (113°) než úhel C'NC (123°). Protože esterové seskupení neobsahuje vodík, který je přítomen v aminoskupině a hraje roli u sekundární struktury tvorby helixu pomocí vodíkové vazby mění se prostorové uspořádání depsipeptidů. Jak esterová tak i amidová vazba se vyskytují v *trans* planární konfiguraci[1]. Depsipeptidy mohou tvořit jak řadu lineární tak cyklickou (*I–III*).

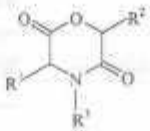
Nejnižším členem cyklických peptidických laktonů je 2,5-morfolindion (1,4-oxazin-2,5-dion), který je tvořen glycinem a α-hydroxyoctovou kyselinou. Jeho alkylované nebo arylované deriváty tvoří skupinu cyklických didepsipeptidů.

Analogicky k peptidům lze podle počtu komponent dělit depsipeptidy dále na tri-, tetra-, penta-, okta- až polydepsipeptidy.

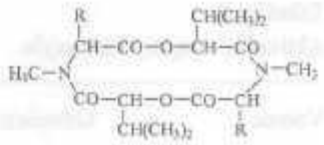
Většina těchto látek byla izolována z přírodních antibio-



I

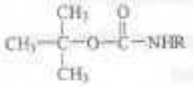
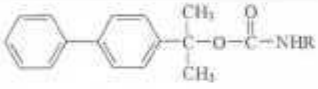
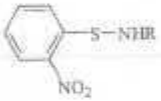
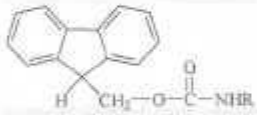
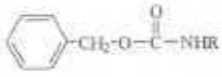
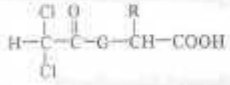


II



III

Tabulka I
Chránící skupiny pro amino- a hydroxyskupinu

Vzorec	Označení	Název
	Amino-	
	Boc	terc.butyloxykarbonyl
	Bpoc	bifenylisopropyloxykarbonyl
	Nps	*o*-nitrofenylsulfenyl
	FMOC	9-fluorenylmethoxykarbonyl
	Cbz-(Z)	benzyloxykarbonyl
	Hydroxy-	
	Dca	dichloracetyl

tik s cílem objasnit jejich aktivní komponentu, popř. připravit synteticky účinný derivát. Např. z kmene *Fusarium* byly izolovány lateritiin I a II, avenacein, sambucinin, a fruktigenin obsahující α-hydroxykyselinu isariin, serratamolid, esperin a pithomykolid obsahující |3-hydroxykyselinu[2].

3. Syntéza, chránící skupiny, kondenzační činidla a aktivační látky

Vzhledem k podobnosti struktury k peptidům jsou pro jejich přípravu používány některé metody peptidové chemie. Hydroxylová skupina je slabší nukleofil oproti aminoskupině a reakce zahrnující větší fragmenty jsou obvykle obtížnější než ty, které vycházejí z chráněných aminokyselin. Zavedení esterové vazby do řetězce později je méně úspěšné. Na druhé straně je esterová vazba labilnější než amidová a za některých podmínek peptidové syntézy je nestabilní. Z toho vyplývá, že je někdy obtížné připravit požadovaný depsipeptidový analog. K chránění je třeba vybrat takové skupiny, jejichž odbourávání není spojeno s rozštěpením depsipeptidové esterové vazby.

Při tvorbě dipeptidů je nutné chránit jak aminoskupinu tak i karboxylovou skupinu aminokyseliny. Obdobně je tomu u depsipeptidů. Zde je třeba chránit aminoskupinu a karboxylovou skupinu aminokyseliny a hydroxyskupinu nebo karboxylovou skupinu druhé komponenty - hydroxykyseliny a aktivovat karboxylovou skupinu.

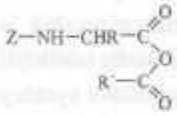
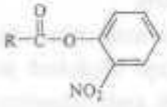
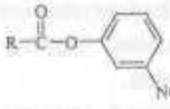
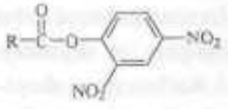
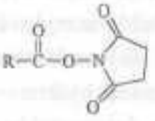
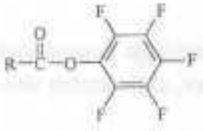
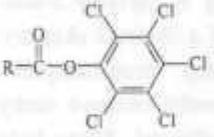
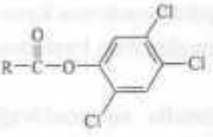
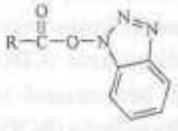
Chránící skupiny musí mít takové chemické vlastnosti, aby byly snadno odštěpitelné bez ovlivnění amidové nebo esterové vazby. K chránění aminoskupiny se nejčastěji používají skupiny uvedené v tabulce I. Karboxylová skupina se chrání převedením na ester nebo formou soli. Pro chránění hydroxyskupiny se osvědčila dichloracetylová skupina (Dca), která se snadno odstraní ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného a dovoluje zavést hydroxykyselinu do jakékoliv požadované pozice depsipeptidového řetězce[3].

Pro aktivaci karboxylové skupiny existuje neomezený výběr elektronakceptorových skupin tzv. aktivačních skupin (tabulka II).

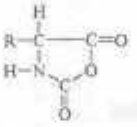
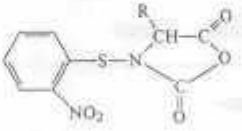
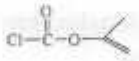
Leuchovy anhydridy a anhydrid N-karboxy-2-aminokyseliny jsou kombinací aktivující a chránící skupiny. 2-Nitrofenylsulfenyl-N-karboxyanhydridy α-aminokyselin (Nps-NCAs) mají výhodu v rychlé tvorbě esterové vazby rovněž s nechráněnými hydroxykyselinami. Takto byly připraveny depsipeptidy obsahující hydroxyoctovou kyselinu, mléčnou kyselinu a 2-hydroxyisovalerovou kyselinu, které byly dále polymerovány[4].

Jako nejběžnější kondenzační činidla se používají N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), diterc.butylpyrokarbonat $(Boc)_2O$ za katalýzy 4-N,N-dimethylaminopyridinu (DMAP) nebo pyridinu, karbonyldiimidazol (CDI) nebo z moderních kondenzačních činidel benzotriazol-1--yloxy-tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfat (BOP),

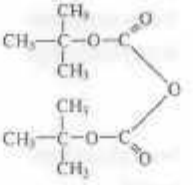
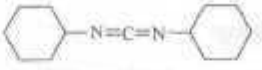
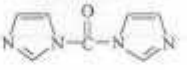
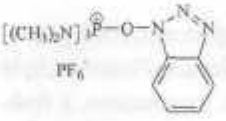
Tabulka II
Aktivační skupiny karboxylu

Vzorec	Označení	Název
		azidová
		anhydridová – směsné nesymetrické anhydridy
	R-CO-ONp	aktivní estery, nitrofenylestery, *p*-nitrofenylester
	R-CO-ONo	*o*-nitrofenylester
	R-CO-ONm	*m*-nitrofenylester
	R-CO-ODNp	2,4-dinitrofenylester
	R-CO-ONSu	N-hydroxysukcinimid ester
	R-CO-OPfp	pentafluorofenylester
	R-CO-OPcp	pentachlorofenylester
	R-CO-OPfp	2,4,5-trichlorfenylester
	HOBt	1-hydroxybenztriazol

Tabulka II - pokračování

Vzorec	Označení	Název
		Leuchovy anhydridy
	Nps-NCAs	aktivní anhydrid 2-nitrofenylsulfenyl--N-karboxanhydrid-α--aminokyseliny
		isoprenylchlorokarbonat

Tabulka III
Kondenzační činidla

Vzorec	Označení	Název
	Boc_2O	diterc.butylpyrokarbonat
	DCC	dicyklohexylkarbodiimid
	CDI	karbonyldiimidazol
	BOP	benzotriazol-1-yloxy--tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfat

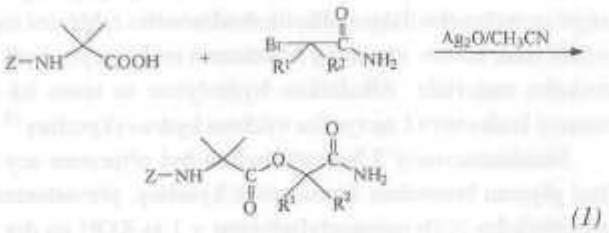
viz tabulka III. Při použití $(Boc)_2O$ byly získány dobré výtěžky. Metoda byla srovnána s metodou za použití dicyklohexylkarbodiimidu. V obou případech nedocházelo k racemizaci produktů[5].

Takto byly připraveny depsipeptidy: formyl-L-Val-L-Lac-OtBu, Z-L-Phe(4-NO_2)-L-Lac-OtBu.

Některé nedostatky byly odstraněny použitím nukleofilního katalyzátoru DMAP v N,N'-dicyklohexylkarbodi-

imidové metodě[6]. 4-Aminopyridiny byly shledány účinnějšími acylačními katalyzátory, mnohem lepšími než pyridin, zvláště při esterifikaci stericky bráněných alkoholů. Výhodou této metody jsou: mírné reakční podmínky (25 °C, dichlormethan), tak aby mohly být přítomny labilní chránící skupiny, poměrně krátká reakční doba a vysoké výtěžky také u stericky bráněných hydroxy- a karboxykomponent.

Pro tvorbu esterové vazby v modelu depsipeptidů byly použity 2-bromkarboxamidy obsahující primární, sekundární nebo tercinární halogen a nesubstituovanou nebo

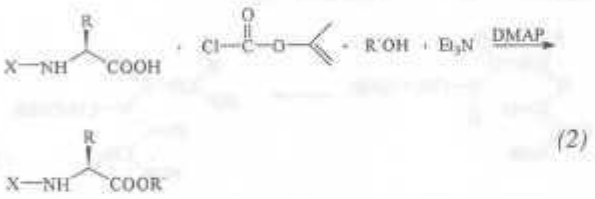


(1)

81–91 %

R^1 = H, Me

R^2 = H, CH_2-Ph



(2)

monosubstituovanou amidovou aminoskupinu. Za laboratorní teploty reagují s N-chráněnými aminokyselinami v přítomnosti ekvimolárního množství oxidu stříbrného za vzniku depsipeptidových analogů ve vysokých výtěžcích. Vedlejší reakce nebyly pozorovány[7-8] (7).

Jiné sloučeniny jako je acetát stříbrný, hydrid sodný, oxid barnatý nebo oxid měďný nebyly účinné, z reakcí byly získány výchozí sloučeniny.

Při přípravě antibiotika valinomycinu (dodekacyklodepsipeptid) bylo použito isoprenylchlorokarbonátu (IPCC) pro aktivaci karboxylu chráněné aminokyseliny za katalýzy 0,2 ekvivalentu DMAP (2).

Takto byly připraveny depsipeptidy D-Val-Lac a Val--D-Hiv, které byly spolu kondenzovány reakcí s benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylammo)phosphonium hexafluorofosfátem (BOP)[9].

1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) byl s úspěchem použit pro kondenzaci L-Leu-NH_2HCl s L-a-hydroxykapronovou kyselinou při přípravě peptolidových substrátů savčí kolagenasy[10].

Při řešení struktury valinomycinu a enniatinu byly připraveny depsipeptidy obsahující D-α-hydroxykyseliny[11]. Tyto depsipeptidy byly syntetizovány reakcí terc.butylesteru L-α-halogenkyselin získaných z L-aminokyselin s cesnými solemi N-chráněných aminokyselin. Při jejich kondenzaci došlo ke změně konfigurace hydroxykyseliny (schéma 1).

Úsilí o biosyntetickou přípravu antibiotik vedlo k přípravě depsipeptidových fragmentů také enzymovou cestou.

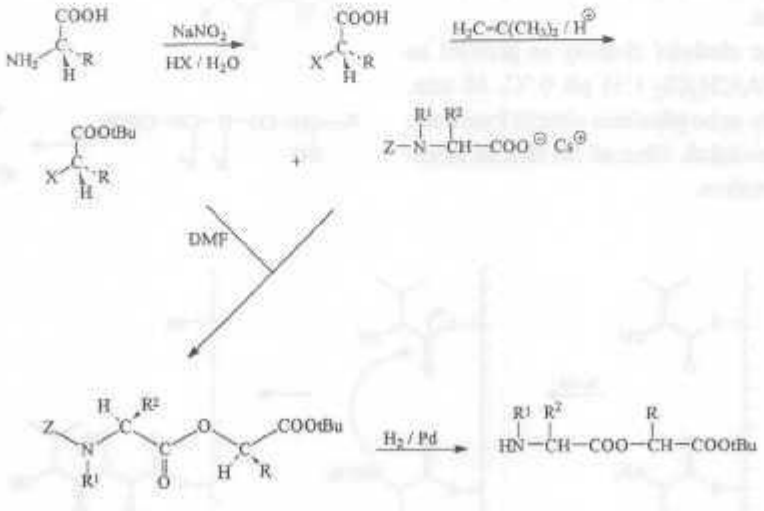


Schéma 1

(L) (D) (L) (D)

Například depsipeptid D-2-hydroxyisovaleryl-N-methyl-valin, stavební kámen antibiotik enniatinů, byl připraven biosynteticky jak ukazuje schéma 2 (cit. [12]).

Za kyselých podmínek je schopen podléhat intramolekulární kondenzaci za vzniku odpovídajícího morfolindionu.

Selektivní syntéza několika enniatinových homologů byla provedena částečně imobilizovaným enzymem enniatin syntetasou vázanou na propyl agarosu se 45 % účinností volného enzymu[13]. Takto byly připraveny rovněž depsipeptidy, které se v přírodním materiálu nevyskytují.

4. Vedlejší reakce

Skupina kolem Goodmana[14–16] se zabývala syntézou depsipeptidů jako analogů kolagenu a elastinu s cílem zodpovězení otázky, zda zavést esterovou vazbu do řetězce dříve či později. Uvedení autoři zjistili, že esterová vazba u depsipeptidů je nestabilní za podmínek acetylace a aminolýzy a dochází při ní pravděpodobně k intramolekulární acylační reakci (3).

Další vedlejší reakcí je β-eliminace. Přidáme-li terciární bázi nebo aminokomponentu, hraje tato roli v E_2. β-Vodík u hydroxyisovalerové kys. (Hiv) je eliminován a vazba O-Cα je štěpena. Tato reakce vede k uvolnění karboxylátového iontu, což u peptidů neexistuje, tam se uvolňuje $RCONH^-$ *(4)*.

Kondenzace přes DCC/HOBt nebo přes hydroxysukcinimid aktivní ester je také určitý typ aminolýzy esteru. Dvě aminolýzy spolu soutěží a když je reakce provedena pomalu, převládá štěpení.

Kyselé uvolnění Boc chránící skupiny se provádí za mírných podmínek (TFA/CH_2Cl_2 1:1) při 0 °C, 10 min. Prodloužení reakční doby nebo působení silnější kyselinou vede ke vzniku směsi produktů. Obecně lze říci, že záleží na rychlosti provedené reakce.

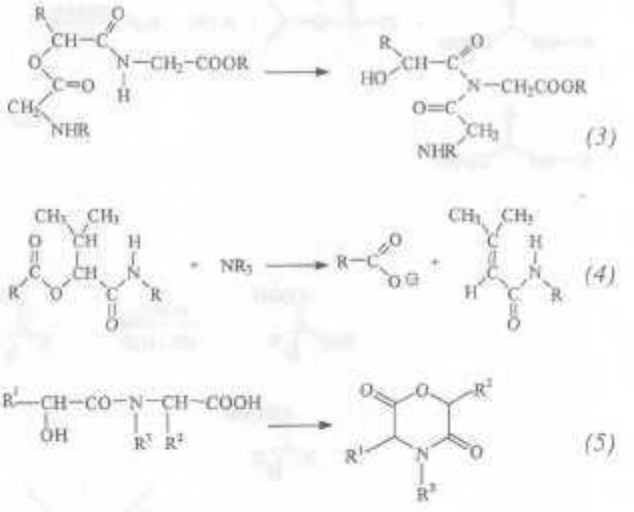
5. Didepsipeptidy, lineární, cyklické, příklady syntéz

Zájem o deriváty 2,5-morfolindionů souvisí s izolací přírodních antibiotik. Cook, Cox a Farmer[17] referovali o antibiotiku latericinu I, produkovaném houbou *Fusarium lateritium*, který byl převeden působením hydroxidu sodného na hydroxykyselinu, spontánně cyklizující na lakton (5).

Syntetický přístup vycházel z (-)-a-bromoisovalerychloridu a N-methyl-D,L-valinu. Vzniklý depsipeptid poskytl za sníženého tlaku a několikahodinového zahřívání na vodní lázni lakton, identický s laktonem izolovaným z přírodního materiálu. Alkalickou hydrolýzou se tento laktonový kruh otevírá za vzniku výchozí hydroxykyseliny[18].

Nesubstituovaný 2,5-morfolindion byl připraven acylací glycinu bromidem bromoctové kyseliny, převedením rezultujícího N-(bromoacetyl)glycinu v 1 M-KOH na draselnou sůl[19] (schéma 3).

Bezvodá sůl N-(bromoacetyl)glycinu byla cyklizována zahříváním na 180–200 °C při tlaku menším než $1{,}3.10^{-5}$ kPa (cit. [20]). Obdobně byl připraven 6-methyl-2,5-morfolindion[21] a některé další deriváty[22].



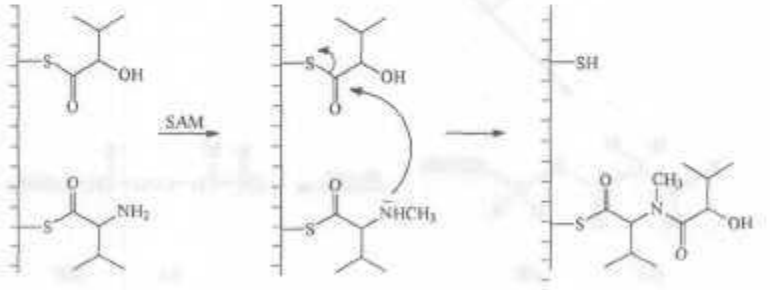


Schéma 2

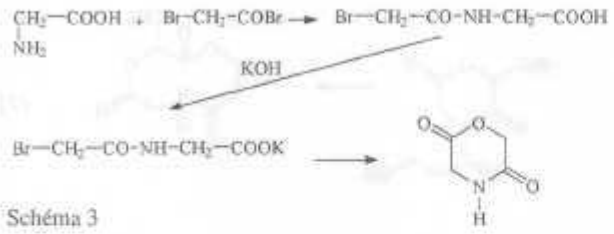


Schéma 3

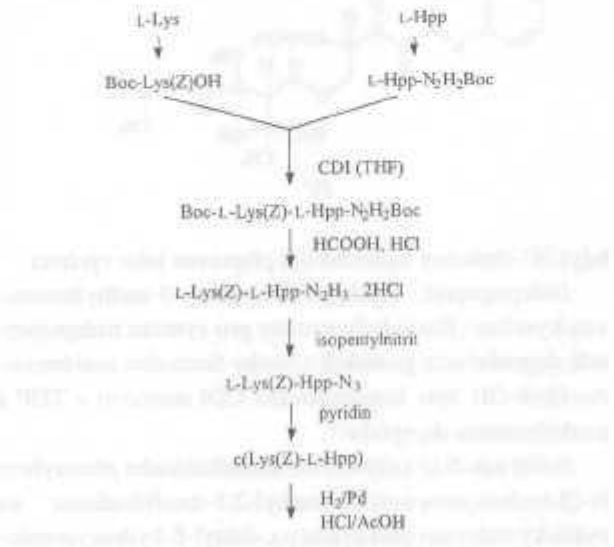
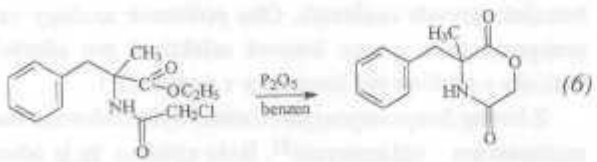


Schéma 4

Syntéza substituovaných 2,5-morfolindionů vycházela z různě substituovaných α'-bromacyl-α-aminokyselin, připravených metodou podle Fischera a Schenkela[23] reakcí soli aminokyseliny s chloridem kyseliny v ledovém vodném roztoku za přítomnosti přebytku alkálií nebo vhodněji třepáním chloridu kyseliny se dvěma ekvivalenty aminokyseliny suspendované v chloroformu.

Převedením na sodnou sůl a zahříváním na teplotu 150–200 °C za tlaku $1{,}3.10^{-5}$ kPa rezultovaly cyklické 2,5-morfolindiony. Laktonizace je považována za S_N2 (cit. [24]). Kdyby probíhala S_N1 mechanismem, kdy dochází v prvním stupni k ionizaci Br jako určujícího kroku reakce, byl by tento krok nezávislý na sterické konfiguraci molekuly. Alkylsubstituenty ovlivňují laktonizaci dvojím způsobem. Díky jejich +I efektu se snadněji uvolňuje bromidový anion, ale sterickým bráněním dochází ke zpomalování reakce. U aminokyselin elektronový efekt převažuje,



(6)

takže valinový derivát laktonizuje rychleji než norvalinový a substituované N-isopropylaminokyseliny laktonizují rychleji než N-methylaminokyseliny. Jestliže však je alkylová skupina vázána na uhlík, na němž je také vázán brom, hraje důležitou úlohu naopak sterický efekt, což je pochopitelné, protože při S_N2 v tranzitním stavu má uhlík pět substituentů ve svém okolí, takže objemné substituenty způsobují retardaci substituce. N-(a-hydroxyisovaleryl)sarkosin laktonizuje už stáním při 20 °C, kdežto N-hydroxyacetyl-N-methylvalin destilací ve vakuu. Otevírání laktonového kruhu za vzniku N-hydroxylacylaminokyselin bylo provedeno ve vodě na vroucí lázni během 30 minut.

3-Benzyl-3-meťhyl-2,5-morfolindion byl připraven Bischlerovou-Napieralskiho reakcí z ethyl-α-methyl-α-chloroacetamido-β-fenylpropionátu jako potenciální trypanocidum[25] (6).

Reakcí N(bromoacetyl)-L-fenylalaninu s oxidem stříbrným v dioxanu při laboratorní teplotě byl připraven L-3--benzyl-3-methyl-2,5-morfolindion jako chymotrypsinový substrát[26].

Trypsin hydrolyzuje peptidovou vazbu obsahující karbonylovou skupinu L-lysinu a L-arganinu, avšak nehydrolyzuje peptidovou vazbu cyklických dipeptidů, jako je c(L--Lys-L-Phe) a c(L-Lys-Gly), i když obsahují lysinový zbytek v molekule. Je dobře známo, že trypsin hydrolyzuje esterovou vazbu daleko rychleji než peptidovou vazbu, proto byly připraveny 4 stereoizomery c(Lys-Hpp), kde Hpp = 2-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina (LL, LD, DL, DD) a c(Trp-Hmp), kde Hmp = 2-hydroxy-4-meťhylpentanová kyselina (LL, LD, DL, DD) jako substráty proteolytických enzymů[27–28].

Syntéza c(L-Lys-L-Hpp).HCl (cit. [29]) vycházela z kondenzace chráněného terc.butyloxykarbonyl-L-lysinu (Boc--L-Lys(Z)-OH) s N,N'-karbonyldiimidazolem (CDI) a terc.butyloxykarbonylhydrazinem L-hydroxy-3-fenylpropanové kyseliny (H-L-Hpp-N_2H_2Boc) v tetrahydrofuranu. Terc.butyloxykarbonylová skupina byla odbourána 3 hod. stáním v 99 % mravenčí kyselině. Přidáním 2 M-HCl/ethylacetát byl převeden hydrazin na hydrochlorid. K cyklizaci byla použita azidová metoda, protože běžná metoda pro přípravu cyklických dipeptidů (tj. působením methanolického amoniaku) může způsobit rozštěpení laktonového kruhu. Hydrogenace c(L-Lys(Z)-L-Hpp) v obvyklých alkoholických nebo vodných rozpouštědlech dává nízké výtěžky vzhledem k nestabilnímu šestičlennému laktonovému kruhu. Vedlejší reakce jsou potlačeny zkrácením doby redukce, použitím octové kyseliny jako rozpouštědla a velkého množství Pd černi jako katalyzátoru viz schéma 4.

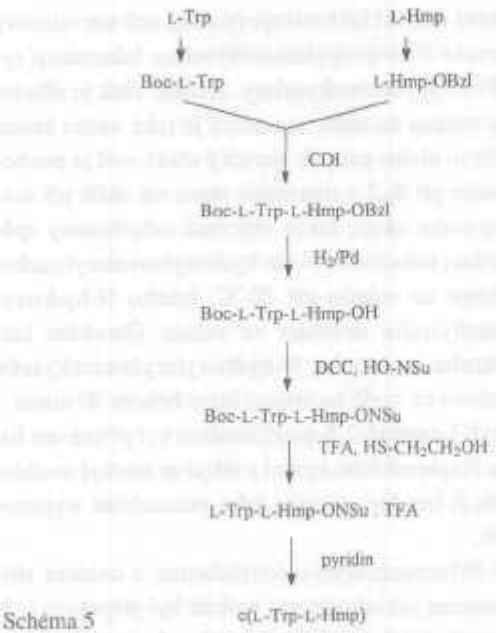


Schéma 5

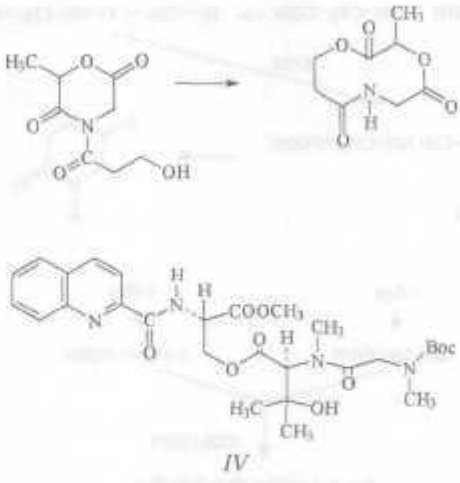
Cyklické didepsipeptidy obsahující tryptofan a hydroxykyselinový analog lysinu 2-hydroxy-4-methylpentanovou kyselinu (Hmp) byly připraveny podle schématu 5.

L-2-Hydroxy-4-methylpentanová kyselina byla esterifikována benzylalkoholem a vzniklý ester kondenzován s terc.butyloxykarbonyltrypofanem působením N,N'-karbonyldiimidazolu v suchém tetrahydrofuranu. Po uvolnění karbolylové skupiny hydrogenací na Pd černi byla převedena na aktivní N-hydroxysukcinimidový derivát, který byl po acidolýze trifluoroctovou kyselinou s přídavkem 2 % β-merkaptoethanolu cyklizován v pyridinu[30].

6. Tri-, tetra- až polydepsipeptidy

6.1. Tridepsipeptidy

Tripeptolidový typ hydroxyacylaminokyseliny byl syntetizován buď z hydroxyacylaminokyselin a aminokyselin nebo z hydroxykyselin a aminoacylaminokyselin. Pro aktivaci hydroxykyselin byla použita azidová a karbodiimidová metoda, ne však anhydridová metoda. Hydraziny byly získány z esterů hydrazinolýzou nebo volných karboxylových kyselin kondenzací s karbobenzoxyhydrazinem, *p*-nitrokarbobenzoxyhydrazinem nebo terc.butyloxykarbonylhydrazinem působením dicyklohexylkarbodiimidu. Aminoacylhydroxyacylaminokyseliny byly syntetizovány z výchozích N-chráněných aminoacyl-hydroxykyselin metodou směsných anhydridů. Azidová metoda byla aplikována, když N'-chráněný hydrazid byl připraven jako výchozí.



(7)

IV

Didepsipeptidy obsahující 2-hydroxy-3-methylbutanovou kyselinu (Hmb) byly využity pro syntézu tridepsipeptidů degradačních produktů z houby *Sarcodon scarbrosus*. Ac-Hmb-OH byla kondenzována CDI metodou v THF s methylesterem dipeptidu[31].

Polští autoři se zabývali intramolekulárním přesmykem N-(j3-hydroxypropionyl)3-methyl-2,5-morfolindionu na cyklický tridepsipeptid cyklo(D,L-laktyl-β-hydroxypropionyl-glycyl)[32] (7).

Při studiu aktivního tripeptidu luzopeptinu C (obsahové látky antibiotika luzopeptinu izolovaného z *Actinomadura luzonenzis)* byl připraven modelový depsipeptidový segment jako potenciální protinádorové a protivirové antibiotikum, který je perspektivní v terapii AIDS (cit. [33]).Tento modelový tripeptidový fragment obsahuje N-methyl-3-hydroxyvalin, serin vázaný na 2-chinolinkarboxylovou kyselinu *(IV).*

6.2. Tetradepsipeptidy

Konformačními a ionoforickými vlastnostmi valinomycinových analogů cyklo [(D-Val-L-Pro-L-Val-D-Hyi)$_4$], kde Hyi = -OCH(CHMe$_2$)CO- a cyklo [(D-Val-L-Lac-L-Val-D--Pro)$_4$] se zabývala skupina kolem Ovčinnikova[34]. Zjistili, že záměnou L-Lac za L-Pro dochází k *cis*-konfiguraci terciární vazby v jakémkoli polárním rozpouštědle. Tyto konformery nebyly nalezeny ani ve valinomycinu ani v jeho hexadekanových analozích. Oba prolinové analogy valinomycinu jsou vysoce iontově selektivní pro alkalické kationty a tvoří s nimi komplexy v poměru 2:1.

Z houby *Streptomyces fulvissimus* bylo izolováno další antibiotikum - valinomycin[35]. Bylo zjištěno, že je účinný

in vitro proti *Mycobacterium tuberculosis*. Je příkladem cyklické sloučeniny, ve které je zastoupen opticky aktivní α-hydroxykyselinový zbytek α-aminokyselinovým zbytkem.

Při totální hydrolýze valinomycinu se ukázalo, že toto antibiotikum je složeno ze 2 molekul L-valinu a D-valinu, L-mléčné kyseliny a 2 molekul D-α-hydroxyisovalerové kyseliny.

Dalším antibiotikem je enniatin B (cit. [17]), ze kterého při alkalické hydrolýze vzniká vedle odpovídajícího laktonu D-α-hydroxyisovaleryl-N-methyl-(+)-valin i 4-methyl-3,6-diisopropyl-2,5-morfolindion, zatímco při kyselé hydrolýze vznikají 2 moly N-methyl-(+)-valinu a 2 moly D-a-hydroxyisovalerové kyseliny. Na základě toho bylo chemické složení enniatinu B objasněno jako cyklická sloučenina s 12 členným kruhem.

Strukturou antibiotik odvozených od enniatinu B se zabývala také skupina Šemjakina a Ovčinnikova[36]. Syntetizovali cyklotetradepsipeptid, obsahující D-α-hydroxyisovalerovou kyselinu a N-methyl-L-isoleucinový nebo N--methyl-L-valinový zbytek.

Kondenzací *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-isoleucinu, *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-valinu nebo *p*-nitrobenzyloxykarbonyl-N-methyl-L-leucinu s terc.butyl--D-α-hydroxyisovaleratem anhydridovou metodou (benzensulfonylchlorid v pyridinu) poskytne odpovídající estery, z nichž podle schématu 3 byly získány odpovídající tetradepsipeptidy. Žádný ze získaných cyklotetradepsipeptidů však nevykázal aktivitu vůči *Mycobacterium phlei* v koncentraci do 100 y/ml, zatímco enniatin A je aktivní v koncentraci 1–1,25γ/ml a enniatin B v koncentraci 3 y/ml (schéma 6).

Dále bylo připraveno 35 cyklických analogů enniatinu A, B a C a beavericinu, lišících se od přírodních antibiotik velikostí kruhu, konfigurací zbytků kyselin a N-methylovými skupinami za účelem studia jejich antimikrobiální aktivity[37].

6.3. Polydepsipeptidy

V posledních letech se objevuje celá řada prací, týkajících se přípravy polydepsipeptidů[10,38]. Vzhledem k tomu, že poly(a-hydroxykyseliny) a poly(a-aminokyseliny) mají velký význam pro medicinální použití jako chirurgický materiál, snadno absorbovatelný, vhodných mechanických vlastností, bez tvorby toxických produktů, byla věnována pozornost polydepsipeptidům - kopolymerům a-aminokyselin a α-hydroxykyselin, které mohou být vhodnou modifikací snadno vstřebatelného materiálu. Protože obsahují

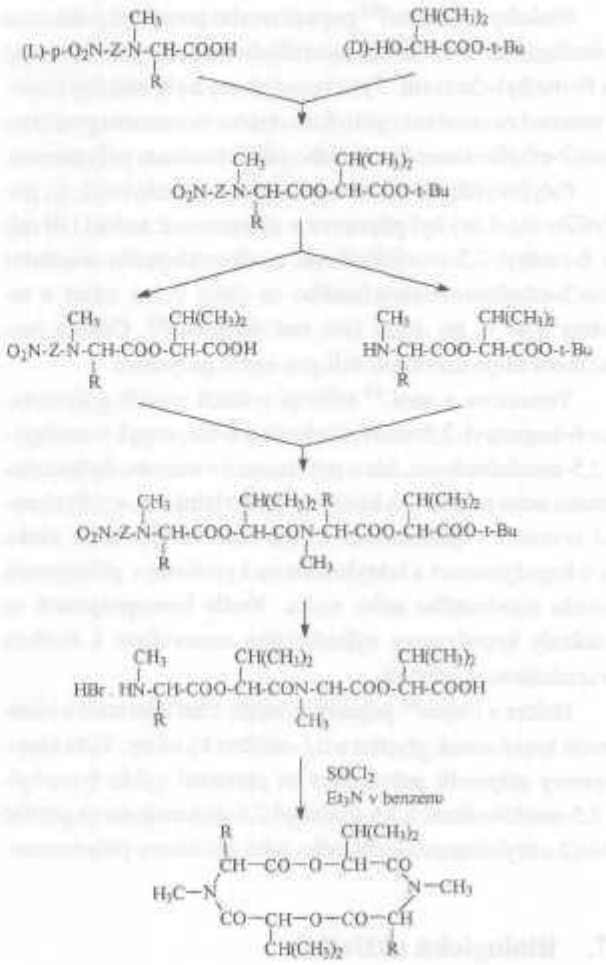
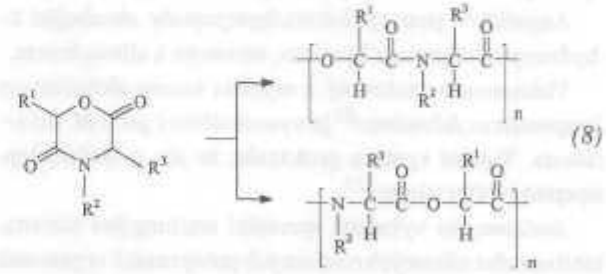


Schéma 6

vedle peptidové vazby i vazbu esterovou, jejich degradace bude odlišná od degradace homopolymerů.

Polydepsipeptidy s opakující se jednotkou [-Ala-Lac- a -Val-Lac-] byly připraveny v 50-75 % výtěžcích termickou polymerací pentachlorofenylesteru trifluoroacetátových solí L-alanyl-L-laktyl-L-alanyl-L-mléčné kyseliny a L-valyl-L-laktyl-L-valyl-L-mléčné kyseliny[39,40].

Další přístup k syntéze polydepsipeptidů je založen na polymerizaci za otevírání cyklických 2,5-morfolindionových derivátů [41] (*8*).



(*8*)

Shakaby a Koelmel[42] popsali tvorbu polymerů *p*-dioxanu obsahujících 1-15 % 2,5-morfolindionu nebo jeho 3-methyl a N-methyl-derivátů. Tyto kopolymery byly získány kopolymerací za otevření cyklického kruhu monomeru použitím bis(2-ethylhexanoatu)cínatého jako iniciátoru polymerace.

Poly[oxyethylidenkarbonylimino(2-oxoethylen)], tj. poly(Gly-D,L-Lac) byl připraven v silanizované trubici (10 ml) z 6-methyl-2,5-morfolindionu a odpovídajícího množství bis(2-ethylhexanoatu)cínatého za tlaku 0,7-1 mbar a teploty 130 °C po dobu více než 40 hodin[43]. Čistota monomeru hraje důležitou roli pro vznik polymeru.

Yonezawa a spol.[44] referují o třech typech polymerace 6-isopropyl-2,5-morfolindionu a 6-isopropyl-4-methyl--2,5-morfolindionu. Jde o polymeraci v roztoku dichlormethanu nebo toluenu za katalýzy diethylzinkem, o polymeraci tavením v přítomnosti oxidu zinečnatého nebo zinku a o kopolymeraci s laktylmléčnou kyselinou v přítomnosti oxidu zinečnatého nebo zinku. Vedle homopolymerů se ukázaly kopolymery výhodnějším materiálem s širokou variabilitou vlastností.

Helder a Feijen[45] popisují syntézu, charakterizaci a vlastnosti kopolymerů glycinu a D,L-mléčné kyseliny. Tyto kopolymery připravili polymeraci za otevírání cyklu 6-methyl--2,5-morfolindionu a 3,6-dimethyl-2,5-dioxandionu za použití bis(2-ethyloktanoatu)cínatého jako iniciátoru polymerace.

7. Biologická aktivita

Depsipeptidy mohou selektivně zasahovat do aktivního přenosu alkalických kovů[46] přes buněčné membrány a mají antibiotické vlastnosti, které se najejich komplexotvorných vlastnostech mohou zakládat.

7.1. Antibiotika

Lateritiin I a jemu příbuzné látky inhibují růst mykobakteria a vykazují slabou aktivitu vůči zlatému stafylokoku[18].

Enniatiny A, B, C[47-50], izolované z hub rodu *Fusarium* vykazují rovněž aktivitu proti mykobakteriím.

Angolidy[51] jsou cyklotetradepsipeptidy obsahující L--hydroxyisovalerovou kyselinu, isoleucin a alloisoleucin.

Valinomycin izolovaný z mycelia kmene aktinomycet *Streptomyces fulvisimus*[52] je vysoce účinný proti *M. tuberculosis*. Totální syntéza prokázala, že jde o dodekadepsipeptid tvořící trimery[53].

Amidomycin vykazuje speciální antifungální aktivitu. Inhibuje růst některých rostlinných patogenních organismů a některých kvasinek. Jedná se o cyklooktadepsipeptid se střídající se D-α-hydroxyvalerovou kyselinou a D-valinem[54].

Sporidesmolidy[55,56] jsou metabolickými produkty houby *Sporidesmium bakteri*. Obsahují opakující se sekvenci dvou aminokyselin a jedné hydroxykyseliny.

Salinamidy A, B byly jako cyklické depsipeptidy izolovány z mořských bakterií rodu *Streptomyces* a jsou aktivní vůči Gram-pozitivním bakteriím[57].

7.2. Látky s antineoplastickým účinkem

Didemniny, izolované z rodu *Didemnidae* vykazují rovněž antivirovou a imunosupresivní aktivitu[58-61]. Inhibují replikaci RNA a DNA viru, chrání např. myš proti P388 leukemii a B16 melanomu. Jsou vysoce toxické oproti L1210 leukemii buněk. Jako inhibitory proliferace lymfocytů jsou 1 000x účinnější než cyklosporin A (cit. [62]). Nižší analoga didemninů vykazují rovněž cytotoxickou aktivitu[63].

Actinomycin D je inhibitorem syntézy DNA. Tvoří s DNA komplexy, které inhibují DNA dependentní, RNA--polymerasu a blokují tak tvorbu mRNA (cit. [64]). Inhibuje replikaci virů[65-67]. Dolastiny jsou buněčné růstové inhibitory izolované z *Dolabella auricularia*. Inhibují růst PC leukemie[68-70].

7.3. Fytotoxické sloučeniny

AM Toxiny - cyklotetradepsipeptidy, které způsobují skvrny na listech jabloní[71]. BZR toxiny jsou produkovány *Bipolaris zeicola*. Způsobují skvrny na listech kukuřice a rýže[72].

7.4. Látky s antifungální aktivitou

Geodiamolid A a jaspamid byly izolovány z mořských hub, mají rovněž cytotoxickou aktivitu[73]. Aureobasidiny produkované Aureobasidium pullulans jsou složeny z osmi aminokyselin a jedné hydroxykyseliny (2-hydroxy-3-methylpentanové). Jsou aktivní vůči *Candida sp.* a *Cryptococcus*[74].

Halicylindramidy A-C tetradepsipeptidové struktury vykázaly aktivitu vůči *Mortirella ramanniana* a také P388 leukemii[75].

7.5. Insekticidní toxiny (destrukciny)

Entomogenní houby produkující insekticidní toxiny jsou zdrojem nových toxoforů. Z *Metharcium anisopliae*

var. *major* byly izolovány destrukciny A_3, F (cit. [76]), *desmethyldestrukciny A* a C, které obsahují ve své molekule 2,4-dihydroxypentanovou kyselinu.

Nemacidní cyklodepsipeptidy označené jako bussaphelocidy A a B obsahují 2-hydroxy-3-methylpentanovou kyselinu[77].

7.6. Enzymové substráty

Z různých mikroorganismů byly izolovány inhibitory trypsinu, tzv. mikropeptiny[78], chymotrypsinu[26], substráty β-laktamas[79-82] a substráty karboxypeptidasy[83,84].

7.7. Biodegradabilní nosiče

Polydepsipeptidy byly připraveny jako biodegradabilní nosiče aktivních látek především pro pohlavní hormony a kortikoidy[85]. Tyto nosiče byly použity také k potahování tablet a mikrotobolek, vzhledem k jejich stálosti vůči kyselému prostředí žaludku. K uvolnění účinných látek dochází teprve ve střevě po odbourání polydepsipeptidu[86].

Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/95/1483.

LITERATURA

1. Simmoneta M., Carra S.: *The Chemistry of Carboxylic Acids and Esters* (Patai S., ed.). Interscience 1, New York 1969.
2. Schröder E., Lübke K.: *The Peptides,* Sv. II., str. 376. Academia Press, New York 1966.
3. Katakai R.: J. Chem. Soc„ Chem. Commun. *1988,* 1229.
4. Katakai R.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I *1987,* 2249.
5. Pozdněv V. F.: Bioorg. Chim. *11,* 725 (1985).
6. Gilon Ch., Klausner Y.: Tetrahedron Lett. *40,* 3811 (1979).
7. Cavicchioni G.: Tetrahedron Lett. *28,* 2427 (1987).
8. Cavicchioni G., D'Angeli F., Casolari A., Orlandini P.: Synthesis *12,* 947 (1988).
9. Zeggaf Ch., Poncet J., Jouin P., Dofour M. N., Castro B.: Tetrahedron *45,* 5039 (1989).
10. Weingarten H. I.: GB 2 188 946 (1983); Chem. Abstr. *100,* 156 991 t (1984).
11. Lerchen H. G., Kunz H.: Tetrahedron Lett. *26,* 5257 (1985).
12. Zocher R., Keller U., Kleinkauf H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *110,* 292 (1983).
13. Madry N., Zocher R., Grodzki K., Kleinkauf H.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *20(2),* 83 (1984).
14. Goodman M., Venkatachalapathi Y. V., Mammi S., Katakai R.: J. Biosci *8(1-2),* 223 (1985).
15. Arad O., Goodman M.: Biopolymers *29,* 1633(1990).
16. Arad O., Goodman M.: Biopolymers *29,* 1651 (1990).
17. Cook A. H., Cox S. F., Farmer T. H.: Nature *162,*61 (1948).
18. Cook A. H., Cox S. F., Farmer T. H.: J. Chem. Soc. *1949,* 1022.
19. Hwang, Seung Sang, Hong Sung Il, Choi Nam Suk: Hanguk Sumyu Konghkakhoe Chi *18,* 200 (1981).
20. Shakaby S. W., Koelmel D. F.: EP 86 613 (1983).
21. Chadwick A. F., Pascu E.: J. Am. Chem. Soc. *65,* 392 (1943).
22. McGee J., Ritchie P. D.: J. Chem. Soc. *1961,* 1782.
23. Fischer, Schenkel: Ann. *354,* 13 (1907).
24. Cook A. H., Cox S. F.: J. Chem. Soc. *1949,* 2347.
25. Das M., Chaudhuri S., Chakravorti S. S.: Indian J. Chem. Sect B 245, 1302 (1985).
26. Rumsh L. D., Volkova L. I., Antonov V. K.: FEBS Lett. *9(2),* 64(1970).
27. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Hayashi Kumiji, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: Pept. Chem. *1978,* 161.
28. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: FEBS Lett. *100,* 241 (1979).
29. Yasutake Akira, Miyazaki Koichi, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumiya Nobuo: Int. J. Pept. Protein Res. 76,61 (1980).
30. Miyazaki Koichi, Yasutake Akira, Nishino Norikazu, Aoyagi Haruhiko, Kato Tetsuo, Izumira Nobuo: Int. J. Pept. Protein Res. *17(1),* 118 (1981).
31. Tomida I., Maekita T., Hatanaka A.: Biosci. Biotech. Biochem. *59(12),* 2300 (1995).
32. Kazmierczak R., Kupryszewski G.: Rozc. Chem. *41(1),* 103 (1967).
33. Ciufolini M. A., Swaminathan S.: Tetrahedron Lett. 30,3027(1989).
34. Balašova T. A., Fonina L. A., Senjavina L. B., Starovojtova N. V., Avotina G., Ivanov V. T., Ovčinnikov J. A.: Bioorg. Chim. *10,* 437 (1984).
35. Brockmann H., Geeren H.: Justsus Liebigs Ann. Chem. *603,* 216(1957).
36. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A.: Tetrahedron *19,* 581 (1963).

37. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Michaljeva I. I., Rjabova I. D.: Zh. Obshch. Khim. *42(10),* 2320 (1972).
38. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura: Makromol. Chem., Rapid Commun. 77, 337 (1990).
39. Nissen D., Gilon Ch., Goodman M.: Makromol. Chem. Suppl. *1*, 23 (1975).
40. Nissen D., Goodman M.: Nachr. Chem. Tech. Lab. 25, 516(1977).
41. Helder J., Kohn F. E., Sato S., Van den Berg J. W., Feijen J.: Makromol. Chem., Rapid Commun. *6, 9* (1985).
42. Shakaby W., Koelmel D.: Eur. Pat. EP 80613 (1983).
43. Helder J., Kohn F. E., Sato S., Van den Berg J. W., Feijen J.: Adv. Biomat. 6, 245 (1986).
44. Yonezawa N., Toda F., Hasegawa M.: Makromol. Chem., Rapid Commun. *6,* 607 (1985).
45. Helder J., Feijen J., Lee S. J., Kim S. W.: Makromol. Chem., Rapid Commun. 7, 193 (1986).
46. Kunz H., Lerchen H. G.: J. Am. Chem. Soc. *111*, 6335 (1989).
47. Plattner P. A., Nager N., Boiler A.: Helv. Chim. Acta *31*, 665, 2192 (1948).
48. Gäumann E., Roth S., Etllinger L., Plattner P. A., Nager N.: Experientia *3,* 202 (1947).
49. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Kirjuškin A. A., Ivanov V. T.: Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. *1965,* 1623.
50. Šemjakin M. M., Vinogradova E. I., Fejgina M. I, Aldanova N. A., Ovčinnikov J. A., Kirjuškin A. A.: Zh.. Obshch. Khim. *34,* 1782 (1964).
51. McDonald C. G., Shannon J. S.: Tetrahedron Lett. *1964*, 3113.
52. Šemjakin M. M., Vinogradova E. I., Fejgina M. J., Aldanova N. A.: Tetrahedron Lett. *1963,* 351.
53. Dory I. L,, Mellor J. M.: Tetrahedron Lett. *30,* 1695 (1989).
54. Taber W. A., Vinning L. C: Can. J. Microbiol. *3,* 953 (1957).
55. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A., Chalilulina K. Ch.: Zh. Obshch. Khim. *35,* 1399(1965).
56. Šemjakin M. M., Ovčinnikov J. A., Ivanov V. T., Kirjuškin A. A.: Tetrahedron *19,* 995 (1963).
57. Trischman J. A., Tapiolas D. M., Jensen P. R., Dwight R., Fenical W., McKee T. C, Ireland Ch. M., Stout T. J., Clardy J.: J. Am. Chem. Soc. *116,* 757 (1964).
58. Rinehart K. L., Kishore V., Bible K. C, Sakai Ryuichi, Sullins D. W., Li Kai Ming: J. Nat. Prod. *51,* 1 (1988).
59. Rinehart K. L.: US 5,294,603, (1994).
60. Rinehart K. L.: Bioact. Compd. Mar. Org. Indo - U.S. Symp. *1989,* 301.
61. Searle M. S., Hall J. G., Kyratzis I., Wakelin P. G.: Int. J. Peptide Protein Res. *34,* 445 (1989).
62. Rinehart K. L., Sakai Ryuichi, Stroh J. G.: US 4,948,791 (1990).
63. Furukubo Shigeru, Hamada Yasumasa, Shiori Takayuki: Pept. Chem. 1992, Proc. Jpn. Symp., 2nd (1992).
64. Chu Wenhua, Shinomiya Miho, Kamitori Kazuyo Y., Kamitori Shigehiro, Carlson R. G., Weaver R. F., Takusagawa Fusao.: J. Am. Chem. Soc. *116,* 7971 (1994).
65. Kamitori Shigehiro, Takusagawa Fusao: J. Mol. Biol. 225,445(1992).
66. Kamitori Shigehiro, Takusagawa Fusao: J. Am. Chem. Soc. *116*, 4154 (1994).
67. Takusagawa Fusao: J. Antibiot. *38,* 1596 (1985).
68. Pettit G. R., Kamano Yoshiaki, Kizu Haruhisa, Dufresne C, Herald Ch. L., Bontems R. J., Schmidt J. M., Boettner F. E., Nieman R. A.: Heterocycles *28,* 553 (1989).
69. Pettit G. R., Kamano Yoshiaki: EP 399,685 (1990).
70. Kamano Yoshiaki, Kizu Haruhisa, Pettit G. R., Dufresne C, Herald D. L., Herald Ch. L., Schmidt J. M., Cerny R. L.: Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu *31*, 641 (1989).
71. Ueda Kazuo, Waki Michinori, Teruya Yoshio, Izumiya Nobuo: Bull. Chem. Soc. Jpn. *62,* 1635 (1989).
72. Ueda K., Nakatsuka S.: Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu *33,* 659 (1991).
73. Imaeda Takayuki, Hamada Yasumasa, Shiori Takayuki: Tetrahedron Lett. *35*, 591 (1994).
74. Yoshikawa Yoshie, Ikai Katsushige, Umedi Yoshihisa, Ogawa Atsuko, Takesako Kazuto, Kato Ikunoshi, Naganawa Hiroshi: J. Antibiot. *46,* 1347 (1993).
75. Li Hong-yu, Matsunaga Shigeki, Fusetani Nobuhiro: J. Med. Chem. *38*, 338 (1995).
76. Wahlman M., Davidson B. S.: J. Nat. Prod. *56,* 643 (1993).
77. Kawazu Kazuyoshi, Murakami Tadashi, Ono Youko, Kanzaki Hiroshi, Kobayashi Akio, Mikawa Takashi, Yoshikawa Nobuji: Biosci., Biotechnol., Biochem. *57,* 98 (1993).

78. Okino Tatsufumi, Murakami Mashiro, Haraguchi Ryo, Munekata Hideaki, Matsuda Hisashi, Yamaguchi Katsumi: Tetrahedron Lett. *34*, 8131 (1993).
79. Pazhanisamy S., Pratt R. F.: Bichemistry *28*, 6870 (1989).
80. Govardhan Ch., Pratt R. F.: Bichemistry *26*, 3385 (1987).
81. Dryjanski M., Pratt R. F.: Bichemistry *34*, 3561 (1995).
82. Pazhanisamy S., Pratt R. F.: Bichemistry *28*, 6875 (1989).
83. Wright G. D., Molinas C., Arthur M., Courvalin P., Walsh Ch. T.: Antimicrob. Agents Chemother. *36*, 1514(1992).
84. Martin M. T., Holmquist B., Riordan J. F.: J. Inorg. Biochem. *36*, 39 (1989).
85. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura: J. Biomed. Mater. Res. *24*, 1173 (1990).
86. Masaru Yoshida, Masaharu Asano, Minoru Kumakura, Ryoichi Katakai, Tooru Mashimo, Hisako Yuasa, Hidetoshi Yamanake: Eur. Polym. J. *27*, 325 (1991).

J. Vinšová[a] and E. Kasafírek[b] *([a]Faculty ofPharmacy, Charles University, Hradec Králové, [b]Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague):* **Biologically Active Depsipeptides**

The review on contemporary knowledge of the group of depsipeptides. A hydroxy acid unit incorporated in a peptide chain is very similar to an amino acid unit. The ester bond is more labile than amide bond and may prove unstable in the usual conditions of peptide synthesis. The condensation, protecting groups, deprotection steps, and several side reactions are discussed. Attention is paid to the biological activity of depsipeptides.

Chem. Listy *92,* 294 - 301 (1998)

STRUKTURA INZULINU

KAREL HUML[a] a TOMISLAV BARTH[b]

[a]Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, [b]Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám.2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 12.VI.1997

Obsah

1. Úvod
2. Primární struktura inzulínu
3. Sekundární a supersekundární struktura inzulínu
4. Terciární struktura inzulinu
5. Kvartern í struktura i nzulinu
6. Počítačové modelování inzulinu

1. Úvod

V současné době žije na světě asi 120 milionů lidí trpících cukrovkou *(diabetes mellitus)*[1]. V České republice je registrováno téměř půl milionu diabetiků. Ukazuje se, že za posledních dvacet let počet postižených touto chorobou se u nás zdvojnásobil[2,3]. Tato choroba může být způsobena nedostatečnou produkcí inzulinu v beta-buňkách Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní (pankreas) - tzv. 1. typ cukrovky (juvenilní), kterým trpí asi 10 % pacientů[4]. Tzv. 2. typ cukrovky (cukrovka pozdního věku) je způsoben nedostatečnou funkcí receptorů inzulinu na povrchu buněk[5].

Do prvé skupiny lze zařadit také případy, kdy pacient má geneticky pozměněnou primární strukturu molekuly inzulinu vedoucí k výraznému snížení její biologické účinnosti[6,7].

Původní snahou, jak omezit následky cukrovky, bylo nahradit chybějící inzulin preparáty získanými ze zvířat. Ukazuje se, že nejblíže lidskému inzulinu je inzulin z prasat a králíků[8]. Touto cestou se získává asi 6 t inzulinu ročně, k čemuž musí být poraženo téměř 3,5 milionů prasat[1]. Po objevu a identifikaci genu lidského inzulinu je nyní možno též inzulin vyrábět ve velkém množství postupy genové techniky. Kromě ekonomického významu zde hraje důležitou roli i skutečnost, že lidský hormon je pro mnoho pacientů snesitelnější než inzulin zvířecího původu[9].

O významu inzulinového hormonu svědčí udělení tří Nobelových cen[10]. V roce 1923 to byli F. G. Banting a McLeod za izolaci inzulinu[4], roku 1958 F. Sanger za vyřešení jeho primární struktury[11,12] a roku 1977 pak R. Yalowá a S. A. Berson za vypracování radioimunologické metody stanovení inzulinu a dalších peptidových hormonů[13].

Významným předpokladem pro určení prostorové struktury inzulinu bylo úspěšné úsilí připravit inzulin v krystalické formě. To se podařilo J. J. Abelovi v roce 1925 (cit.[14]) a v přítomnosti iontů Zn^{2+} D. A. Scottovi v roce 1934 (cit.[15]). Vlastní trojrozměrnou (3D) strukturu inzulinu pak vyřešila metodami difrakce rentgenového záření D. Hodgkinová se svými spolupracovníky v roce 1969 (cit.[16]). Na její práce navázala skupina G. Dodsona v Yorku[17] a T. Blundella v Londýně[18]. Ze současných pracovišť je dále možné jmenovat například laboratoř H. Tagera (Chicago)[19], čínské laboratoře v Beijingu[20], či japonskou laboratoř v Nagoye vedenou N. Sakabem[21]. Z našich pracovišť je to pak laboratoř druhého z autorů v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze zabývající se semisyntézou inzulinu.

Stoupající počet nemocných cukrovkou vlivem moderního způsobu života, ale i paradoxně zvýšenou lékařskou péčí, včetně vyhledávací činnosti, nás vede k dalšímu studiu struktury a vlastností tohoto hormonu, přípravy inzulínových analogů a derivátů s modifikovanými vlastnostmi. Následující práce je stručným přehledem našich znalostí o trojrozměrné struktuře uvedených látek a navazuje tak na publikaci I. Svobody z roku 1991 týkající se chemické a semisyntetické přípravy inzulinu a jeho analogů[22].

2. Primární struktura inzulinu

Sangerovou metodou sekvenování[12,23] bylo dokázáno, že bílkoviny tvoří řetězce složené z relativně malého počtu

aminokyselinových zbytků (reziduí). Jejich řazení v řetězci (angl. chain, strand) udává tzv. primární nebo-li sekvenční strukturu bílkoviny.

Ukazuje se, že primární struktura určuje i vyšší stupně strukturní stavby bílkovin. Hovoříme o tzv. druhém genetickém kódu[24,25], který je součástí centrálního dogmatu molekulární biologie[26,27].

Dosavadní pokusy o počítačové odvození sekundární, případně vyšší struktury ze znalosti struktury primární, zatím ve většině případů selhávají, protože energeticky přijatelných konformací je nesmírně mnoho a počítačové metody vyhledávání optimální konformace by vyžadovaly astronomicky dlouhou dobu. Na druhé straně z experimentu víme, že bílkovinná molekula se za fyziologických podmínek svine do nativní konformace odpovídající celkovému minimu volné energie během 10^{-1} až 10^{3} s. Uvedený rozpor je znám v literatuře jako Levinthalův paradox[28-30].

Uvedená fakta platí i pro relativně jednoduchou bílkovinu jako je inzulín. Proto je nutné při studiu jeho struktury kombinovat metody biochemické, fyzikální i počítačové.

Inzulin je v lidském těle produkován nejprve jako biologicky neaktivní prekurzor, tzv. preproinzulin, tvořený řetězcem 108 reziduí. Působením proteinasy dochází k odštěpení prvních 24 reziduí, tzv. signálního peptidu a vytvoření proinzulinu. V dalším kroku je proteolytickým štěpením „vyseknuta" střední část zbývajícího řetězce, tzv. řetězec C obsahující 33 reziduí, čímž vznikne aktivní inzulin o molekulové hmotnosti 5806 (cit.[10]). Jeho dva úseky, řetězec A (21 reziduí) a řetězec B (30 reziduí) jsou spolu vázány dvěma disulfidovými můstky: Cys A7-Cys B7 a Cys A20–Cys B19. Třetí disulfidový můstek Cys A6-Cys A11 pak spojuje rezidua téhož řetězce A (cit. [5,31])(obr. 1).

Analýzou primární struktury inzulinů a jejich homologů[18,32] bylo zjištěno, že některá rezidua zajišťující funkci hormonu jsou společná většině typů inzulinů, jsou to tzv. invarianty, zatímco jiná mohou býti nahrazena neb vynechána bez zásadního vlivu na funkci inzulinu. Baker a spolupracovníci[33] rozdělují tyto invarianty do dvou skupin:

I. skupina (esenciální rezidua pro trojrozměrnou stavbu):

v řetězci A: 6 ,7 ,11, 16, 20

v řetězci B: 6, 7, 8, 11, 12, 15, 19,23

II. skupina (povrchová rezidua zodpovědná za interakci s okolím):

v řetězci A: 1, 2, 3, 5, 19, 21

v řetězci B: 22, 24, 25, 26

Murray-Rust a spolupracovníci[18] při klasifikaci asi 80 typů inzulinů a jejich analogů došli k podobnému seznamu invariantů. Zároveň uvádějí, že naopak největší variabilita reziduí je v oblastech A8–A10, B1 a B27.

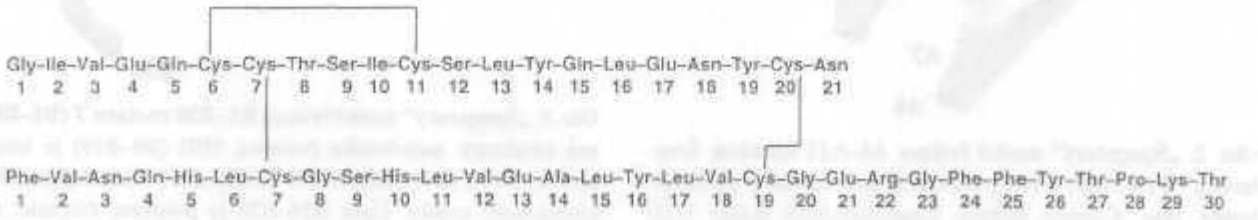
Studium mechanismu působení inzulínu vedlo k laboratorní přípravě jeho různých forem lišících se primární strukturou. Jsou to především analoga vzniklá záměnou některého rezidua za jiný typ. Tímto způsobem bylo substituováno postupně víc než 45 reziduí z celkového počtu 51 reziduí přítomných v řetězcích A a B inzulínového monomeru. Vlastnostmi takto připravených analogů se zabývali např. Liang[20,34], Wollmer[35] nebo Nakagawa[6,36].

Speciálním případem substituce je transpozice, kdy dvě rezidua jsou vzájemně vyměněna co do polohy v peptidovém řetězci[37].

Dalším významným typem substituce je D-L konverze, kdy místo původní L aminokyseliny je substituována její forma D. Zajímavých výsledků bylo dosaženo například umístěním D-Phe B24 místo L-Phe24, kdy biologická účinnost takto vzniklé látky se zvýšila na 180 % účinnosti látky původní[38,39]. Kombinací transpozice a D-L konverze v oblasti B24 až B26 se zabýval např. Mirmira[37].

Kromě uvedených typů substituentů připravených synteticky byly nalezeny i substituenty vzniklé geneticky. Tyto mutanty se všechny projevily sníženou biologickou aktivitou. Podle místa identifikace byly nazvány jako „inzulin Chicago", kde místo rezidua Phe B25 bylo zjištěno reziduum Leu B25 (cit.[40]), „inzulin Los Angeles" (místo Phe B24 je Ser B24) a konečně „inzulin Wakayama" (místo Val A3 je Leu A3)[6,7,19,41,42]. Rovněž byl zaznamenán mutant, kde v lidském inzulinu, označovaném jako EBL3Q, je v poloze B13 místo Gly reziduum Gln (cit.[43]).

Samostatnou skupinu tvoří analoga vzniklá zkrácením (deletion) inzulínového řetězce. Intenzivně studovanou sku-



Obr. 1. **Primární struktura inzulínu.** Třípísmenové značení reziduí[31]

pinu takovýchto analogů[8] tvoří molekuly zkrácené v C-koncové oblasti řetězce B. Je to především despentapeptid inzulínu (DPI) vyznačující se ztrátou schopnosti tvořit dimer[6,33,44]. Dále pak deshexapeptid inzulínu (DHexI), desheptapeptid inzulínu (DHPI) a desoktapeptid inzulínu (DOI)[37,45,46].

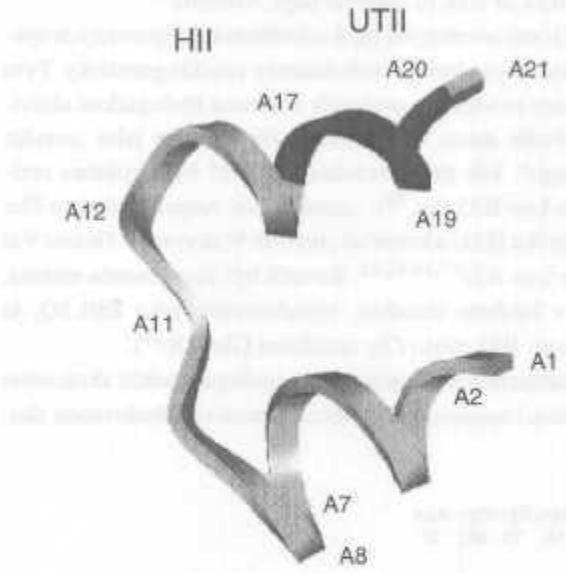
Rovněž byla studována analoga, kde byla vyjmuta rezidua A3 (resp. A8), což vedlo ke snížení (resp. ke zvýšení) bioaktivity výsledné látky[33,34].

3. Sekundární a supersekundární struktura inzulínu

Pod pojmem sekundární struktura bílkovin obvykle rozumíme uspořádání reziduí vzniklé působením sil na krátkou vzdálenost, tj. zasahujících asi 10 po sobě následujících reziduí.

Významným pomocníkem při klasifikaci jednotlivých typů konformací je tzv. Ramachandranův diagram (conformation plot)[47], kde každé reziduum je charakterizováno dvěma souřadnicemi: ϕ (torzní úhel kolem vazby HN-Cα) a ψ (torzní úhel kolem vazby Cα-C). Jednotlivé oblasti tohoto diagramu jsou charakteristické pro různé konformace tvořící sekundární strukturu aminokyselin[27,48].

Z Ramachandrova diagramu pro inzulín vyplývá, že na řetězci A můžeme rozlišit tři hlavní úseky: dvě šroubovice (helix) (A2-A7, A12–A17) popisované některými autory jako šroubovice typu 3.6_{13} (α-helix)[20] a spojovací část (A8-A11) mající charakter náhodného klubka (random coil)[18,20] (obr. 2).



Obr. 2. „Špagetový" model řetězce A1-A21 inzulínu. Šroubovice HI (A2-A7) a HII (A12–A17) jsou umístěny poblíž N-konce, resp. C-konce řetězce. Charakteristická otáčka UTII (A17-A20) je vyznačena jako tmavý úsek[49]

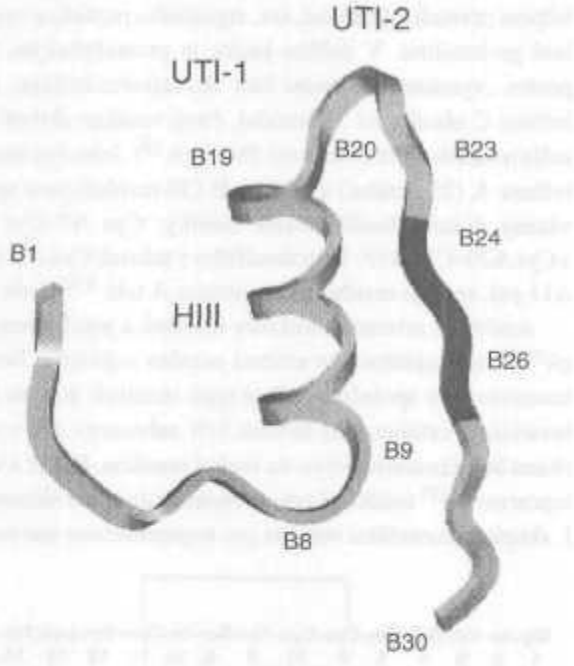
Takové charakteristické uspořádání několika úseků sekundárních struktur se často klasifikuje jako supersekundární struktura nebo krátce motiv. V uvedeném případě jde o motiv šroubovice-smyčka-šroubovice (helix-loop-helix)[26]. Z podrobné analýzy krystalického romboedrického inzulínu obsahujícího dva ionty Zn^{2+} (2Zn-inzulin) bylo zjištěno, že první šroubovice, označovaná jako HI (cit. [46]) nebo A_N dle N-konce řetězce[39] má úseky A1–A4 a A2–A5 typu šroubovice 3_{10} (three-ten-helix), zatímco úseky A3-A8 a A4-A9 jsou šroubovice typu 4.4_{16} (π-helix)[46].

Druhá šroubovice (A12–A17), označovaná jako HII (cit. [46]) nebo šroubovice A_C (cit.[39]) je typu 3_{10} (cit.[46]).

Konce řetězce A (A1, A19–A21) mají strukturu nataženého řetězce (stretches). Úsek A17–A20 je u některých molekul klasifikován jako reverzní smyčka UTII (U-turn, reverse turn)[46].

Analogicky lze rozlišit na řetězci B tři základní úseky, které vytvářejí charakteristický motiv ve tvaru písmene V, označovaný jako inzulínová konformace (inzulin fold)[6] (obr. 3).

Je to především α-šroubovice HIII (cit.[46]), která v pří-



Obr. **3. „Špagetový" model řetězce B1-B30 ve stavu T (B1-B8) má strukturu nataženého řetězce). HIII** (B9–B19) je šroubovice. UTI-1 (B19–B22) a UTI-2 (B20-B23) tvoří dvě po sobě jdoucí ostré otáčky. Úsek B24-B26 je β-řetězec účastnící se tvorby P-struktury skládaného listu v případě dimerizace[49]

padě stavu R (relaxed) obsahuje rezidua B1–B19, zatímco ve stavu T (tense, taut) pouze B9–B19, přičemž počátečních 8 reziduí v blízkosti N-konce (B1-B8) majíkonformaci nataženého řetězce (extended sequence)[31]. Přechody mezi oběma stavy se zabývala řada autorů[19,31,43]. Rovněž byly studovány neúplné stavy R, kde první tři rezidua (B1–B3) představují poruchu v α-šroubovici[49].

Druhý úsek je tvořen ostrou otáčkou tvořenou dvěma za sebou následujícími β-otáčkami (β-turn) B19–B22 a B20–B23 (označované jako UTI-1 a UTI-2), majícími zásadní význam při tvorbě trojrozměrné struktury inzulínové molekuly[46].

Oblast B24-B26, která má struktura téměř napjatého řetězce (β-strand), hraje významnou roli jak pro funkci inzulínu jako hormonu, tak i pro tvorbu kvarterní struktury vhodné pro skladování v těle.

Z uvedeného vyplývá, že v případě inzulínové molekuly ve stavu T existují tři body otáčení (hinges), a to B8, B20 a B23, tvořené Gly (ve stavu R dva body: B20 a B23)[23], které vzhledem k velké flexibilitě Gly dovolují tvorbu ostrých otáček. Z Ramachandranova diagramu je vidět, že všechna tři uvedená rezidua leží v oblasti kladných hodnot torzního úhlu ϕ, což je pro L-aminokyselinys větším postranním řetězcem zakázaná oblast. Liang[20] navíc uvádí jako body otáčení jestě Ile A10, Gly B4 a Phe B24.

4. Terciární struktura inzulínu

Za terciární strukturu bílkovin budeme považovat vzájemné prostorové uspořádání a interakce stavebních jednotek definovaných v rámci sekundární struktury jedné molekuly, tj. šroubovic, smyček, β-struktur a pod., které se v dané látce vyskytují.

Jak jsme se již zmínili v předcházejícím, prostorové uspořádání řetězce A je fixováno disulfidovým můstkem Cys A6-Cys A11. Řetězec A má tak tvar písmene U, kde obě ramena jsou tvořena šroubovicemi HI a HII přimykajícími se na α-šroubovici HIII řetězce B. Tato konfigurace je zajištěna dvojicí disulfidových můstků, jednak mezi šroubovicí HI a a-šroubovicí HIII řetězce B dvojicí Cys A7–Cys B7, jednak mezi šrubovicí HII a alfa-šroubovicí HIII dvojicí Cys A20-Cys B 19. Šroubovice HIII tak tvoří distanční vložku (spacer) udržující polohy HI a HII.

Kromě toho, volný C-konec řetězce A může být vázán na řetězec B solným můstkem Asn A21:COO^--Arg^+ B22 (cit.[46]). Krueger[39] dále uvádí pro prasečí inzulín solný můstek Gly A1–Thr B30, který při vytvoření hexameru je u poloviny molekul přerušen.

Většina reziduí je vzájemně propojena vodíkovými můstky mezi skupinami NH a CO hlavního polypeptidového řetězce inzulinu. Terciární struktura inzulínu je dále stabilizována uspořádáním typickým pro globulární proteiny, kdy hydrofobní rezidua jsou umístěna v jádře molekuly, zatímco na jejím povrchu leží rezidua polární[23]. Podrobným studiem těchto interakcí se zabývá např. Wang[46].

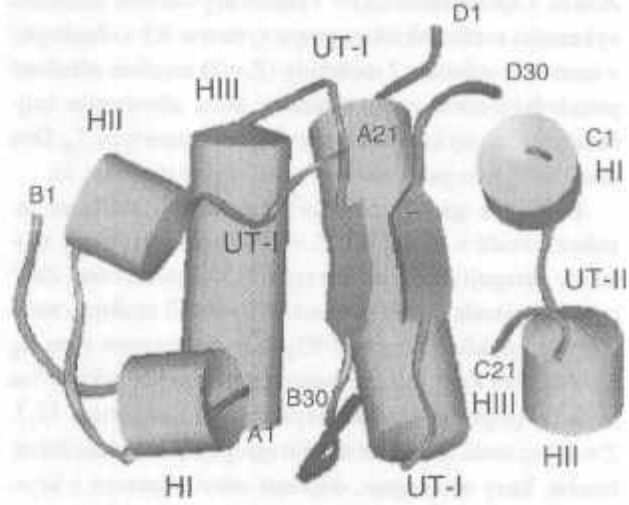
5. Kvarterní struktura inzulinu

Za kvarterní strukturu inzulinu budeme považovat prostorové uspořádání jeho molekul v dimeru, hexameru, případně i v krystalech.

V krvi se vyskytuje inzulín jako monomer, pokud jeho koncentrace je v rozmezí od 10^{-11} do 10^{-8} $mol.l^{-1}$, což zaručuje jeho biologickou aktivitu při kontaktu s inzulínovým receptorem[19,44].

Inzulín v koncentracích vyšších než 10^{-5} $mol.l^{-1}$ existuje převážně jako dimer, kdy dvě molekuly inzulinu jsou k sobě vztaženy pseudodvojčetnou rotační osou směřující kolmo na úsek B24-B26 (cit.[50]) (obr. 4).

Mezi oběma molekulami existuje řada van der Waalsových kontaktů nepolárních reziduí jako jsou Val a Phe a vodíkových můstků, zejména mezi rezidui B24 až B26 řetězce B prvé molekuly (molekula I dle čínského značení) a obdobnými rezidui B'24 až B'26 druhé molekuly (II), označované též, ve shodě s PDB, jako rezidua D24 až D26 (cit.[49]). Takto vzniklé čtyři vodíkové můstky tvoří „žebřík"



Obr. 4. **„Bubnový" model dimeru inzulinu.** Molekula I je ve stavu T, molekula II v porušeném stavu R. Šipky znázorňují umístění antiparalelní p-struktury skládaného listu v oblasti B24-B26 (molekula I) a D24–D26 (molekula II)[49]

struktury antiparalelního skládaného listu (antiparallel pleated sheet, antiparallel |3-structure)[23].

Při neutrálním pH a v přítomnosti iontů Zn^{2+} dimery dále agregují do hexamerů[51]. Uspořádání tří inzulínových dimerů pak vykazuje trojčetnou osu symetrie, která je kolmá na pseudodvojčetnou osu dimeru. Výsledný hexamer má tvar zploštělého sferoidu[23] vykazujícího přibližně symetrii bodové grupy 32 (mezinárodní značení). Ukazuje se, že vazba mezi třemi dimery je slabší než mezi monomery tvořícími dimer.

Prostor kolem trojčetné osy je obklopen polárními rezidui. To umožňuje, aby na trojčetné osy byly umístěny ionty, např. dva ionty Zn^{2+}, každý vázán ke třem reziduím His, vždy jedním od každého dimeru. Dále to mohou být například ionty Ca^{2+} a Cl^- a další[19-49].

Inzulínový hexamer se dvěma ionty Zn^{2+} (označovaný též jako 2Zn inzulín) je biologicky významný, protože v této formě je deponován v pankreatu[43].

Kombinací molekul stavu T a R v dimeru můžeme dostat hexamery typu T_6, R_6 nebo smíšený stav T3R3, který ztrácí pseudodvoj četnou symetrii. Rovněž byl publikován hexamer, kde stav R je neúplný[49]. Allosterické přechody mezi jednotlivými stavy v roztocích byly studovány metodami NMR[43].

Vhodnou volbou růstových podmínek a za přítomnosti různých iontů a nízkomolekulárních fragmentů byl připraven inzulin a jeho analoga i ve formě monokrystalů. To dovolilo stanovit přesné polohy jednotlivých atomů inzulinu, přítomných molekul vody a dalších heteroatomů. Adams a spolupracovníci[16] vyřešili krystalovou strukturu vykazující romboedrickou grupu symetrie R3 a obsahující v nezávislé jednotce 2 molekuly (Z = 2) inzulínu sdružené pseudodvojčetnou osou symetrie, které působením trojčetné rotační osy kolmé k ní vytvářejí hexamer typu T_6. Dva ionty Zn^{2+} jsou pak umístěny na trojčetné ose (obr. 5).

Bentley a spolupracovníci[52] publikovali strukturu inzulinu rovněž v grupě R3, Z = 2, kde ale inzulinové molekuly agregují do hexameru typu T3R3 a počet iontů Zn^{2+} je 4. Derewenda a spolupracovníci[53] vyřešili strukturu inzulinu v monoklinické grupě P2], Z = 6, hexamer typu R_6 a počet iontů Zn^{2+} je 2. Dodsonovi a spolupracovníkům[54] se podařilo připravit kubické krystaly inzulínu, grupa $I2_13$, Z = 1, bez iontů Zn^{2+}, kde inzulin agreguje pouze jako dimer. Inzulin, který neagreguje. doposud nebyl připraven v krystalické formě. Podařilo se však získat monokrystaly despentapeptidu inzulinu (DPI), které této podmínce vyhovují. Dai a spolupracovníci[55] uvádějí strukturu zmíněného analogu v grupě C2, Z = 2.

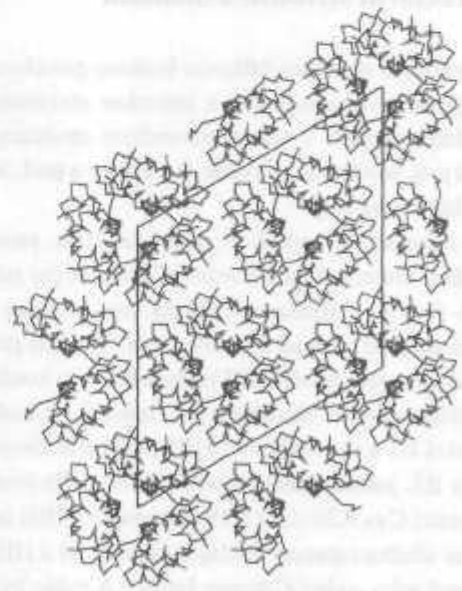
Současnou krystalizací inzulinu s dalšími látkami byly připraveny materiály vykazující i další grupy symetrie, např. $P4_32_1$ a Z = 8 (cit.[56]).

Doposud bylo stanoveno několik desítek krystalových struktur různých forem inzulinu. Jejich přehled, včetně souřadnic atomů a dalších charakteristik, nalezneme v Protein Data Bank (nebo v jejích kopiích), která je volně dosažitelná např. prostřednictvím počítačové sítě Internet[57].

Znalost trojrozměrné struktury většího počtu modifikací inzulinu dovoluje řešit i některé otázky týkající se chování tohoto hormonu. Ve stručnosti se zde zmíníme o třech nejvýznamnějších:

1) Předně je to problém agregace inzulínových molekul do dimerů, resp. hexamerů. Z podrobných studií vyplývá, že dimer spojuje nejen „žebřík" čtyř vodíkových můstků antiparalelní β-struktury, ale že k vazbě dimeru dále přispívají interakce reziduí B10, B12, B16 patřící ke šroubovici HIII, reziduum A21 (skupinou COO), B21 smyčky UTI a B28, B29 C-konce řetězce B, včetně skupiny COO" rezidua B30 (cit.[17,20,34,58,59]).

Poněkud slabší je vazba dimerů v hexameru[33]. Účastní se jí A13, 14 a B1,10, 13, 14, 17 (cit.[17]). Ukázalo se, že odstraněním konce B26–B30, a tím i β-struktury, ztrácí vzniklý DPI schopnost vytvořit dimer. To také vysvětluje, proč se podařilo DPI vykrystalizovat v monomerní formě. Proto se DPI často používá jako model monomerního inzulinu.



Obr. 5. Projekce krystalové struktury inzulinu T_3R_3 podél trojčetné osy souměrnosti. Nezávislou jednotkou je dimer tvořený molekulou I spolu s molekulou II. Krystalografická grupa souměrnosti je R3 (cit.[49])

2) Druhý okruh otázek se týká vazby inzulinového monomeru na příslušný receptor[18,26,31,33]. Předpokládá se, že styčná plocha inzulinového monomeru s receptorem je tvořena: jednak hydrofobními rezidui A2, 3, 19 a B11, 12, 15, 16, 24, 25, 26, zaujímajícími oblast velikosti asi 150 $Å^2$, která je obklopena věncem hydrofilních reziduí A1, 4, 5, 18, 21 a B9, 10, 13, 21, 22, 30. Takto vytvořený amfipatický povrch lze aproximovat rovinou svírající úhel 20° s rovinou dimerizace[20]. Obdobnou množinu vazebních reziduí uvažuje i Nakagawa[6]. Centrální hydrofobní oblast je obvykle kryta nataženým C-koncem řetězce B vykazujícím značnou pohyblivost a chránícím tuto oblast před molekulami rozpouštědla[20,42]. Předpokládá se, že v okamžiku vazby inzulinu na receptor se tento řetězec odsune a zpřístupní hydrofobní oblast vazbě. Postupným odtržením C-koncových reziduí řetězce B se prokázal jejich význam při interakci s receptorem. Až po DPI se biologická aktivita inzulinu sice snižovala, ale neklesla pod 40 % původní hodnoty. Teprve odtržení B25, B24 a dalších, kdy se poruší i dvojitá smyčka UTI, vedlo k neaktivnímu analogu. Rovněž byl prokázán význam rezidua A1 při interakci s receptorem[20].

3) Třetí okruh problémů se týká dynamických vlastností molekul inzulinu. O významu dynamického chování proteinů obecně svědčí např. skutečnost, že kyslík by nemohl proniknout k vazebnému centru myoglobinu či hemoglobinu pokud by jejich trojrozměrná struktura nevykazovala dostatečné fluktuace otevírající tranzitní cestu[60].

Analogicky lze předpokládat, že i dynamika inzulinu[33] bude hrát významnou roli v procesu navázání inzulinového monomeru na receptor. Superpozicí mnoha struktur inzulinu a jeho analogů se došlo k závěru, že všechny tři šroubovice a UTI se chovají jako tuhá tělesa, která se vzájemně mohou mírně pohybovat, zatímco jiné oblasti, jako např. oba konce řetězce B, o kterých se předpokládá, že mají významnou imunologickou funkci, vykazují značnou pohyblivost[34]. Tyto změny v terciární struktuře umožňuje flexibilita některých reziduí působících jako body otáčení [20,34,46]. Obdobná pozornost je věnována pohyblivosti postranních řetězců[34].

6. Počítačové modelování inzulinu

Stanovení trojrozměrné struktury metodami CD a NMR umožňuje sledovat rozdíly ve stavbě molekuly inzulinu v různém prostředí. Přesnější údaje nám pak poskytuje rentgenová strukturní analýza. Jejím nedostatkem je však omezení na relativně malý počet existujících krystalových forem.

Počítačové metody tak představují nové možnosti studia struktury bílkovin i za podmínek, kde současné experimentální postupy selhávají. Významnou roli zde hrají znalosti o tvaru funkcí popisujících potenciální energii systému a současná vyspělost výpočetní techniky[61].

Tyto metody je možno rozdělit do několika skupin. Předně je to prostá optimalizace systému, kdy hledáme lokální minimum potenciální energie v nejbližším okolí výchozího modelu struktury. Wodak a spolupracovníci[62] takto studovali změny konformace monomerů inzulinu, jestliže za výchozí stav zvolili souřadnice izolované molekuly I a izolované molekuly II inzulinu získané difrakcí RTG záření na romboedrickém 2Zn-inzulinu[63]. Polohy atomů vodíku byly dopočítány a molekuly rozpouštědla zanedbány. Z dosažených výsledků vyplynulo, že optimalizované konformace obou molekul se přiblížily konformaci molekuly I.

Za druhou etapu lze považovat molekulární simulaci (computer experiment), kam řadíme stochastické metody, jako jsou metody Monte Carlo a deterministické metody molekulární dynamiky (MD)[64]. Metodu MD, se zanedbáním interakce s okolím molekuly, použil pro studium inzulinu např. Krueger a spolupracovníci[39]. Vyšel ze struktury romboedrického prasečího 2Zn-inzulinu, kde molekula I a molekula II byly studovány izolovaně, a to bez vlivu kvarterní struktury, včetně zanedbání sil krystalového uspořádání. Ukázalo se, že oba monomery konvergují ke strukturám odlišným od výchozích, ale relativně blízkých ke konformaci I získané difrakcí RTG záření na krystalu inzulinu.

Shi Yun-yu a spolupracovníci[44] postoupili ve výpočtech do další etapy obtížnosti, kdy při použití metody MD vzali v úvahu i krystalové prostředí. Za výchozí model použili základní buňku obsahující 4 molekuly DPI, 398 molekul vody, 4 Cd^{2+}, 8 Na^+ a 4 Cl^-. Až na odchylné polohy reziduí v N-konci řetězce B dosáhli hodnot shodných s výsledky rentgenové strukturní analýzy.

Počítačovou studii o konformační flexibilitě inzulinového monomeru a dimeru rozpuštěného ve vodě uvádějí Mark a spolupracovníci[65].

Počítačovou molekulární dynamikou lze sledovat i chování rozpadu dimeru při postupném odtrhávání koncových reziduí v řetězci B, případně vliv substituce vybraných reziduí za jejich optické antipody[66,67].

Závěrem lze říci, že současné využití experimentálních, teoretických i počítačových metod dovolí v nejbližší době

zodpovědět řadu doposud otevřených otázek týkajících se struktury a chování inzulínu *in vitro* a *in vivo*. Vzhledem k biologickému významu a zároveň ke své relativně malé molekulové hmotnosti se stal inzulín předmětem nejen rozsáhlého výzkumu, ale i vhodnou látkou pro ověřování nových postupů.

Autoři si dovolují poděkovat prof. J. Janinovi (CNRS, Gif surYvette, France) a prof. S. Miertusovi (ICS UNIDO, Trieste, Italy) za pomoc v oblasti počítačového studia inzulínu. Publikace byla podporována granty GA AV ČR 450412, GA ČR 203/96/0111, GA ČR 303/95/1247, GA ČR 303/93/1012, GA AV ČR 75543 a projektem COPERNICUS.EBR 35 12 PL 94 10 09.

LITERATURA

1. Glenk W., Neu S.: *Enzymy*. Biocentrum-E, Praha 1990.
2. Otava B.: Hospodářské noviny *41,* 13 (1997).
3. Kalivoda J.: Zdravotnické noviny *46,* 5 (1997).
4. Banting F. G., Best C. H.: J. Lab. Clin. Med. 7, 256 (1922).
5. Voet D., Voetová J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha 1995.
6. NakagawaS. H., Tager H. S.: J. Biol. Chem. *261*, 7332 (1986).
7. Shoelson S., Haneda M., Blix P., Nanjo A., Sanke T., Inouye K., Steiner D., Rubenstein A., Tager H.: Nature (London) *302,* 540 (1983).
8. Svoboda I.: *Kandidátská dizertační práce*. Ústav organické chemie a biochemie, Československá akademie věd. Praha 1992.
9. Medica Rev. 5(4), 21 (1996).
10. Dryáková M.: Praktický lékař *76,* 54 (1996).
11. Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.: Biochem. J. *60,* 541 (1955).
12. Sanger F.: Science *129,* 1340 (1959).
13. Berson S. A. et al: J. Clin. Invest. *35*, 170 (1956).
14. Abel J. J., Geiling E. M. R., Roultier O. A., Bell F. M., Wintersteiner O.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *31,* 65 (1927).
15. Scott D. A.: Biochem. J. *28,* 1592 (1934).
16. Adams M. J., Blundell T. L., Dodson E. J., Dodson G. G., Vijayan M., Baker E. N., Hodgkin D. C, Rimmer B., Sheat S.: Nature *224*,491 (1969).
17. Dodson E. J., Dodson G. G., Hubbard R. E., Reynolds C. D.: Biopolymers *22,* 281 (1983).
18. Murray-Rust J., McLeod A. N., Blundell T. L., Wood S. P.: BioEssays *14,* 325 (1992).
19. Pittman I., Tager H. S.: Biochemistry *34,* 10578 (1995).
20. Liang D., Chang W., Zhang J., Wan Z.: Sci. Sinica55, 547(1992).
21. Sakabe N., et al, v knize: *Proc. Symp. Proinzulin, Inzulín and C-Peptide* (Baba S., ed.), str. 73. Tokushima July, 12-14, 1978.
22. Svoboda I.: Chem. Listy *85,* 1105 (1991).
23. Blundell T. L., Johnson L. N.: *Protein Crystallograhy*. Academic Press, New York 1976.
24. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H. Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *47,* 1309 (1961).
25. Arnold G. E., Dunker A. K., Johns S. J., Douthart R. J.:Proteins *12,* 382(1992).
26. Branden C, Tooze J.: *Introduction to Protein Structure*. Garland Publ., Inc., New York, London 1991.
27. Robson B., Garnier J.: *Introduction to Proteins and Protein Engineering*. Elsevier, New York, Oxford 1988.
28. Lewinthal C: J. Chem. Phys. *65,* 44 (1968).
29. Levitt M.: Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 224 (1991).
30. Hue Sun Chan, Dill K.A.: Phys. Today *42(2),* 24 (1993).
31. Rawn J. D.: *Biochemistry*. N. Patterson Publishers, Burlington 1989.
32. Bedarkar S., Turnell W. G., Blundell T. L., Schwabe C.: Nature *270,* 449(1977).
33. Baker E. N., Blundell T. L., Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., DodsonG. G., Hodgkin D. C, Hubbard R. E., Isaacs N. W., Reynolds C. D., Sakanabe K., Sakabe N., Vijayan M.: Philos.Trans. R. Soc. London *319,* 369(1988).
34. Liang D., Chang W., Wang D., Zhang J.: Sci. Sinica 55,418(1992).
35. Wollmer A., Strassburger W., Glatter U., Dodson G. G., McCall M., Gattner H.-G., Danho W., Brandenburg D., Rittel W.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 562,581 (1981).
36. Nakagawa S. H., Tager H. S.: Biochemistry *32,* 7237 (1993).
37. Mirmira R. G., Nakagawa S., Tager H. S.: J. Biol. Chem. 266, 1428(1991).
38. Kobayashi M., Ongaku S., Iwasaki M., Maegawa H., Shigeta Y., Inouye K.: Biochem. J. *206,* 597 (1982).
39. Krueger P., Strasburger W., Wollmer A., van Gunsteren W. F., Dodson G. G.: Eur Biophys *14,* 449 (1987).

40. Tager H., Given B., Baldvin D., Mako M., Markese J., Rubenstein A., Olefsky J. M., Kobayashi M., Kolterman O., Poucher R.: Nature (London) *281,* 122 (1979).
41. Nanjo K. et al: J. Clin. Invest. *77,* 514 (1986).
42. Hua Q. X., Shoelson S. E., Kochoyan M., Weiss M. A.: Nature *354,* 238 (1991).
43. Brzovič P. S., Choi W. E., Borchardt D., Kaarsholm N. C, Dunn M. F.: Biochemistry 35, 13057 (1994).
44. Shi Yun-Yu, Yun Ru-Huai, Gunsteren W. F.: J. Mol. Biol. *200,* 571 (1988).
45. Weitzel G., Bauer F.-U., Eisele K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. *357,* 187 (1976).
46. Wang D., Chang W., Dai J.: Sci. Sinica 25, 711 (1982).
47. Ramachandran G. N., Sesisekharan V.: Adv. Protein Chem. *23,* 284(1986).
48. Richardson J. S.: Adv. Protein Chem. *34,* 167(1981).
49. Ciszak E., Smith G. D.: *Brookhaven Protein Data Bank:* ltrz.pdb (Internet: http://www.pdb.bnl.gov).
50. Blundell T., Dodsson G., Hodgkin D., Mercola D.: Adv. Protein. Chem. *26,* 279 (1972).
51. Bi R. C, Dauter Z., Dodson E., Dodson G., Giordano F., Reynolds C: Biopolymers *23,* 391 (1984).
52. Bentley G. A., Dodson E. J., Dodson G. G., Hodgkin D. C, Mercola D. A.: Nature *261,* 166 (1976).
53. Derewenda U., Derewenda Z., Dodson E. J., Dodson G. G., Reynolds C. D., Smith G. D., Sparks C, Swenson D.: Nature *338,* 594 (1989).
54. Dodson E. J., Dodson G. G., Lewitova A., Sabesan M.: J. Mol. Biol. *125,* 387(1978).
55. Dai J. B., Lou M. Z., You J. M., Liang D. C: Sci. Sinica *B30,* 55(1987).
56. Balschmidt P., Hansen F. B., Dodson E. J., Dodson G. G., Korber F.: Acta Crystallogr. *B47,* 975 (1991).
57. Internet http://pdb.pdb.bnl.gov-cgi-bin-browse, nebo http://molbio.info.nih.gov/cgi=bin/pdb?inzulin
58. Chothia C, Janin J.: Nature 256, 705 (1975).
59. Brems D. N., Alter L. A., Backage M. J., Chance R. E., DiMarchi R. D., Green L. K, Long H. B., Pekar A. Shields J. E., Frank B. H.: Protein. Eng. 5, 527 (1992)
60. Karplus M., Petsko G. A.: Nature *347,* 631 (1990).
61. Huml K., Remko M.: Chem. Listy *88,* 711 (1994).
62. Wodak S. 1, Alard P., Delhaise P., Renneboog-Squilbin C: J. Mol. Biol. *181,* 317 (1984).
63. Berenstein F. C, Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F. Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennerd O., Shimanouchi T. S., Tatsumi ML: J. Mol. Biol. *112,* 535 (1997).
64. Doucet J.-P., Weber J., v knize: *Computer-Aided Molecular Design,* str. 172. Academic Press, London 1996.
65. Mark A. E., Berendsen H. J. C, van Gunsteren W. F.: Biochemistry JO, 1086(1991)
66. Sopková J., Huml K., Svoboda I., Barth T.: *Proc. Syncrotrone Trieste,* 3-rd Users Meeting, Trieste, Dec. 4-5, 1995.
67. Huml K., Barth T.: Mater. Sci. *4,* 3 (1997).

K. Huml[a] and T. Barth[b] (*[a]Institute of Macromolecular Chemistry, [b]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Structure of Insulin**

A short survey of primary, secondary, tertiary, and quaternary structures of insulin is presented. Also supersecondary and crystal structures are briefly described. A special attention is paid to a variety of natural and artificial insulin analogues. Finally, computer-aided molecular modelling is mentioned as a modern method of protein study.

Chem. Listy *92,* 689 - 697 (1998)

PTERINY

JOSEF TOMANDL

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
e-mail: tomandl@med.muni.cz

Došlo dne 14.X.1997

Obsah

1. Úvod
2. Chemická charakteristika
   2.1. Struktura a rozdělení
   2.2. Chemické vlastnosti
3. Biosyntéza pterinů
4. Funkce pterinů v metabolismu
5. Metody stanovení
6. Závěr

1. Úvod

Historie pterinů se začíná podle dostupných pramenů psát v roce 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel *lepidoptera*[1]. Později skupina těchto pigmentů dostává název pteridiny (*pteron* = řecky křídlo)[2] a je zjištěna jejich struktura[3,4].

Poměrně vysoké koncentrace pterinů se nacházejí pouze jako pigmenty u hmyzu, obojživelníků, plazů a ryb[5-6]. U člověka byly pteriny nejprve zjištěny v moči jednak pro snadnou dostupnost výchozího materiálu a jednak pro relativně vysoké koncentrace. Jedná se především o xanthopterin[7], biopterin[8] a neopterin[9].

Z velkého počtu pterinů, jen u několika byla popsána jejich biologická funkce. Biopterin stimuluje mitosu u trypanosomy *Crithidia flagellata*[10], jeho redukovaná forma 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin slouží jako kofaktor monooxygenas aromatických aminokyselin[11] a NO-synthasy[12,13]. Funkce neopterinu v organismu je doposud neobjasněna. Sledování jeho koncentrace v tělesných tekutinách napomáhá předvídat vývoj patologického stavu spojeného s aktivací buněčného imunitního systému[14,15]. Molybdopterin tvoří základní strukturu molybdenových kofaktorů[16] oxidoreduktas, např. nitrátreduktasy, sulfitoxidasy a xanthinoxidasy.

2. Chemická charakteristika

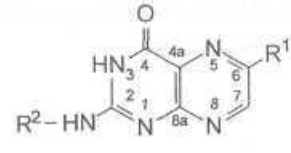
2.1. Struktura a rozdělení

Základní struktura pterinů je odvozena od pyrazino-[2,3-*d*]-pyrimidinového bicyklického systému zvaného pteridin. Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny (deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu) a lumaziny (deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu). Podle velikosti substituentů lze deriváty pteridinu rozdělit na nekonjugované (pteridiny s relativně malými substituenty, jako např. neopterin, biopterin, molybdopterin, onkopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin, methanopterin[17]).

Pteriny (obr. 1) lze odlišit jednak podle postranního řetězce v pozici 6, jednak podle oxidačního stavu pteridinového cyklu. Přehled hlavních pterinů zjištěných u člověka je uveden v tabulce I. V přírodě se vyskytují rovněž isopteriny, které mají postranní řetězec z pozice 6 přemístěn do pozice 7. Vznikají pravděpodobně neenzymaticky přesmykem z mateřských pterinů. U člověka byly zjištěny isosepiapterin[18], isoxanthopterin, isobiopterin[19,20]. Molybdopterin obsahuje dithiolenovou skupinu, která váže molybden (Mo^{4+}) (cit.[21]). V některých enzymech se vyskytuje molybdopterin jako dinukleotid[16].

2.2. Chemické vlastnosti

Pteriny jsou fotosenzitivní sloučeniny a na světle se rozkládají na různé deriváty pteridinu. Vyskytují se ve třech



Obr. 1. **Strukturní vzorec pterinů v oxidované formě**

Tabulka I
Přehled hlavních pterinů zjištěných v lidských buňkách a tělesných tekutinách

Sloučenina	R^1	R^2
Pterin	H	H
Xanthopterin	OH	H
6-Formylpterin	CHO	H
6-Karboxypterin	COOH	H
6-Hydroxymethylpterin	CH_2OH	H
Sepiapterin	(2'*S*)-CO-CHOH-CH_3	H
Biopterin	(1'*R*,2'*S*)-CHOH-CHOH-CH_3	H
Orinapterin (*threo*-Biopterin)	(1'*S*,2'*S*)-CHOH-CHOH-CH_3	H
Onkopterin	(1'*R*,2'*S*)-CHOH-CHOH-CH_3	CH_2-CH_2-CH_2-NH_2
Neopterin	(1'*S*,2'*R*)-CHOH-CHOH-CH_2OH	H
Monapterin (*threo*-Neopterin)	(1'*S*,2'*S*)-CHOH-CHOH-CH_2OH	H
Umanopterin	(1'*R*,2'*R*)-CHOH-CHOH-CH_2OH	H
Molybdopterin	CSH=CSH-CHOH-CH_2O-PO_3^{2-}	H

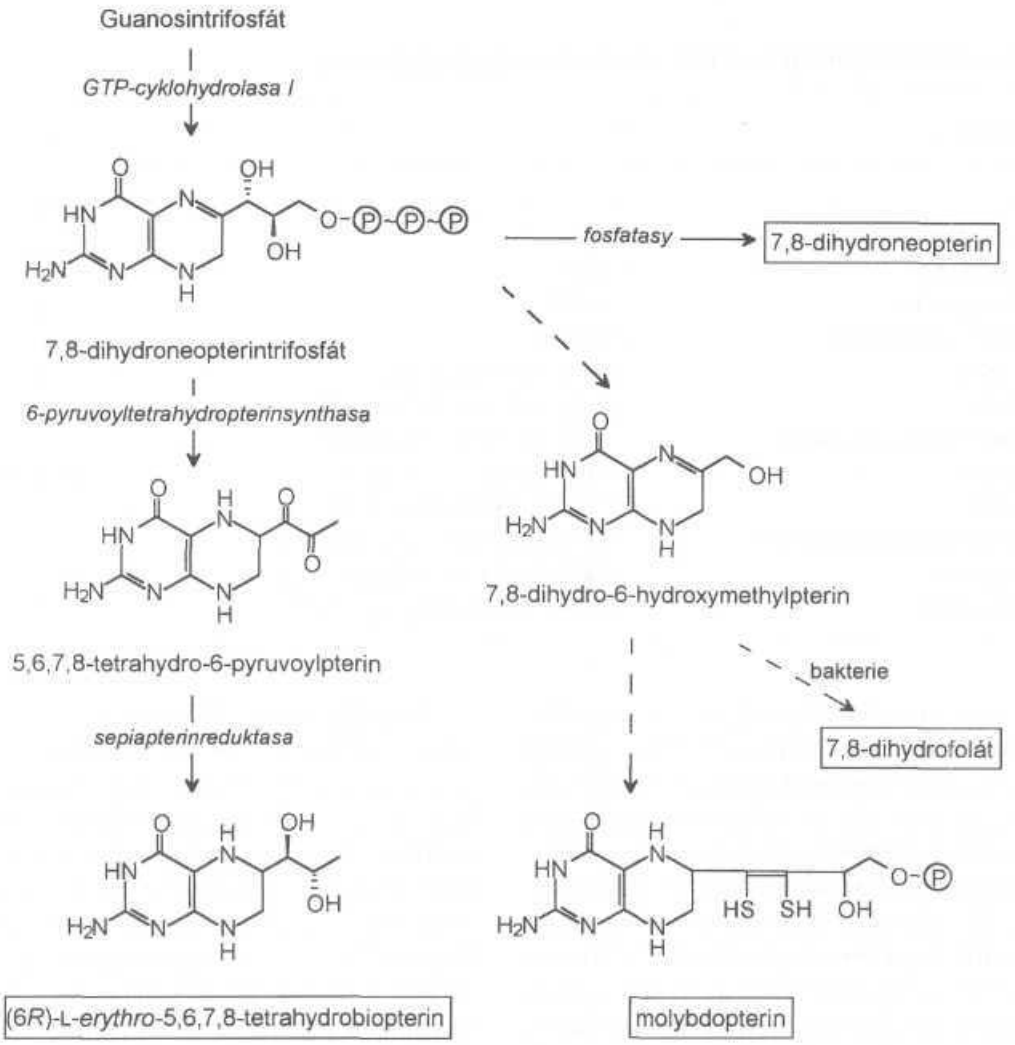
oxidačních formách, v 5,6,7,8-tetrahydro-, 7,8-dihydro- nebo v plně oxidované (aromatické) formě. Dihydropteriny existují rovněž v méně stabilní chinoidní struktuře. Redukované formy pterinů snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, zvláště v přítomnosti iontů kovů[22]. Touto oxidací nevznikají pouze plně oxidované formy mateřské sloučeniny, ale v důsledku různých přesmyků během oxidace dochází ke vzniku jiných derivátů pteridinu[23]. Redukované formy pterinů mají velmi silné antioxidační účinky a mohou *in vivo* působitjako lapače reaktivních forem kyslíku[24]. Biopterin a neopterin lze získat z jejich redukovaných forem oxidací jodem[25,26]. Při oxidaci tetrahydropterinů dochází současně ke štěpení postranního řetězce. Pouze oxidované formy pterinů vykazují silnou modrou fluorescenci. Biopterin a neopterin včetně svých různých oxidačních stavů mají podobná UV spektra[25]. Volný molybdopterin je velmi labilní, může být stabilizován ve spojení se specifickým proteiny u nichž plní roli kofaktoru[27].

3. Biosyntéza pterinů

Biosyntéza všech pterinů a pteridinů začíná hydrolytickým štěpením GTP pomocí GTP cyklohydrolas. První reakční krok biosyntézy většiny známých pteridinů katalyzuje GTP cyklohydrolasa I (EC 3.5.4.16), vyjímku tvoří biosyntéza riboflavinu u bakterií a rostlin, které obsahují GTP cyklohydrolasu 11 (cit.[28,29]).

Biosyntéza tetrahydrobiopterinu z GTP probíhá ve třech enzymových krocích (obr. 2)[30]. Nejdříve se molekula GTP štěpí pomocí GTP cyklohydrolasy I na D-*erythro*-7,8-dihydroneopterintrifosfát. Tato sloučenina je klíčovým intermediátem v biosyntéze většiny ostatních pteridinů. V dalším stupni je 7,8-dihydroneopterintrifosfát oxidačně defosforylován Mg^{2+}-dependentní 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasou (EC 4.6.1.10) na 6-pyruvoyltetrahydropterin. V posledním stupni jsou dvě oxoskupiny v postranním řetězci 6-pyruvoyltetrahydropterinu redukovány NADPH-dependentní sepiapterinreduktasou (EC 1.1.1.153) na 6*R*-L-*erythro*-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4). Tato poslední přeměna může být rovněž katalyzována karbonylreduktasou (EC 1.1.1.184) a aldehydreduktasou (EC 1.1.1.21)[31], což se zdá být významné v případě inhibice nebo funkční nedostatečnosti sepiapterinreduktasy.

Biosyntéza tetrahydrobiopterinu probíhá především v hepatocytech, v lymfocytech a v dopaminergních a serotoninergních synaptosomech. V lidských hepatocytech je aktivita 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasy[32] asi o dva řády nižší než u ostatních savců a daný enzym chybí v lidských monocytech/makrofázích[33,34]. Následkem je akumulace 7,8-dihydroneopterintrifosfátu v buňkách, který je po hydrolýze uvolňován jako 7,8-dihydroneopterin a neopterin. Zvýšená biosyntéza neopterinu probíhá ve větším měřítku v monocytech/makrofázích aktivovaných cytokiny, především interferonem-γ (cit.[35,36]). U aktivovaných makrofágů je poměr celkového neopterinu k celkovému



Obr. **2. Schéma biosyntézy 5,6,7,8-tetrahydrobiopterinu a dalších pteridinů z guanosintrifosfátu**

biopterinu přibližně 50:1 (cit.[33-37]). Vyššíkoncentrace neopterinu byla rovněž nalezena u primátů[28].

Dalším společným intermediátem biosyntézy některých pterinů je 7,8-dihydro-6-hydroxymeťhylpterin, z kterého u kvasinek vzniká molybdopterin[39], u bakterií kyselina listová[28], u methanogenních bakterií pterinová složka methanopterin[40]. Zůstává stále otázkou, zda molybdopterin u ostatních druhů vzniká stejnou cestou jako u kvasinek.

Biosyntéza monapterinu byla popsána zatím u *E. coli*, kdy z 7,8-dihydroneopterintrifosfátu enzymatickou přeměnou vzniká 7,8-dihydromonapterintrifosfát[41]. Umanopterin je tvořen u člověka pravděpodobně neenzymaticky z 7,8-dihydroneopterinu(trifosfátu)[42], zatímco u *Tetrahymena pyriformis* za podpory enzymů[43].

*R*egulace biosyntézy. Biosyntéza BH4 je regulována různými mechanismy[44], které většinou výhradně ovlivňují první a klíčový enzym, GTP cyklohydrolasu I. Kladný kooperativní efekt na enzym má substrát GTP. zatímco konečné produkty di- a tetrahydropteriny působí inhibičně[45]. Fenylalanin stimuluje aktivitu GTP cyklohydrolasy I v hepatocytech u krys zprostředkovaně pomocí regulačního proteinu[46].

Prozánětlivé cytokiny stimulují biosyntézu pteridinů zvýšenou transkripcí a následnou *de novo* syntézou GTP cyklohydrolasy I (cit.[47-50]). Exprese následných dvou enzymů je konstituční[33]. Nejúčinnějším stimulátorem je interferon-γ, velmi silným kostimulátorem je TNF-α, který však sám o sobě nevykazuje stimulační efekt[33]. Některé hormony jako inzulín, reserpin[51] a glukokortikoidy[52] stimulují biosyntézu BH4 rovněž indukcí GTP cyklohydrolasy I. Inhibičně na indukci působí protizánětlivé cytokiny jako např. transformující růstový faktor beta[53-54], interleukiny 4 a 10 (cit.[54]).

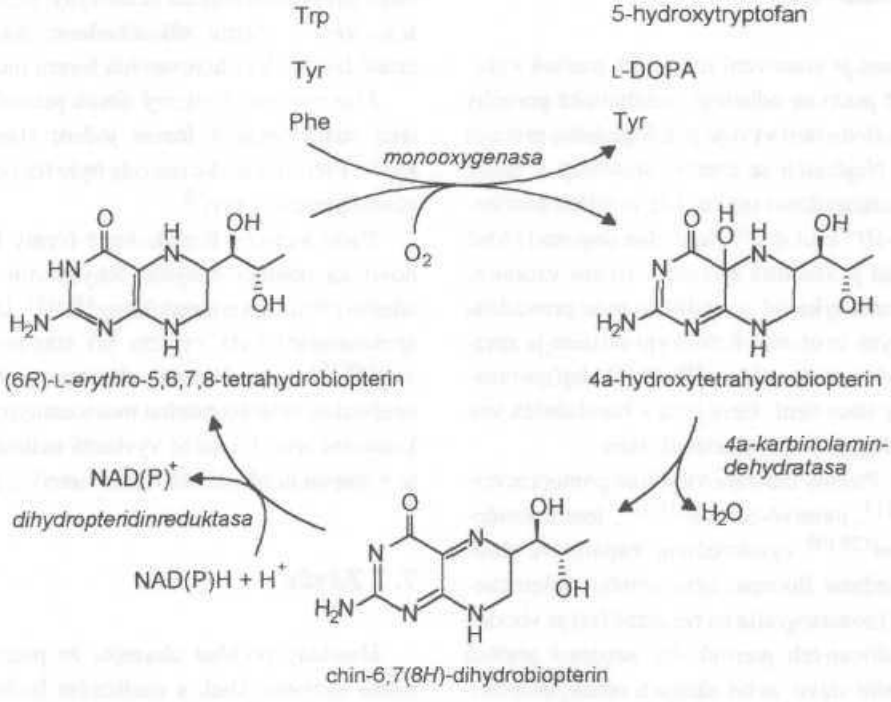
4. Funkce pterinů v metabolismu

Tetrahydrobiopterin. Úloha BH4 v metabolismu byla do podrobností studována u monooxygenas aromatických aminokyselin[55]. Zatím bylo zjištěno pět enzymů, jejichž aktivita závisí na BH4: fenylalanin-4-monooxygenasa (EC 1.14.16.1)[11], tyrosin-3-monooxygenasa (EC 1.14.16.2)[56], tryptofan-5-monooxygenasa (EC 1.14.16.4)[57], alkylglykol-ether-monooxygenasa (EC 1.14.16.5)[58] a NO-synthasa (EC 1.14.13.39)[12]. U monooxygenas aromatických aminokyselin je BH4 po hydroxylaci substrátu zpět recyklován na aktivní kofaktor pomocí dvou enzymů: 4a-karbinolamin-dehydratasou (EC 4.2.1.96) a dihydropteridinreduktasou (NADH: EC 1.6.99.7, NADPH: EC 1.6.99.10) (obr. 3)[55]. V nepřítomnosti 4a-karbinoldehydratasy, 4a-hydroxytetrahydrobiopterin je dehydratován spontánně nižší rychlostí, přičemž dochází částečně k přesmyku postranního řetězce v pteridinovém cyklu z C6 na C7 za vzniku isobiopterinu[20]. Při reakci vzniká vedle 4a-hydroxyderivátu též O2',4a-cyklický-tetrahydrobiopterin[59].

Mechanismus působení BH4 jako kofaktoru u NO-synthasy (NOS) se odlišuje od uvedených monooxygenas. Zatím byly popsány tři rozdílné izoenzymy NOS, mozkový, endoteliální a inducibilní[44]. Tyto izoenzymy katalyzují NADPH-dependentní 5elektronovou oxidaci L-argininu za vzniku oxidu dusnatého. BH4 má vlastnosti prostetické skupiny[44,60-61], která interakcí s dalším kofaktorem NOS hemem[62] udržuje enzym v redukovaném aktivním stavu[63-65]. BH4 se přímo nepodílí na redukci molekulového kyslíku[66,67], ale bylo zjištěno, že reduktázová doména NOS dokáže redukovat chinoidní dihydrobiopterin na BH4 (cit.[68]). Volný BH4 inaktivuje NO za tvorby peroxynitrátu[69] a chrání tak enzym před inhibicí produktem reakce[70]. Tvorbu NO inducibilní NOS je možné *in vivo* velmi účinně snížit inhibicí biosyntézy BH4 (cit.[71]).

Bylo zjištěno, že BH4, který je ve zvýšené míře produkován aktivovanými T lymfocyty, zvyšuje jejich afinitu k interleukinu-2, což vede k jejich zvýšené proliferaci[72,73]. Další funkcí BH4 je účast na řízení buněčného cyklu[74,75] nebo v regulaci melanogeneze[76].

Neopterin. Stanovení koncentrace neopterinu v tělesných tekutinách u lidí a primátů je možné použít ke sledování stimulace GTP cyklohydrolasy I cytokiny[14,77], především interferonem-γ. Dosud není vyřešeno, jestli vyšší koncentrace neopterinu v lidských buňkách a tělesných tekutinách plní nějakou funkci nebo pouze indikuje částečnou degeneraci biosyntetické cesty[78-79]. Nicméně, neopterin a jeho redukovaná forma se podílejí u člověka na modulaci cytotoxicity reaktivních forem kyslíku a chloru[80-84] a nezávisle na kyslíkových radikálech a NO vyvolávají apoptózu buněk[85,86]. Dihydroneopterin je schopen aktivovat transkripční faktory a indukovat expresi HIV-1



Obr. 3. **Recyklace 5,6,7,8-tetrahydrobiopterinu při hydroxylaci aromatických aminokyselin**

genu[83], zatímco neopterin stimuluje expresi inducibilní NOS v endotelu cév[87].

Molybdopterin. Molybdopterin je komponentou pterinových molybdenových kofaktorů[16]. Pteridinový cyklus je zde v redukované formě a účastní se pravděpodobně v procesech přenosu elektronů[88]. Je známá řada bakteriálních enzymů obsahujících molybdopterin[16,89-92]. Všechny enzymy obsahující molybden kromě nitrátreduktasy katalyzují oxidační hydroxylace nebo redukční dehydroxylace[93]. U člověka již byly zjištěny dědičné poruchy biosyntézy molybdopterinu, jež je kofaktorem sulfitoxidasy a xanthinoxidasy[94,95].

Xanthopterin v různé míře ovlivňuje růst a diferenciaci buněk[75,96-98].

Onkopterin. Poměrně nedávno byl v moči nemocných maligním lymfomem izolován N^2-(3-aminopropyl)biopterin, onkopterin[99]. Tato sloučenina by mohla v budoucnu sloužit jako citlivý tumorový marker[100].

6-Formylpterin a *6-hydroxymethylpterin* jsou ve větším množství tvořeny v nádorových buňkách jako degradační produkt kyseliny listové[101-104].

Methanopterin. Podobnou funkci jako kyselina listová v metabolismu jednouhlíkatých zbytků má u meťhanogenních bakterií methanopterin[105].

6. Metody stanovení

Kromě výzkumu je stanovení některých pterinů vyžadováno v klinické praxi na odhalení metabolické poruchy nebo předvídání a sledování vývoje patologického procesu resp. jeho léčby. Nejčastěji se pteriny stanovují v moči, plazmě, séru a mozkomíšním moku, kde je jejich koncentrace řádově 10^{-9}–10^{-6} mol.dm^{-3}. Není však doposud řádně prozkoumáno, jaká je stabilita pterinů v těchto vzorcích, poněvadž řada studií týkající se stability byla prováděna pouze v modelových vzorcích. Kritickým místem je zpracování vzorků před vlastní analýzou[106]. Převládajíchromatografické metody stanovení, které jsou v korelačních studiích postupně nahrazovány imunoanalýzami.

HPLC metody. Pteriny lze stanovit přímo pomocí reverzně-fázové[25,107-117], iontově-párové[118-124], iontoměničové[125-127] a chirální[128,129] vysokoúčinné kapalinové chromatografie s následnou fluorescenční a/nebo elektrochemickou detekcí. Chromatografie na reverzní fázi je vhodná na stanovení oxidovaných pterinů. Na separaci pterinů v různém oxidačním stavu, nebo různých tetrahydropterinů, nebo na separaci mono-, di- a trifosfátů pterinů je výhodné použít iontově-párovou nebo iontoměničovou chromatografii. Biologický vzorek se většinou aplikuje přímo, pouze při obsahu proteinů je nutné provést deproteinaci[111,113,118,130,131]. Předseparací vzorku[25-103-132,133] nebo gradientovou elucí s přepínáním kolon[130] lze zabránit kontaminaci analytické kolony a ztrátě citlivosti. Jako interní standard se používá 6-methylpterin[126] nebo 6,7-dimethylpterin[103,109].

Díky silné fluorescenci oxidovaných forem pterinů je možná jejich poměrně specifická a citlivá detekce bez předchozího zakoncentrování[109,111]. Redukované formy je nutno před vlastní analýzou oxidovat chemicky[19,25,111,123,134,135] nebo elektrochemicky[111,120]. Všechny oxidační formy biopterinu lze stanovit fluorimetricky, jestliže se oxidace provádí jodem v prostředí o různém pH (cit.[25]).

Endogenní oxidované a redukované pteriny v biologickém materiálu je možné přímo stanovit elektrochemickou detekcí. Byly použity amperometrické elektrody[136,137] a coulometrické elektrody z porézního grafitu v sériovém zapojení před fluorescenčním detektorem[111,118,120]. Modifikovanou metodou lze detegovat rovněž chinoidní formu dihydrobiopterinu[138].

Bioanalýza. Celkový biopterin lze stanovit nepřímo pomocí citlivé bioanalýzy s použitím *Crithidia fasciculata*[139-142]. Metoda není specifická, poněvadž jako růstový faktor *Crithidia f.* mohou sloužit i jiné pteriny[140]. Vzorky musí být před sterilizací oxidovány, poněvadž během autoklávování a vlastní několikadenní inkubace dochází ke ztrátě labilních redukovaných forem biopterinu[143].

Fluorimetrie. Celkový obsah pterinů je možné po oxidaci redukovaných forem jodem stanovit fluorimetricky[144]. Fluorimetrické metody bylo též použito na stanovení xanthopterinu v krvi[97].

Další metody. Redukované formy biopterinu lze stanovit za pomoci enzymů fenylalanin-4-monooxygenasy a/nebo dihydropterinreduktasy[145-147]. Detekce hmotnostní spektrometrií byla využita při stanovení pterinů plynovou[148-151] a kapalinovou chromatografií[20]. Ke stanovení neopterinu nebo biopterinu imunoanalýzou jsou již dostupné komerční sety. Původně vyvinutá radioimunoanalýza[152,153] je v dnešní době nahrazována metodou ELISA[154-156].

7. Závěr

Uvedený přehled ukazuje, že pteriny představují širokou skupinu látek s rozličným biologickým účinkem. Zatímco úloha tetrahydrobiopterinu v metabolismu je již

poměrně podrobně popsána, funkce ostatních pterinů zůstává předmětem dalšího výzkumu. Lze očekávat, že objasnění jejich role v živých organismech přispěje k dalšímu rozšíření poznatků o procesech probíhajících na molekulární úrovni a následně k pokroku v léčbě a diagnostice některých chorob.

LITERATURA

1. Hopkins F. G.: Nature *40,* 335 (1889).
2. Schöpf C., Becker E.: Justus Liebigs Ann. Chem. *524,* 49(1936).
3. Purrmann R.: Justus Liebigs Ann. Chem. *546,* 98 (1940).
4. Purrmann R.: Justus Liebigs Ann. Chem. *548,* 284 (1941).
5. Blakley R. L., v knize: *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines* (Pfeiderer W., Taylor E. C, ed.), str. 8. North-Holland Publ., Amsterdam 1969.
6. Forrest H., Van Baalen C: Annu. Rev. Microbiol *24,* 91 (1970).
7. Koschara W.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. *240,* 127(1936).
8. Paterson E. L., Saltza M. H., Stokstad E. L. R.: J. Am. Chem. Soc. *78,* 5871 (1956).
9. Sakurai A., Goto M.: J. Biochem. *61,* 142 (1967).
10. Broquist H. P., Albrecht A. M.: Proc. Soc. Biol. Med. *89,* 178(1955).
11. Kaufman S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *50,* 1085 (1963).
12. Tayeh M. A., Marletta M. A.: J. Biol. Chem. *264,* 19654(1989).
13. Kwon N. S., Nathan C. F., Stuehr D. J.: J. Biol. Chem. 264,20496(1989).
14. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Weiss G., Werner G., Werner-Felmayer G.: *Neopterin. Biochemistry-Methods-Clinical Application,* str. 55. Walter de Gruyter & Co., Berlin 1991.
15. Miiller M. M., Curtius H. C, Herold M., Huber C. H.: Clin. Chim. Acta 207, 1 (1996).
16. Rajagopalan K. V., Johnson J. L.: J. Biol. Chem. *267,* 10199(1992).
17. White R. H.: Biochemistry *35,* 3447 (1996).
18. Fukushima T., Shiota T.: J. Biol. Chem. *247,* 4549 (1972).
19. Katoh S., Sueoka T., Matsuura S., Sugimoto T.: Life Sci. *45,* 2561 (1989).
20. Davis M. D., Kaufman S., Milstien S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *88,* 385 (1991).
21. Johnson J. L., Hainline B. E., Rajagopalan K. V., Arison B. H.: J. Biol. Chem. *259,* 5414 (1984).
22. Armarego W. L. F., Randles D., v knize: *Chemistry and Biology of Pteridines* (Blair J. A., ed.), str. 423. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1983.
23. Howells D. W., Hyland K.: Clin. Chim. Acta *167,* 23 (1987).
24. Shen R.: Arch. Biochem. Biophys. *310,* 60 (1994).
25. Fukushima T., Kobayashi K., Eto I., Shiota T.: Anal. Biochem. *89,* 71 (1978).
26. Fukushima T., Nixon J. C: Anal. Biochem. *102,* 176 (1980).
27. Johnson J. L., Jones H. P., Rajagopalan K. V.: J. Biol. Chem. *252,* 4994(1977).
28. Brown G. M., Williamson J. M.: Adv. Enzymol. *53,* 345(1982).
29. Richter G., Ritz H., Katzenmeier G., Volk R., Kohnle A., Lottspeich F., Allendorf D., Bacher A.: J. Bacteriol. *175,* 4045 (1993).
30. Nichol C. A., Smith G. K. Duch D. S.: Annu. Rev. Biochem. *54,* 729(1985).
31. Park Y. S., Heizmann C. W., Wermuth B., Levine R. A., Steinerstauch P., Guzman J., Blau N.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *175,* 738 (1991).
32. Werner E. R., Werner-Felmayer G., Wachter H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *203,* 1 (1993).
33. Schoedon G., Troppmair J., Fontana A., Huber C, Curtius C, Niederwieser A.: Eur. J. Biochem. *166,* 303(1987).
34. Werner E. R., Werner-Felmayer G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Yim J. J., Pfeiderer W., Wachter H.: J. Biol. Chem. *265,* 3189 (1990).
35. Blau N., Schoedon G., Curtius H. C: Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25, 603 (1989).
36. Andert S.E., Griesmacher A., Zuckermann A., Müller M.M.: Clin. Exp. Immunol. *88,* 555 (1992).
37. Werner-Felmayer G., Werner E. R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H.: Cancer Res. 50, 2863 (1990).
38. Duch D. S., Bowers S. W., Woolf J. H., Nichol C. A.: Life Sci. *35,* 1895(1984).
39. Irby R. B., Adair W. L.: J. Biol. Chem. 269, 23981 (1994).
40. White R. H.: Biochemistry *29,* 5397 (1990).
41. Heine M. C, Brown G. M.: Biochim. Biophys. Acta 477,236(1975).

42. Ogiwara S., Nagatsu T., Teradaira R., Fujita K., Sugimoto T.: Biol. Chem. Hoppe-Seyler *373*, 1061 (1992).
43. Klein R., Tatischeff I., Tham G., Groliére C. A.: Biochimie *73,* 1281 (1991).
44. Werner E. R., Werner-Felmayer G., Wachter H., Mayer B.: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. *127,* 97 (1995).
45. Shen R. S., Alam A., Zhang Y. X.: Biochem. Biophys. Acta *965,* 9(1988).
46. Harada T., Kagamiyama H., Hatakeyama K.: Science *206,* 1507(1993).
47. Blau N., Joller P., Atares M., Cardera-Garcia J., Niederwieser A.: Clin. Chim. Acta *148,* 47 (1985).
48. Schoedon G., Troppmair J., Adolf G., Huber C, Niederwieser A.: J. Interferon Res. *6,* 697 (1986).
49. Werner E. R., Werner-Felmayer G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H.: Biochem. J. *262,* 861 (1989).
50. Werner E. R., Werner-Felmayer G., Wachter H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *203,* 1 (1993).
51. Viveros O.H., Lee C.L., Abou-Donia H.M., Nixon J.C., Nichol CA.: Science *213,* 349 (1981).
52. Parniak M. A., Pilkington J.: Biochem. Cell. Biol. *67,* 293(1989).
53. Scott-BurdenT., ElizondoE., GeT., BoulangerC. M, Vanhoutte P. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *196,* 1261 (1993).
54. Schoedon G., Schneemann M., Blau N., Edgell C. J. S., Schaffner A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *196,* 1343 (1993).
55. Kaufman S.: Annu. Rev. Nutr. *13,* 261 (1993).
56. Shiman R., Akino M., Kaufman S.: J. Biol. Chem. *246,* 1330 (1971).
57. Friedman P. A., Kappelman A. H., Kaufman S.: J. Biol. Chem. *247,* 4165 (1972).
58. Tietz A., Lindberg M., Kennedy E. P.: J. Biol. Chem. 239,4081 (1964).
59. Almas B., Haavik J., Flatmark T.: Biochem. J. *319,* 947 (1996).
60. Mayer B., John M., Bohme E.: FEBS Lett. *277,* 215 (1990).
61. Mayer B., John M., Heinzel B., Werner E. R., Wachter H., SchultzG., Böhme E.: FEBS Lett. *288,* 187(1991).
62. Marletta M. A.: J. Med. Chem. *37,* 1899 (1994).
63. Giovanelli J., Campos K. L., Kaufman S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *88,* 7091 (1991).
64. Baek K. J., Thiel B. A., Lucas S., Stuehr D. J.: J. Biol. Chem. *268,* 21120 (1993).
65. Rodriquez-Crespo I., Gerber N. C, Ortiz de Montellano P.R.: J. Biol. Chem. *271,* 11462 (1996).
66. Mayer B., Heinzel B., Klatt P., John M, Schmidt K., Böhme E.: J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, S54 (1992).
67. Mayer B., Werner E. R.: Adv. Pharmacol. *34,* 251 (1995).
68. Witteveen C. F., Giovanelli J., Kaufman S.: J. Biol. Chem. *271,* 4143 (1996).
69. Mayer B., Klatt P., Werner E. R., Schmidt K.: J. Biol. Chem. *270,* 655(1995).
70. Stuehr D. J.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *37,* 339 (1997).
71. Bune A. J., Brand M. P., Heales S. J., Shegill J. K., Cammack R., Cook H. T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *220,* 13(1996).
72. Ziegler I., Schwulera U.: J. Cell. Biochem. *41,* 103 (1989).
73. Ziegler I., Borchert M., Heaney F., Davis A.P., Boyle H.: Biochim. Biophys. Acta 7735, 330 (1992).
74. Tanaka K., Kaufman S., Milstien S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *86,* 5864(1989).
75. Rubenstein M., Muchnik S., Garber S.L., Arruda J.A., Dunea G.: Int. J. Biochem. *25,* 1873 (1993).
76. Wood J. M., Schallreuter-Wood K. U., Lindsey N. J., Callaghan S., Gardner M. L. G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 206, 480 (1995).
77. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E.R.: Adv. Clin. Chem. *27,* 81 (1989).
78. Wöll E., Weiss G., Fuchs D., Lang F., Wachter H.: FEBS Lett. *318,* 249(1993).
79. Überall F., Werner-Felmayer G., Schubert C, Grunicke H. H., Wachter H., Fuchs D.: FEBS Lett. *352,* 11 (1994).
80. Weiss G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E. R., Werner-Felmayer G., Semenitz E., Dierich M. P., Wachter H.: FEBS Lett. 327, 89 (1993).
81. Murr C, Fuchs D., Gössler W., Hausen A., Reibnegger G., Werner E. R., Werner-Felmayer G., Esterbauer H., Wachter H.: FEBS Lett. *338,* 223 (1994).
82. Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Murr C., Reibnegger G., Werner-Felmayer G., Sgonc R., Böck G., Dierich M. P., Wachter H.: FEBS Lett. *364,* 234 (1995).
83. Mori H., Arai T., Mori K., Suzuki T., Makino K.: **Biochem.** Mol. Biol. Int. *40,* 799 (1996).
84. Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Zangerle R., Baeuerle P. A., Werner E. R., Fresser F., Überall F., Baier G., Wachter H.: AIDS Res. Human Retrovir. 73, 173 (1997).

85. Schobersberger W., Hoffmann G., Hobischhagen P., Bock G., Volkl H., Baier-Bitterlich G., Wirleitner B., Wachter H., Fuchs D.: FEBS Lett. *397,* 263 (1996).
86. Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Wachter H.: Biochem. Pharmacol. *53,* 755 (1997).
87. Schobersberger W., Hoffmann G., Grote J., Wachter H., Fuchs D.: FEBS Lett. *377,* 461 (1995).
88. Gardlik S., Rajagopalan K. V.: J. Biol. Chem *266,* 16627(1991).
89. Johnson J. L., Chaudhury M., Rajagopalan K. V.: Biofactors *3,* 103(1991).
90. Johnson J. L., Rajagopalan K. V., Mukund S., Adams M. W.: J. Biol. Chem. *268,* 4848 (1993).
91. Pitterle D. M., Rajagopalan K. V.: J. Biol. Chem. *268,* 13499(1993).
92. Gladyshev V. N., Lecchi P.: Biofactors *5*, 93 (1995–96).
93. Rajagopalan K. V.: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. *64,* 215(1991).
94. Roesel R. A., Bowyer F., Blankenship P. R., Hommes F. A.: J. Inherit. Metab. Dis. *9,* 343 (1986).
95. Mize C, Johnson J. L., Rajagopalan K. V.: J. Inherit. Metab. Dis. *18*, 283 (1995).
96. Ziegler I.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. *365*, 667 (1984).
97. Bakir A.A., Shaykh M., Williams R.H., Ahmed S., Dunea G.: Amer. J. Nephrol. *12,* 224 (1992).
98. Garber S. L., Salmassi J., Arruda J. A., Dunea G.: Nephron *69,* 71 (1995).
99. Sugimoto T., Ogiwara S., Teradaira R., Fujita K., Nagatsu T.: Biogenic Amines *9,11* (1992).
100. Tomandl J.: Vnitř. Lék. *43,* 404 (1997).
101. Halpern R.M., Halpern B.C., Stea B., Dunlap A., Conklin K., Clark B., Ashe H., Sperling L., Halpern J. A., Hardy D., Smith R. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74,587(1977).
102. Stea B., Backlund P. S., Berkey P. B., Cho A. K.,Halpern B. C, Halpern R. M., Smith R. A.: Cancer Res. *38,* 2378(1978).
103. Stea B., Halpern R. M., Halpern B. C, Smith R. A.: Clin. Chim. Acta *113,* 231 (1981).
104. Manjula S., Aroor A. R., Raja A., Rao S., Rao A.: Acta Oncol. *32,* 29(1993).
105. Jones W. J., Nagle D. P., Jr., Whitman W. B.: Microbiol.Rev. 57, 135(1987).
106. Hyland K., Howells D. W.: J. Chromatogr. *429,* 95 (1988).
107. Rokos H., Rokos K., Frisius H., Kirstaedter H. J.: Clin. Chim. Acta 705, 275(1980).
108. Hausen A., Fuchs D., König K., Wachter H.: J. Chromatogr. *227,* 61 (1982).
109. Woolf F. H., Nichol C. A., Duch D. S.: J. Chromatogr. *274,* 398 (1983).
110. Matsubara Y., Heininger J. A., Lin Y. Y.: Clin. Chem. *30*, 278 (1984).
111. Niederwieser A., Staudenmann W., Wetzel E.: J. Chromatogr. *290,* 237 (1984).
112. Howells D. W., Smith I., Hyland J.: J. Chromatogr. *381,* 285 (1986).
113. Tani Y., Ishihara T.: Life Sci *46,* 373 (1990).
114. Rippin J. J.: Clin. Chem. *38,* 1722 (1992).
115. Ogiwara S., Hidaka H., Sugimoto T., Teradaira R., Fujita K., Nagatsu T.: J. Biochem. *113,* 1 (1993).
116. Hibiya M., Teradaira R., Sugimoto T., Fujita K., Nagatsu T.: J. Chromatogr. B *672,* 143 (1995).
117. Tomandl J., Palyza V.: Chem. Listy *90,* 731 (1996).
118. Blau N., Niederwieser A.: Anal. Biochem. *128,* 446 (1983).
119. Lunte C. E., Kissinger P. T.: Anal. Chem. *55,* 1458 (1983).
120. Hyland K.: J. Chromatogr. *343,* 35 (1985).
121. Powers A. G., Young J. H., Clayton B. E.: J. Chromatogr. *432*, 321 (1988).
122. Montalvo B. C, Villar C. I., Hornillos R. C, Diez L. P.: J. Chromatogr. *458,* 217 (1988).
123. Tani Y., Ohno T.: J. Chromatogr. 677, 249 (1993).
124. Huber J. F. K., Lamprecht G.: J. Chromatogr. B *666,* 223(1995).
125. Stea B., Halpern R. M., Smith R. A.: J. Chromatogr. *168*, 385 (1979).
126. Dhondt J. L., Largilliere C, Ardouin P., Farriaux J. P., Dautrevaux M.: Clin. Chim. Acta 770, 205 (1981).
127. Stea B., Halpern R. M., Halpern B. C, Smith R. A.: J. Chromatogr. *188,* 363 (1983).
128. Ziegler T. R., Benfell K., Smith R. J., Young L. S., Brown E., Ferrari-Baliviera E., Lowe D.K., Wilmore D. W.: J. Parenteral and Enteral Nutrition 74, 137s (1990).
129. Klein R.: Anal. Biochem.: *203,* 134 (1992).
130. Werner E. R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H.: Clin. Chem. *33,* 2028 (1987).
131. Candito M., Cavenel C, Gugenheim J., Mouiel J., Parisot F., Jacomet Y., Sudaka P., Chambon P.: J. Chromatogr. *614*, 164 (1993).
132. Ferre J., Jacobson K. B.: J. Chromatogr. *350*, 389 (1985).
133. Slazyk W. E., Spierto F. W.: Clin. Chem. *36,* 1364 (1990).

134. Niederwieser A., Staudenmann W., Wetzel E., v knize: *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines* (Wachter H., Curtius H. C, Pfeiderer W., ed.), sv. 1, str. 81. Walter de Gruyter, Berlin 1982.
135. Haavik J., Flatmark T.: J. Chromatogr. *257,* 361 (1983).
136. Lunte C. L., Kissinger P. T.: Anal. Biochem. *129,* 377 (1983).
137. Lunte C. L., Kissinger P. T.: Methods Enzymol. *122,* 300 (1986).
138. Heales S., Hyland K.: J. Chromatogr. *494,* 77(1989).
139. Dewey V. C, Kidder G. W.: Methods Enzymol. *18B,* 618(1971).
140. Leeming R. J., Blair J. A.: Biochem. Med. *11,* 122 (1974).
141. Baker H., Frank O., Shapiro A., Hutner S. H.: Methods Enzymol. 66,490 (1980).
142. Leeming R. J., Hall S. K., Friday H., Hurley P., Green A.: Adv. Exp. Med. Biol. *338,* 267 (1993).
143. Milstien S., Kaufman S., v knize: *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines* (Curtius H. C, Pfeiderer W., Wachter H., ed.), sv. 2, str 65. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1983
144. Trehan S., Noronha J. M.: J. Clin. Biochem. Nutr. *14,* 195(1992).
145. Kaufman S.: J. Biol. Chem. *230,* 931 (1958).
146. Guroff G.: Methods Enzymol. *18,* 600 (1971).
147. Craine J. E., Hall E. S., Kaufman S.: J. Biol. Chem. 247,6082(1972).
148. Lloyd T., Markey S., Weiner N.: Anal. Biochem. *42* 108(1971).
149. Rothler F., Karobath M.: Clin. Chim. Acta *69,* 457 (1976).
150. Kuster T., Matasovic A., Niederwieser A.: J. Chromatogr. *290,* 303 (1984).
151. Curtius H. C, Kuster T., Matasovic A., Blau N., Dhondt J. L.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *153,* 715(1988).
152. Nagatsu T., Sawada M., Yamaguchi T., Sugimoto T., Matsuura S., Akino M., Nakazawa N., Ogawa H.: Anal. Biochem. *141,* 472 (1984).
153. Hey H., Rokos H.: Bio. Chem. Hoppe-Seyler *370,* 385 (1989).
154. Barak M., Merzbach D., Gruener N.: Clin. Chem. 55, 1467(1989).
155. 0giwara S., Kiuchi K., Nagatsu T., Teradaira R., Nagatsu I., Fujita K., Sugimoto T.: Clin. Chem. *38,* 1954(1992).
156. Mayersbach P., Augustin R., Schennach H., Schonitzer D., Werner E. R., Wachter H., Reibnegger G.: Clin. Chem. *40,* 265 (1994).

J. Tomandl *(Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno):* **Pterins**

The review summarizes the recent knowledge on the group of biologically active compounds called pterins. Biosynthesis of all known pterins starts from quanosine triphosphate and it is in vivo stimulated by cytokines, mainly by interferon gamma. Pterins can exist in three oxidation states, the reduced forms of which are relatively unstable. More details on the biological function are known only for some pterins. Tetrahydrobiopterin is an essential cofactor of aromatic amino acid monooxygenases and its role in the synthesis of nitric oxide has been recently studied. Neopterin is a sensitive marker of activated cell-mediated immunity and may be involved in processes mediated by oxygen radical. Molybdopterin is a component of molybdenum cofactors that participate in redox reactions. Oncopterin was found in urine of patients with malignant lymphoma and is expected to be a promising biochemical marker of some cancers. The HPLC with fluorescence or electrochemical detection are the predominating analytical methods for the determination of pterins.

Chem. Listy *93,* 107 - 119 (1999)

AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE

ALEXANDR HRABÁLEK, PAVEL DOLEŽAL, ZDENKA ŠKLUBALOVÁ, OLDŘICH FARSA A ALEŠ KREBS

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: hrabalek@faf.cuni.cz

Došlo dne 28.V. 1998

Obsah

1. Úvod
2. Transport xenobiotika přes kůži
3. Přehled používaných akcelerantů transdermální penetrace
4. Závěr

1. Úvod

Akceleranty transdermální penetrace jsou poměrně novou skupinou farmaceutických pomocných látek. Slouží k usnadnění hluboké permeace léčiv přes kůži do přilehlých tkání, nebo k systémovému podání léčiv po jejich přechodu přes kůži do krevního či lymfatického oběhu.

Transdermální aplikace je vzhledem ke značným bariérovým vlastnostem nepoškozené, intaktní kůže pro většinu léčiv poměrně obtížná. Ačkoliv pokusy o její terapeutické využití, například za použití látek lokálně dráždivých a místně prokrvujících, jsou známé již několik desítek let, teprve koncem 70. let, s nástupem poznatků z oblasti urychlovačů transdermální penetrace, začal být tento problém do značné míry zvládnutelný.

Nabízí se otázka, proč vůbec existuje snaha podávat léčiva transdermálně, když jsou k dispozici cesty jiné, přirozenější, nepoměrně jednodušší a dobře zvládnuté? Je tomu tak proto, že i nejběžnější způsob podání léčiv perorální cestou v sobě skrývá některá úskalí. K nim patří například nestandardnost vstřebávání léčiv z trávicího traktu (GIT) způsobená jeho proměnlivou momentální náplní, projevy dráždění sliznic trávícího traktu léčivem, nebo změnami GIT v důsledku probíhajícího patologického procesu. Situaci komplikuje také skutečnost, že po vstřebání z GIT procházejí léčiva nejdříve játry, v nichž dochází k metabolizaci většiny látek. Vážnou komplikací se může stát také nemožnost (po určité době od perorální aplikace) rychle ukončit převod léčiva do systémového oběhu v případě potřeby, např. při předávkování, alergické nebo jiné nežádoucí reakci. Další komplikací pak může být vlastní nutnost polykat, která u některých pacientů představuje závažný problém.

Parenterální aplikace je naproti tomu náročná na vybavení. Navíc, s výjimkou autoaplikace inzulínů, musí být prováděna kvalifikovaným zdravotnickým personálem. Téměř vždy traumatizuje pacienty, zejména dětské, protože často bývá bolestivá nejen při vlastním provedení vpichu, ale v souvislosti s tvorbou depot léčiva v místě aplikace bolest někdy i dlouhou dobu přetrvává.

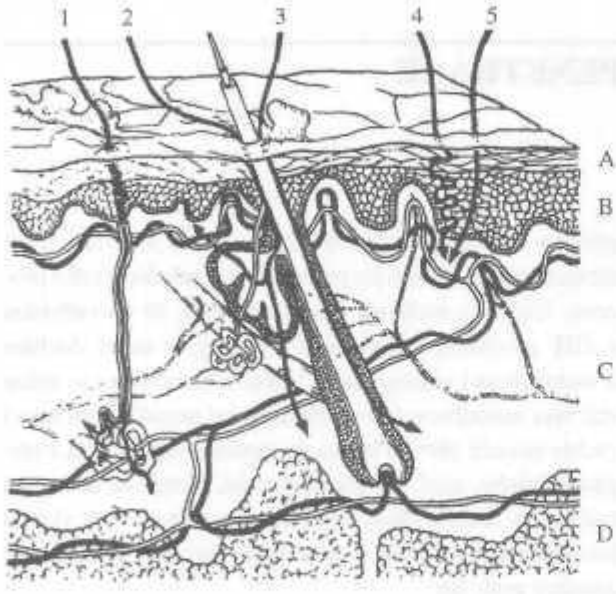
Také ostatní aplikační způsoby mají svoje nevýhody. V tomto kontextu tudíž transdermální podání léčiv významně rozšiřuje možnosti terapie nejrůznějších chorob.

2. Transport xenobiotika přes kůži

Mluvíme-li o transdermálním podání léčiv, je nutné zmínit se o stavbě kůže a možných cestách přechodu látek přes kůži. Na schematizovaném průřezu kůží[1] (obr. 1) je znázorněno celkem pět možných cest průniku (penetrace) léčiva do kůže a průchodu přes její struktury (permeace) do cévního řečiště.

V zásadě existuje několik rozdílných způsobů urychlení průchodu léčiva přes kůži. V současné době je běžné využití keratoplastik (močovina, salicylová kyselina), lokálního prokrvení kůže (deriváty kyseliny nikotinové), aplikace pomocí náplastí a nepropustných bandáží, optimalizace koncentračního spádu difuzibilní formy léčiva, malých inkluzních útvarů s obsahem léčiv (lipozómy, apod.) a tvorba lipofilních solí či lipofilních proléčiv.

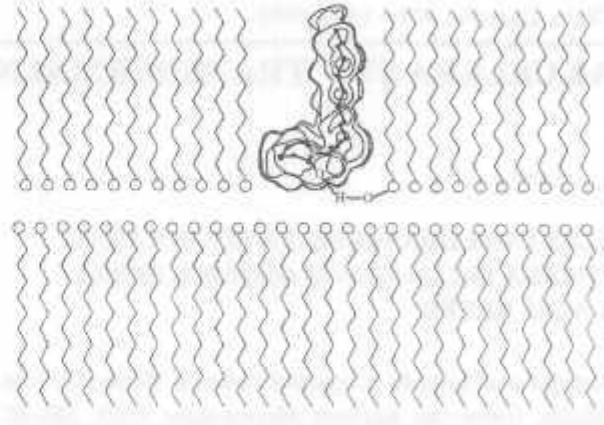
Urychlovače, neboli akceleranty transdermální penetrace, představují další alternativu. Jejich úkolem je reverzibilně snížit bariérové vlastnosti kůže a umožnit průnik



Obr. 1. **Schematický řez kůží;** A - stratum corneum; B - živá epidermis; C - dermis; D - podkožní tuk; 1 - cesta potní žlázkou; 2 - cesta mazovou žlázkou; 3 - transfolikulární cesta; 4 - intercelulární cesta; 5 - transcelulární cesta

léčiva přes kůži v předem odhadnutelném množství a čase, což znamená kvalitativní posun ve srovnání se zmíněnými keratoplastiky či derivancii. Proto se akceleranty penetrace brzy staly bouřlivě se rozvíjející skupinou látek, která nachází využití při tvorbě topických a transdermálních léčivých přípravků. Na jejich vlastnosti jsou kladeny vysoké nároky. Stejně jako ostatní pomocné farmaceutické látky musí být nedráždivé, netoxické a nealergizující a nesmějí mít vlastní farmakologickou aktivitu. Nástup jejich akceleračního účinku by měl být navíc rychlý, po odstranění léčivého přípravku musí dojít k rychlé obnově bariérových vlastností kůže, urychlení přestupu léčiva musí být pouze jednosměrné. Ideální akcelerant pak samozřejmě musí být kompatibilní s léčivy a ostatními součástmi léčivého přípravku, v neposlední řadě by také měl být levný. Všechny dosud používané akceleranty uvedeným požadavkům vyhovují jen částečně. Je ostatně pravděpodobné, že látka, která by v úplnosti vyhověla všem zmíněným požadavkům, bude jen těžko nalezena.

Mechanismus účinku akcelerantů není v současné době spolehlivě objasněn. Vzhledem k tomu, že se jedná o chemicky nejednotnou a velmi různorodou skupinu látek, je působení urychlovačů pravděpodobně založeno na jejich nespecifických interakcích se strukturami kůže. Soudí se, že mechanismus účinku akcelerantů spočívá v jednom ze tří následujících efektů, popřípadě v jejich kombinaci:



Obr. 2. **Mechanismus účinku Azonu**

a) účinkem akcelerantu dochází k rozrušení organizované struktury lipidů v intercelulárních prostorech kůže, zejména její povrchové, rohové vrstvy (stratum corneum),

b) akcelerant interaguje s intracelulárními proteiny kůže,

c) akcelerant optimalizuje hodnotu rozdělovacího koeficientu léčiva mezi léčivým přípravkem a kožními membránami.

Působení akcelerantů na stratum corneum shrnul Barry[2] již v roce 1987 do těchto základních bodů:

a) všechny urychlovače transdermální penetrace desintegrují lipidové vrstvy kůže a zvyšují tak jejich fluiditu. Méně rigidní struktura kůže je pak pro léčiva propustnější,

b) některé akceleranty interagují s intracelulárními proteiny stratum corneum, především s α-keratinem. Nabotnalými buňkami potom polární léčiva procházejí lépe,

c) difuzní odpor rohové vrstvy je do značné míry ovlivněn její hydratací. V hydratované kůži jsou mezibuněčné prostory méně viskózní, voda kompetuje na vazebných místech membrán a jejich difuzní odpor klesá.

Některé urychlovače se akumulují jak v intercelulárních, tak v intracelulárních prostorech kůže, přičemž opět působí jedním z výše uvedených mechanismů. V současné době převažuje názor, že cesta intercelulární je snadnější a pro většinu léčiv významnější, než komplikovanější cesta intracelulární. Opět je diskutován i význam cesty transfolikulární.

Jedním z prvních moderních a dnes již nejlépe prostudovaných akcelerantů je Azon (N-dodecylazacykloheptan--2-on). Nejnovější názor na mechanismus jeho účinku vychází z poznatku, že jeho stabilní konformace typu „soup spoon" se zakotvuje vodíkovými můstky na vnější, polární straně lipidické dvojvrstvy intercelulárních prostorů, a to takovým způsobem, že příslušný alkyl směřuje dovnitř (obr. 2) a činí tak tuto dvojvrstvu více hydrofilní a méně

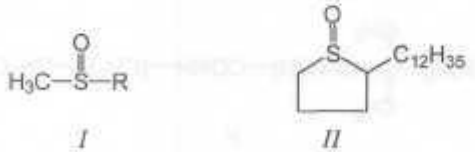
viskózní[3]. Proto Azon usnadňuje penetraci polárních i nepolárních látek.

3. Přehled používaných akcelerantů transdermální penetrace

Akceleranty transdermální penetrace jsou skupinou chemicky velmi nejednotnou. Přesto lze vysledovat v jejich strukturách jednotící strukturní prvky. Látky s vlastnostmi akcelerantů transdermální penetrace velmi často obsahují fragment základních přirozených hydratačních faktorů, fyziologicky přítomných v kůži. Nejjednodušší částí vysledovatelnou v akceleračně účinných látkách je fragment X-CO-N=, kde X je $-CH_2-$, $-NH_2$, -NH-, přičemž by v molekule měl být vždy přítomen dlouhý alkylový či alkenylový (nejčastěji C_8 až C_{20}), přímý nebo rozvětvený řetězec, ve kterém mohou existovat další izosterní obměny.

3.1. Alkylsulfoxidy

Jedná se o látky vesměs výborně mísitelné s vodou, které jsou vynikajícími rozpouštědly léčiv. Nejznámější z této skupiny je dimethylsulfoxid, který byl donedávna jedním z nejpoužívanějších akcelerantů v pokusech *in vitro*. Mechanismus jeho akceleračního účinku spočívá v tom, že díky své polaritě interaguje s hydrofilními skupinami lipidů a vytváří s nimi vodíkové vazby. Tím vytěsňuje z vazby vodu, vytváří okolo těchto skupin solvatační obal a rozvolňuje tak organizované vrstvy lipidů v intercelulárním prostoru[4]. Rozšíření hydrofilní oblasti v tomto prostoru pak usnadňuje průnik hlavně hydrofilním látkám. Další možný mechanismus urychlení transdermálního průniku těmito látkami spočívá ve značné rozpouštěcí schopnosti sulfoxidů, spojené s možnou tvorbou dep léčiv v kůži. V poslední době se od používání dimethylsulfoxidu upouští pro jeho vlastní farmakologické účinky[5]. Navíc je v organismu metabolizován na dimethylsulfid, který vydechován působí nepříjemně na okolí. Z tohoto důvodu byly připraveny alkylmethylsulfoxidy (*I*), kde R je přímý, nerozvětvený alkyl. Testováním homologické řady alkylmethylsulfoxidů bylo zjištěno, že nejvýraznější urychlovací efekt na hydrofilní a ionizovaná léčiva vykazuje decylmethylsulfoxid[6] (*I*, R = decyl-). Zajímavou strukturní obměnu představují cyklické sulfoxidy, z nichž jako zástupce je možné uvést 2-dodecylthiolan-1-oxid[7] *(II)*, použitý při topické aplikaci indomethacinu.



I *II*

3.2. Alkoholy

Alkoholy splňují jednu z podmínek, kterým obvykle mají akceleranty transdermální penetrace vyhovovat. Jsou totiž výbornými rozpouštědly léčiv. Pro tuto vlastnost jsou často součástmi topických lékových forem. Zároveň je však těžké v konkrétních případech rozhodnout, zda je alkohol v léčivém přípravku přítomen pro svoji funkci rozpouštědla, kosolvens, akcelerantu či koakcelerantu. Alkoholy se často používají ve směsích s dalšími alkoholy či jinými akceleranty, hlavně ze skupiny mastných kyselin a jejich esterů.

Akcelerační efekt ethanolu je pro léčiva nejvyšší při koncentracích mezi 40 až 60 procenty[8]. Mechanismus jeho účinku spočívá pravděpodobně v delipidizaci kůže[9]. Vysoké koncentrace ethanolu pak denaturují bílkoviny a kůže se stává porézní membránou[10].

V případě ostatních alkoholů se zde jako akceleranty transdermální penetrace uplatňují hlavně alkoholy nižší, s počtem uhlíků v molekule do šesti. Jako příklad využití směsi těchto alkoholů může být zmíněna systémová aplikace antitusik, expektorancií, myorelaxancií a analgetik[11].

Použitelné jsou však též alkoholy vyšší, od dekanolu až po linoleylalkohol. Zatímco hydrofilní alkoholy působí pouze mechanismem zvyšování rozpustnosti léčiva a následným zvyšováním koncentračního spádu jejich difuzibilní formy, vyšší lipofilní alkoholy extrahují lipidy a proteiny ze stratum corneum. Studium závislosti mezi délkou řetězce, větvením, polohou hydroxylu a účinkem u těchto látek ukázalo nejvyšší efekt 1-butanolu a 2-propanolu ve směsi (1:1) S 2-propylmyristátem[12].

Z méně běžných alkoholů byly v literatuře jako akceleranty transdermální penetrace popsány tetrahydrofurfurylalkohol[13] pro urychlení penetrace glukokortikoidů, 1,1-dimethyl-2-cyklohexylethanol[14] pro lidokain, a merkaptoethanol pro 6-karboxyfluorescein[15].

3.3. Dioly a acetaly

Látky typu diolů jsou používány často jako rozpouštědla léčiv či jiných součástí léčivých přípravků. Jejich působení jako akcelerantů transdermální penetrace není příliš výrazné, spíše se uvádějí jako tzv. koakceleranty[16]. Mechanismus jejich účinku spočívá s největší pravděpo-

dobností ve zvýšení koncentrace léčivé látky na kůži, popřípadě v kůži, a tím ve zvýšení koncentračního spádu léčiva[17]. Nejpoužívanějšími látkami z této skupiny jsou propylenglykol[18], 1,3-butandiol[19], 2,3-butandiol a 2-methyl-2,4-pentandiol[20].

Mezi acetaly - akceleranty odvozené od glykolů a v literatuře nepříliš frekventované - lze zařadit deriváty dioxolanu[21] a 1,3-dioxanu[22], použité pro urychlení průniku indomethacinu. Také zde můžeme sledovat základní strukturní prvek, který můžeme nalézt ve většině molekul s vlastnostmi akcelerantů transdermální penetrace. Je jím dlouhý alkylový, rozvětvený či nerozvětvený řetězec. Konkrétně byl zmiňován 2-geranyl-l,3-dioxolan, resp. 2-nonyl-l,3--dioxolan a 2-nonyl-1,3-dioxan.

3.4. Mastné kyseliny a jejich estery

V literatuře byly zaznamenány údaje o akceleračním působení snad celé homologické řady karboxylových kyselin. Za účelné však považujeme jmenovat pouze ty látky, které mají naději stát se použitelnými akceleranty. To znamená, že z našeho výčtu vyjmeme kyseliny s uhlíkovým řetězcem kratším než 8 uhlíků, protože tyto látky jsou buď příliš dráždivé, nebo jejich organoleptické vlastnosti nejsou vyhovující.

Mezi takto vymezenými mastnými kyselinami se opět vyskytují takové, které mají dlouhý nasycený či nenasycený řetězec. Mohou tudíž kompetovat s endogenními mastnými kyselinami v lipidických strukturách mezibuněčných prostorů a způsobovat jejich rozvolňování[23]. Takto byly testovány kyseliny dekanová a dodekanová (laurová), konkrétně na urychlení průniku testosteronu, indomethacinu a 5-fluorouracilu[24]. Kyselina laurová může rovněž ovlivňovat konformaci proteinů stratum corneum[25]. Obsažný přehled o použití mastných kyselin jako akcelerantů transdermální penetrace je možno nalézt v publikaci Williamse a Barryho[26]. Dobře prozkoumáno je působení kyseliny olejové, která svým středovým uspořádáním Z narušuje organizované lipidové struktury, a tím zvyšuje jejich fluiditu[27]. Byla použita k usnadnění průniku estradiolu, 5-fluorouracilu[28] a tetrahydrokanabinolu[29]. Z dalších nenasycených mastných kyselin je popsána jako akcelerant undecylenová kyselina[30], linolenová kyselina pro urychlení průniku analgetik-anodyn[31] a kyselina ikosapentaenová[32] v přípravcích určených k léčbě bércových vředů.

Mechanismus akceleračního působení esterů mastných kyselin není přesně znám. Estery nižších kyselin, jako např. butylacetát a pentylacetát, jsou velmi dobrými rozpouštědly tuků. Je tedy pravděpodobné, že právě tato vlastnost se na jejich akceleračním působení bude podílet ze značné části[33]. Jako koakcelerant a rozpouštědlo léčiv je často používán 2-propylmyristát. Sám o sobě příliš aktivním akcelerantem není[34], jeho účinek se však významně zvyšuje přídavkem 2-propanolu[35]. Popsán byl jeho pozitivní efekt například na kožní průnik fysostigminu[36] a azidoťhymidinu[37], avšak vždy pouze ve funkci přídavku k dalším akcelerantům. Z dalších látek je možné zmínit methylestery kyseliny nonanové a dekanové, použité pro urychlení průniku vitamínu D_3, erythromycinu a steroidů[38], dále rovněž propylenglykoldipelargonat[39], estery cholinu s vyššími mastnými kyselinami[40], mono- a diestery glycerolu s vyššími mastnými kyselinami a v neposlední řadě estery kaprylové kyseliny, diestery kyseliny adipové a sebakové[41].

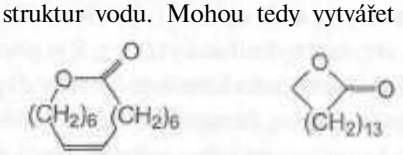
3.5. Deriváty hydroxykyselin

Akceleranty tohoto typu byly popsány v Japonsku v roce 1989, když bylo zjištěno pozitivní ovlivnění průniku indomethacinu hexadecyllaktátem[42]. O dva roky později byl nalezen podobný vliv dodecyllaktátu na průnik isosorbitdinitrátu[43] a tetradecyllaktátu na permeaci pivaloyldopaminu[44]. O-Dodecylcitronová kyselina[45] byla v Japonsku patentována jako urychlovač průniku isosorbitdinitrátu. Z dalších derivátů hydroxykyselin je možné uvést 8-cyklopentadecenolid[46] *(III)* a cyklopentadekanolid[47] *(IV)*, použitý k urychlení přestupu nifedipinu. Akceleranty tohoto typu jsou zajímavé tím, že jsou použitelné pro nasální a vaginální aplikaci.

Z amidů hydroxykyselin bylo zaznamenáno použití panthenolu[48] *(V)* pro urychlení permeace 6-karboxyfluoresceinu.

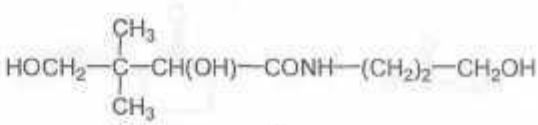
3.6. Amidy kyselin

Tato vynikající rozpouštědla léčiv ztrácejí jako akceleranty v posledních letech na významu. Nejstudovanějšími látkami z této skupiny jsou dimethylformamid a dimethylacetamid. Interagují s proteiny v korneocytech a vytlačují z těchto struktur vodu. Mohou tedy vytvářet depa léčiv



III

IV



V

v kůži, a tím napomáhat rychlejšímu a mohutnějšímu transdermálnímu průniku. Jsou-li použity ve vysokých koncentracích, interagují rovněž s intercelulárními lipidy[49]. Jejich účinnost je nižší než účinnost dimethylsulfoxidu. Z amidů vyšších mastných kyselin, které nemají ve své molekule heterocyklus, stojí za zmínku N,N-dipropyldodekanamid[50], použitý pro akceleraci průniku triamcinolonu, dimethyldodekanamid pro spironolakton[51] a butyldodecylacetamid[52]. Tyto látky byly v daných souvislostech účinnějšími akceleranty než Azon, o kterém bude pojednáno v kapitole o e--laktamech. Zvláštním typem akcelerantů, které lze do této skupiny zahrnout, jsou acylderiváty aminokyselin, jako například dodekanoylsarkosin[53], použitý pro transdermální aplikaci norethisteronu, dodekanoylglycin[54] pro indometacin a dodekanoylprolin[55] pro β-laktamová a aminoglykosidová antibiotika, antineoplastika a antivirotika.

Dalším z testovaných amidů je diethylamid 3-methylbenzoové kyseliny[56], který byl použit k ovlivnění rychlosti průniku antiviroticky účinné sodné soli fosfonomravenčí kyseliny. Podobná látka, krotamiton[57] (*VI*), byla použita k urychlení průchodu 4-bifenyloctové kyseliny (aktivní metabolit fenbufenu) a nesteroidních protizánětlivých látek. Z amidů mastných kyselin pak byly publikovány údaje o akceleračním působení acylderivátů morfolinu a dilauroylpiperazinu. Výrazně nejúčinnějším z této skupiny amidů se ukázal být oleylmorfolin[58].

Závislost akceleračního účinku na struktuře studovala Michniak[59] ve skupině hydroxyalkyl- či alkoxyalkyldodecylamidů kyseliny octové, pivalové a isomáselné, bisacetyl- a bisisobutyryldodecylamidu, derivátů kyseliny malonové, dodecylkarbamové a bishydroxyethylamidu dodekanové kyseliny. Účinnost akcelerantů klesala se zvyšující se polaritou molekuly. Byla však závislá nejen na lipofilitě testovaného akcelerantu, ale také na konformaci jeho molekuly.

Poslední skupinu amidů alifatických kyseliny představují thioamidy obecného vzorce[59] *(VII),* kde X - O nebo $-(CH_2CH_2)-$.

3.7. Aminokyseliny a jejich deriváty

L-Aminokyseliny jsou popisovány jako akceleranty transdermální penetrace pro celou řadu léčiv, velmi často pro steroidní látky. Mechanismus jejich účinku spočívá pravděpodobně v ovlivnění keratinové složky kůže. Jejich účinnost je závislá na aktuální hodnotě pH vehikula, v němž jsou dispergovány. Nejvyšší aktivitu na průnik levonorgestrelu například vykazoval L-iLEU[60], a to při pH 6. Zajímavé je použití N-alkyl- a N-acylderivátů cysteinu pro zvýšení penetrace léčiv do nehtů[61]. Z dalších typů aminokyselin můžeme ještě zmínit estery 6-aminoheptanové kyseliny[62] *(VIII),* kde R = C_8 až C_{12} alkyl, testované *in vitro* s poměrně dobrým výsledkem na urychlení průniku theofylinu, podobně jako estery kyseliny tranexamové[62] *(IX)* s esterovou částí stejnou jako v případě *(VIII).*

Dodecylester prolinu[63] je jako akcelerant patentován v kombinaci s polárními kapalnými vehikuly (ethanol, glykoly aj.) pro uvolňování propranololu.

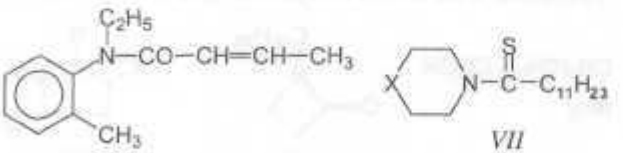
Ze substituovaných derivátů α-aminokyselin byl dále testován dodecylester dimethyl α-alaninu[64] na urychlení průniku indomethacinu a hydrokortizonu.

3.8. Deriváty ω-aminokyselin

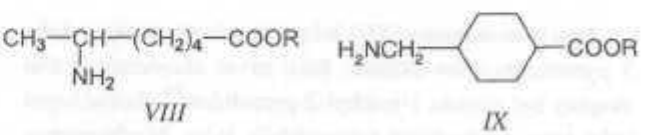
Do skupiny derivátů ω-aminokyselin lze zařadit značné množství struktur dosud publikovaných akcelerantů. Zároveň je můžeme považovat za akceleranty v současné době nejstudovanější a také nejúčinnější. Jedná se o skupinu velmi rozmanitou, v níž můžeme nalézt jak deriváty esenciálních aminokyselin (glycinu či lysinu), tak deriváty (3--alaninu nebo γ-aminomáselné kyseliny, ale i kyseliny e--aminokapronové. Asi nejpočetnější a v literatuře nejcitovanější je skupina cyklických derivátů aminokyselin - laktamů. O této skupině transdermálních akcelerantů lze nalézt velmi mnoho citací, svým počtem značně přesahujícím rámec této práce, proto jejich výčet nebude úplný.

K prvním transdermálním akcelerantům odvozeným od ω-aminokyselin patří estery lysinu[65], v nichž je esterová část tvořena alkylem C_5 až C_{22}. Zajímavostí těchto látek je to, že jsou použitelné pro přestup látek přes kůži, ale i sliznice, včetně žaludeční. Rovněž u esterů sarkosinu[66] tvoří esterovou část alkyly delší než s 10 uhlíkovými atomy.

Jako velmi slibné akceleranty transdermální penetrace se jeví aminoestery, zejména dodecylester N,N-dimethylaminooctové kyseliny[67]. Akcelerační účinnost vzrůstá



VI *VII*



VIII *IX*

s délkou alkylových řetězců na dusíku, aniž by vzrůstala toxicita a dráždivost[68]. Decylester téže aminokyseliny byl s pozitivním výsledkem použit[69] pro urychlení vstřebávání indomethacinu. Poměrně účinnými akceleranty jsou dále estery ε-aminokapronové kyseliny[70] *(X;* R = Cg až C_{16} přímý nebo rozvětvený alkyl, $n = 4$), které byly testovány na urychlení průniku theofylinu. Ukázaly se být asi desetkrát účinnějšími akceleranty, než akceleranty doposud v literatuře uváděné. Analogické estery vyšších ω-aminokyselin[71] *(X; n* = 5, 6) vykázaly podstatně menší účinnost, která se navíc snižovala s rostoucí vzdáleností mezi aminoskupinou a karbonylem příslušné ω-aminokyseliny.

Akceleračně účinné jsou též soli N-alkylovaného sarkosinu. Sodná sůl N-dodecylsarkosinu[72] významně urychluje transdermální průnik antiflogistika ketotifenu, při současném použití 2-propylmyristátu jako koakcelerantu.

3.8.1. β-*Laktamy*

Z dalších látek je třeba jmenovat β-laktamy. 1-Dodecylazacyklobutan-2-on[62] *(XI)* byl použit jako akcelerant pro hydrokortison-21-acetát a s pozitivním výsledkem porovnán s Azonem (viz kap. 3. 10. 4. zmiňující se o ε-laktamech).

3.8.2. γ-*Laktamy*

Strukturní základ další skupiny, γ-laktamů, je možno znázornit obecným vzorcem *(XII),* kde R = H, alkyl C_1 až C_{12}, alkenyl, CH_2CH_2OH a R^1 = H, alkyl, OH, R^2 = H, CH_3, COOH, $COOR^3$. $R^3 = C_8$ až C_{12} alkyl. Látky tohoto typu mají zásadní vliv na hydrataci kůže. Deriváty pyrrolidonu jsou součástí tzv. přirozeného hydratačního faktoru, který rovněž ovlivňuje charakteristické mechanické vlastnosti (pružnost, pevnost) a difuzivitu vitální kůže. Vzhledem k tomu, že právě stupeň hydratace kůže je jedním ze základních faktorů usnadňujících průnik látek kůží, lze vodu považovat za nejfyziologičtější akcelerant transdermální penetrace[73]. Proto látky, které hydrataci kůže navozují nebo podporují, budou zřejmě také usnadňovat průnik léčiv.

Deriváty 2-pyrrolidonu

Jsou to sloučeniny *(XII),* kde není substituována poloha 5 pyrrolidonového skeletu. Jako první akcelerant z této skupiny byl popsán 1-methyl-2-pyrrolidon[74]. Rovněž tyto látky jsou vynikajícími rozpouštědly léčiv. Mechanismus účinku těchto akcelerantů souvisí pravděpodobně s vytvářením rezervoáru léčiva v nejsvrchnější vrstvě kůže (stratum corneum), protože mají schopnost se v této vrstvě kumulovat. Toto chování bylo potvrzeno u 1-methyl-, 1-hexyl- a 1-dodecylpyrrolidonu[75]. 1-Alkyl-2-pyrrolidony byly testovány na urychlení průniku značného množství různých typů léčiv, např. antineoplastik, theofylinu, antiflogistik, sulfonamidů, antibiotik, antimykotik, morfinu, azidothymidinu, atd. Zvláště nadějné výsledky získal právě s posledně jmenovanou látkou Seki[76]. V pokusech *in vitro* s excidovanou kůží potkanů zjistil, že vehikulum složené z 1-methyl-2-pyrrolidonu, propylenglykolu a kyseliny olejové zvyšuje kožní průnik azidothymidinu asi 85krát.

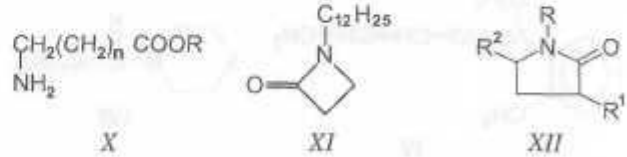
Studiem závislosti účinku na struktuře ve skupině 2-pyrrolidonů se zabýval Irwin[77]. Na urychlení průniku ibuprofenu a naproxenu dokázal, že pro daná léčiva existuje v homologické řadě alkylů substitujících dusíkový atom parabolická závislost, s maximem účinku u oktyl- a decylderivátů.

Zavedením alkylu do polohy 3 základního skeletu byly získány rovněž účinné akceleranty. Aktivitu pozitivně modifikují kratší substituenty (methyl-, ethyl-, butyl-) v poloze 1. Tak např. 1-propyl- a 1-butyl-3-dodecyl-2-pyrrolidony jsou velmi účinnými akceleranty pro indomethacin[78]. Z dalších alkylderivátů je možné zmínit 5-methyl- a 1,5-dimethyl-2-pyrrolidon. Širokému uplatnění pyrrolidonů v praxi však brání jejich nepříznivý účinek na kůži, na které vyvolávají erytém[79]. Z testovaných 1-alkenylderivátů je možné zmínit 1-vinyl-2-pyrrolidon, použitý k transdermální aplikaci kyseliny acetylosalicylové[80].

Poněkud odlišným akcelerantem z této skupiny je metabolit methylpyrrolidonu 3-hydroxy-1-methyl-2-pyrrolidon[81], méně toxický a účinnější pro penetraci léčiva cliochinolu.

Deriváty 2-pyrrolidon-5-karboxylové kyseliny

Bylo zmíněno, že tato kyselina je součástí přirozeného hydratačního faktoru kůže a je proto v lidské kůži fyziologicky přítomná. Jako akceleranty se však používají hlavně její na dusíku substituované deriváty, nebo její estery. Odpovídají tedy obecnému vzorci *XII.* Např. 1-dodecyl-2-pyrrolidon-5-karboxylová kyselina byla s velmi dobrým



X *XI* *XII*

výsledkem použita k transdermální pasáži antimykotického antibiotika griseofulvinu[82], decyl-, dodecyl- a oleylestery této kyseliny jsou výhodnými urychlovači pro klonidin a enalapril v testech *in vitro* prováděných na hadí kůži[83].

3.8.3. δ-*Laktamy*

Zajímavými akceleranty jsou δ-laktamy, které mají společné strukturní prvky se sulfoxidy. Jsou to deriváty 3--thiamorfolinonu[84] *(XIII;* R = dodecyl, *n* = 1,2).

Dalšími akceleranty tohoto typu jsou deriváty morfolin-2,3- (*XIV*), resp. 3,5-dionů[85] *(XV)*. Autoři těchto strukturálních obměn je označili za akceleranty středně účinné. Substituenty R byly tvořeny vždy C_{12} a C_{14} přímými alkyly. Alkenylderiváty 2-piperidonů byly testovány na urychlení průniku cytostatika 6-merkaptopurinu[86]. Jako alkenyly byly použity isoprenoidy *(XVI, XVII),* přičemž geranylderivát *(XVI)* byl účinnější než farnesylderivát *(XVII)*. 8-Laktamy jsou však obecně méně účinnými akceleranty, než látky ze skupiny ε-laktamů.

3.8.4. ε-*Laktamy*

N-Dodecyl-ε-kaprolaktam (Azone®, 1-dodecyl-2-azepanon)

Z významných ε-laktamů je potřebné jmenovat již zmíněný N-dodecyl-ε-kaprolaktam (Azone®, 1-dodecyl-2--azepanon). Byl patentován v USA již roce 1976 *(XVIII)* (cit.[87]), avšak teprve za několik let se v literatuře objevily první publikace zabývající se jeho akceleračními vlastnostmi. V současné době jde počet těchto prací do stovek a účinek Azonu byl testován na urychlení nepřeberné řady léčiv. Azon je efektivní urychlovač pro široký okruh látek hydrofilní i lipofilní povahy, s výjimkou vysoce lipofilních látek[88,89]. Účinným akcelerantem je však pouze z polárního prostředí, v prostředí lipofilním (parafinový olej, rostlinné oleje apod.) je jeho účinek inhibován[90]. Mechanismus účinku[3] Azonu byl již zmíněn v obecné části této práce.

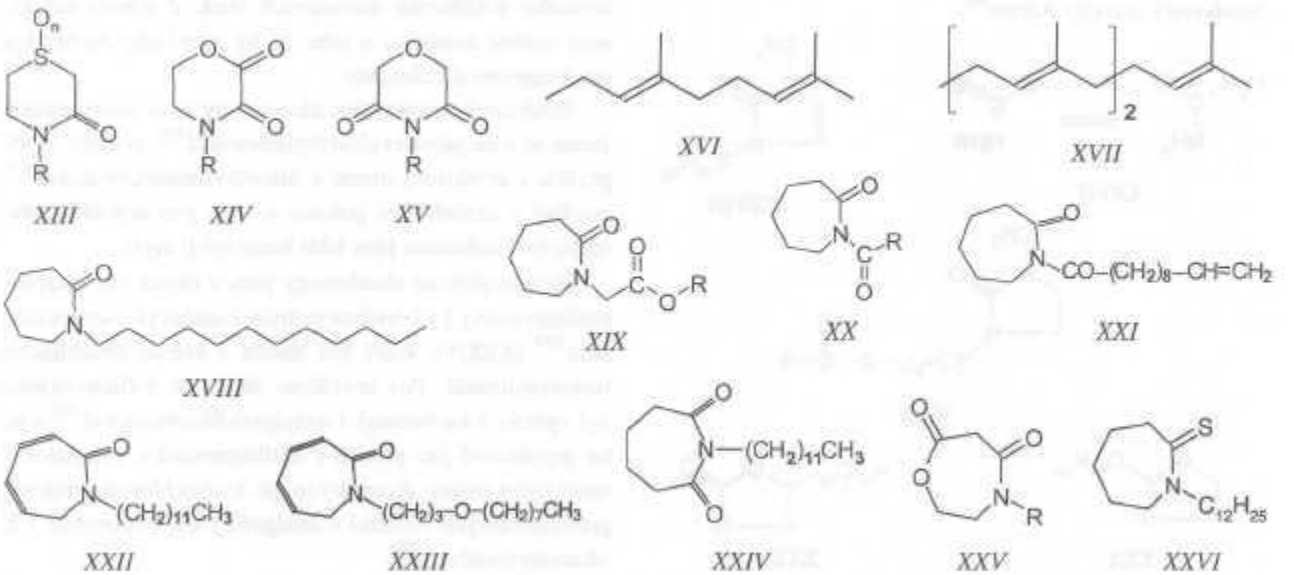
Strukturní obměny, v literatuře označované jako urychlovače typu „azone-like", se týkají jak heterocyklické části, tak bočního řetězce. Michniak se spolupracovníky[85] publikovali řadu obměn Azonu. Sledovali sloučeniny typu N-alkoxykarbonylmethyl-2-azepanonu *(XIX,* R = C_{12} a C_{14} alkyl) a N-acyl-2-azepanonu *(XX,* R = C_9, C_{11} a C_{13} alkyl). Acylderiváty byly podstatně účinnějšími akceleranty.

Další typ obměn postranního řetězce spočíval v zavedení dvojných vazeb. Jednodušším příkladem z takových popsaných látek je 1-undecenoyl-2-azepanon[91] *(XXI),* použitý pro urychlení průniku haloperidolu. Ze složitějších byly připraveny a testovány geranyl- *(XVI)* a farnesylazony *(XVII),* společně s totálně hydrogenovanými analogy[86].

Jako další účinné struktury byly popsány 1 -dodecylazacykloheptа-3,5-dien-2-on *(XXII),* 1-(3-oktyloxypropyl)azacykloheptan-3,5-dien-2-on[92] *(XXIII)* a 1-dodecylaza-cykloheptan-2,7-dion[93] *(XXIV)*.

Složitější zásah do struktury Azonu představují rovněž významně akceleračně účinné deriváty N-alkyl-l,4-diazepan-5,7-dionu[85] *(XXV,* R = C_{10} a C_{12} alkyly).

Jako poslední z těchto akcelerantů typu „azone-like" je možné zmínit thioderivát Azonu - N-dodecylazepan-2--thion[59] *(XXVI)*.

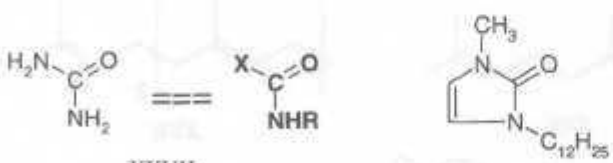


3.9. Deriváty močoviny

Močovina, stejně jako deriváty pyrrolidonu, je součástí fyziologických hydratačních kožních faktorů. Nepřekvapuje tedy, že byla rovněž testována jako akcelerant transdermální penetrace, uvědomíme-li si, že její použití jako keratolytika a keratoplastika (látky používané k rozvolnění ztvrdlé a zrohovatělé kůže) je již navíc dlouho známé. Využití močoviny a jejích derivátů je založeno na jejich proteolytickém působení, které lze podstatně zvýšit použitím vhodné přísady, např. propylenglykolu[94]. Používanými akceleranty jsou jednak močovina samotná, v poslední době ovšem hlavně její deriváty, včetně izosterních analogů, mezi které je možné zařadit celou řadu sloučenin, především cyklických. Při pozorném pohledu na struktury nejpoužívanějších akcelerantů ze skupiny cyklických derivátů ω-aminokyselin (pyrrolidony, azon a azone-like urychlovače) zjistíme, že právě tyto sloučeniny lze též považovat za izostery močoviny *(XXVII),* což lze z hlediska farmaceuticko-chemického třídění akcelerantů transdermální penetrace považovat za klíčové.

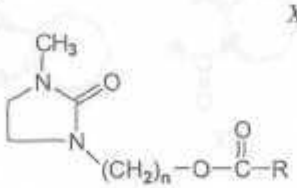
Močovina byla použita k urychlení vstřebávání hydrokortisonu[95]. Její mechanismus účinku je vysvětlován jednak hydratací rohové vrstvy pokožky, po delším působení pak keratolytickým efektem. Močovina, dodecylmočovina, didodecylmočovina a difenylmočovina byly testovány na urychlení průniku 5-fluorouracilu, avšak s nevalným výsledkem. Přidáním propylenglykolu se akcelerační aktivita zvýšila asi šestkrát[94].

Jako biodegradovatelné urychlovače byly syntetizovány cyklické nenasycené analogy močoviny, z nichž některé dosahovaly aktivity Azonu[96].

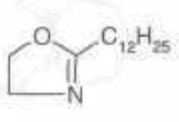


XXVII

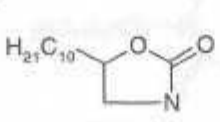
XXVIII



XXIX



XXX



XXXI

Deriváty 2-imidazolinonu, konkrétně 1-dodecyl-3-methyl-2-imidazolinon[97] *(XXVIII)* byly s úspěchem použity pro urychlení průniku β-laktamových a aminoglykosidových antibiotik, antineoplastik a antivirotik. Strukturálně poněkud odlišným typem imidazolinonových akcelerantů jsou 1-alkylkarbonyloxyalkyl-3-methyl-2-imidazolinony[98] *(XXIX,* R = C_6 až C_{18} alkylový řetězec, *n* = 1,2), použité pro akceleraci průniku antibiotik a antineoplastik.

Z izosterních derivátů močoviny můžeme uvést deriváty oxazolinu[99] *(XXX)* a oxazolidinonu[100] *(XXXI).* První z nich je účinný se širokou řadou léčiv a je použitelný také jako stimulátor růstu rostlin, druhý je označován za vynikající urychlovač, a to i ve srovnání s Azonem.

3.10. Aminy

Zajímavé jako akceleranty jsou cyklické aminy, v literatuře označované jako analoga Azonu. Jedná se o tři terciární aminy, kde dusíkový atom je součástí cyklu[101] – 1-dodecylazetidin, 1-dodecylpyrrolidin a 1-dodecylpiperidin. Dalším heterocyklickým aminem, který je obdobou cyklického amidu uvedeného dříve, je N-dodecylmorfolin. Tyto cyklické aminy byly porovnávány s aminy acyklickými, s polárními hydroxylovými skupinami v řetězcích; jsou to dodecylbis(hydroxyethyl)amin, dodecylethylhydroxyalkylaminy *(XXXII,* X = $HOCH_2$-, CH_3OCH_2-, $(CH_3O)_2CH$-) a dodecylhydroxyalkylaminy *(XXXIII,* X = $HOCH_2$-, CH_3OCH_2-, $(CH_3O)_2CH$-). Výsledkem provedených testů bylo zjištění, že odstraněním karbonylové skupiny klesá výrazně účinnost, cyklizací řetězce účinnost rovněž klesá a nejzávažnější zjištění spočívalo ve značné dermální dráždivosti testovaných látek. Z tohoto důvodu není možné uvažovat o tom, že by tyto látky mohly být použitelnými akceleranty.

Strukturně zajímavými akceleranty jsou oxidy aminů. Jedná se o dicyklohexylmethylaminoxid[102], použitý v přípravku s erythromycinem a dimethylstearylaminoxid[103], použitý v modelovém pokusu *in vivo* pro urychlení přestupu hydrochinonu přes kůži bezsrstých myší.

Heterocyklické akceleranty jsou v rámci této skupiny představovány 1 -(2-hydroxyethyl)-2-undecyl-2-imidazolinem[104] *(XXXIV),* který byl použit v krému obsahujícím isosorbitdinitrát. Pro urychlení absorpce 5-fluorouracilu byl vybrán 3-karbamoyl-1-cetylpyridiniumchlorid[105] a jako urychlovač pro použití s antihistaminiky, sympatomimetickými aminy, diuretiky (např. hydrochlorothiazidem), protizánětlivými látkami a analgetiky byl doporučen 1,2-dimethylimidazol[106].

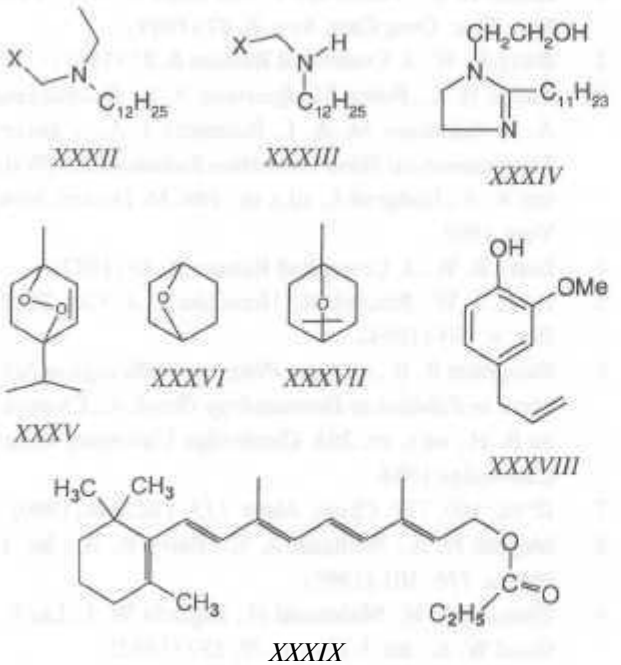
3.11. Ketony

Nižší alifatické ketony zřejmě nepůsobí přímo na strukturální jednotky rohové vrstvy kůže, ale vzhledem ke svým rozpouštěcím schopnostem zbavují pokožku lipidů, čímž snižují energetickou bariéru pro vstup léčiva do kůže. Čím jsou ketony lipofilnější, tím více je tuk odstraňován, tím více však současně dochází k projevům dráždění kůže[107]. Při použití makrocyklických ketonů dochází ovšem k obnovení fyziologických poměrů na povrchu pokožky poměrně brzy, takže lze říci, že látky takového typu nedráždí kůži do té míry, jako například aceton. Při porovnání akcelerační účinnosti makrocyklických ketonů bylo zjištěno, že jejich efekt stoupá s velikostí cyklu. V homologické řadě cyklo-undekanon → cyklopentadekanon je jednoznačně nejaktivnějším urychlovačem cyklopentadekanon[108].

3.12. Terpeny

Tato skupina akcelerantů zahrnuje jak terpeny jako chemická individua, tak také přírodní silice, tedy směsi různých terpenů a dalších látek. V této subkapitole budou zmíněny jen terpeny v podobě chemických individuí, jejichž testování bylo vedeno snahou najít látky, které by nevykazovaly vedlejší účinky dimethylsuloxidu a Azonu.

Souhrnnou práci o využití terpenů jako akcelerantů transdermální penetrace zveřejnili Williams a Barry [---]. Studovali celkem 17 různých terpenů. Terpeny uhlovodíkového typu, konkrétně limonen, pinen a karen, se ukázaly jako nejméně aktivní. O něco účinnější byly terpenické alkoholy terpineol, terpinen-4-ol a karveol a ketony karvon, pulegon, piperiton a menthon. Nejúčinnějšími z celé série testovaných látek byly cyklické ethery, jmenovitě askaridol (*XXXV*), 7-oxabicykloheptan (*XXXVI*) a eukalyptol (*XXXVII*). Jako modelový penetrant byl použit 5-fluorouracil. Mechanismus účinku terpenů jako akcelerantů spočívá pravděpodobně v narušení organizovaných lipoidních struktur a v interakci s intercelulárními proteiny.



XXXII *XXXIII* *XXXIV*

XXXV *XXXVI* *XXXVII* *XXXVIII*

XXXIX

Zingiberol (směs *cis*- a *trans*-β-eudesmolu) je patentován jako urychlovač přestupu pro prednisolon[109] a geraniol jako akcelerant v protizánětlivých přípravcích[110].

Z aromatických terpenů je možno uvést použití eugenolu[111] *(XXXVIII)* pro urychlení penetrace albuterolu.

Jako akcelerant transdermální penetrace lze použít též retinolpropionat[112] *(XXXIX),* testovaný při studiu urychlení transdermální absorpce gestagenů a estrogenů v antikoncepčních přípravcích.

3.13. Deriváty sacharidů

V literatuře byla nalezena aplikace substituovaných dextrinů jako absorpčních urychlovačů. 2-Hydroxypropyl-β-cyklodextrin (2-HPCD) byl testován jako urychlovač absorpce léčiv z jejich vodných roztoků. K velkému zvýšení permeace došlo u silně lipofilních léčiv, například 17β-estradiolu. 2-HPCD zvyšuje ionizaci molekuly léčiva a má solubilizační efekt[113].

Jako další vhodné pomocné látky pro permeaci lipofilních léčiv (kortikoidů) z vodných roztoků se ukázaly být 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrin a heptakis(2,6-di-O-methyl)cyklodextrin[114]. Jak bylo zjištěno, vlastní účinek na kožní bariéru mají dextriny pouze malý, takže se využívají spíše jako nosiče v přípravcích s řízeným uvolňováním léčiv[115].

Další skupinu představují estery sacharosy. Mají jako akceleranty transdermální penetrace celou řadu výhodných vlastností. Jsou velmi málo toxické, bezbarvé, bez jakéhokoliv zápachu a nedráždí kůži ani při opakovaném použití na stejném okrsku kůže. Publikován byl dodecylester sacharosy[116] použitý pro penetraci progesteronu a estradiolu, a také pro 5-fluorouracil[117].

Glykosidy cukrů, používané v biochemii jako neionogenní detergenty k solubilizaci membránových proteinů jsou předmětem patentové ochrany přípravku pro urychlení průniku gentamicinu[118].

3. 14. Ostatní akceleranty

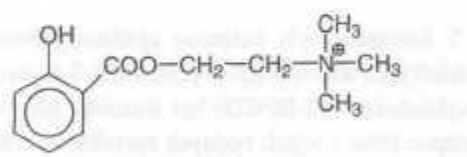
Do této části jsou zařazeny látky, kteréje obtížné zařadit do dříve uvedených strukturálních skupin.

Cholinové estery kyselinysalicylové,jmenovitě cholinsalicylát *(XL),* jsou použitelné jednak jako keratolytika, jednak jako akceleranty transdermální penetrace pro širokou paletu léčiv v přípravcích typu hydrogelů a oleokrémů.

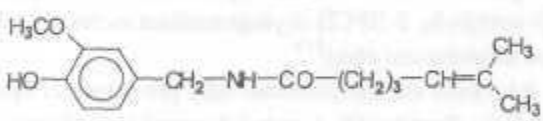
Kapsaicin (*XLI*) je znám a používán dlouhou dobu jako derivans, tj. prostředek lokálně prokrvující. Jako akcelerant transdermální penetrace je popisován v přípravku pro transdermální aplikaci salicylové kyseliny a jejího methylesteru v antirheumatických mastech.

Glycyrrhetinová kyselina (Enoxolon) (*XLII*), resp. její deriváty, byly použity jako akceleranty perkutánní penetrace v gelu s obsahem 10 % lidokainu[119]. Tento přípravek poskytoval vysoké hodnoty transdermálního průniku uvedeného lokálního anestetika, které byly řádově vyšší než u podobného přípravku s obsahem Azonu.

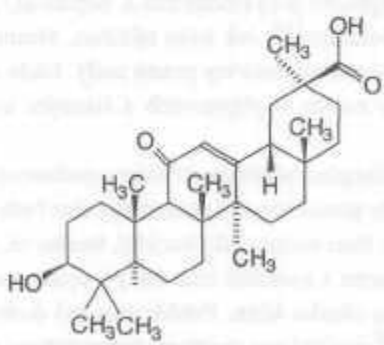
Soli karbamových kyselin (*XLIII*) jsou v testech *in vitro* velmi aktivními akceleranty pro theofylin a 5-fluorouracil,



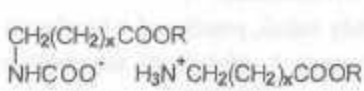
XL



XLI



XLII



XLIII

pozitivně ovlivňují průnik dalších léčiv, například acikloviru, některých nesteroidních antiflogistik, griseofulvinu, aj.[120]. Jsou odvozeny od esterů ω-aminokyselin, avšak jejich fyzikální vlastnosti jsou natolik rozdílné, že jsou zařazeny do této kapitoly. Maximálního účinku jedosaženo při $n = 4$ a R = C_8 - C_{12} alkyl.

4. Závěr

Výzkum v oblasti hledání nových akcelerantů transdermální penetrace se ukazuje být výzkumem velmi perspektivním. Důkazem toho je skutečnost, že světové farmaceutické firmy na něj vynakládají značné prostředky. Je studován například transdermální průnik ciklosporinu A, (i--blokátorů, β-laktamových antibiotik, virostatik (aciklovir, azidothymidin), antiemetik, anodyn a léčiv z dalších farmakodynamických skupin. Paleta používaných léčivých přípravků obsahujících tyto pomocné látky je rok od roku bohatší.

Práce byla uskutečněna za finanční podpory Grantové agentury ČR č. grantu 203/97/0925.

LITERATURA

1. Boddé H. E., Verhoeven J., van Driel L. M. J.: Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. *6,* 87 (1989).
2. Barry B. W.: J. Controlled Release *6,* 85 (1987).
3. Boddé H. E., Ponec M., Ijzerman A. P., Hoogstraate A. J., Salomons M. A. I., Bouwstra J. A., v knize: *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement* (Walters K. A., HadgraftJ., ed.), str. 198. M. Decker, New York 1993.
4. Barry B. W.: J. Controlled Release *6,* 85 (1987).
5. Jacob S. W., Rischel M., Herschler R. J.: Cur. Ther. Res. *6,* 134 (1964).
6. Stoughton R. B., v knize: *Progress in Biological Sciences in Relation to Dermatology* (Rook A., Champion R. H., ed.), str. 263. Cambridge University Press, Cambridge 1984.
7. JP 02, 160, 777; Chem. Abstr. *113,* 178304s (1990).
8. Megrab N. A., Williams A. C, Barry B. W.: Int. J. Pharm. *116,* 101 (1995).
9. Ghanem A. H., Mahmoud H., Higuchi W. I., Liu P., Good W. R.: Int. J. Pharm. *78,* 137 (1992).

10. Manabe E., Sugibayashi K., Morimoto Y.: Int. J. Pharm. *129,* 211 (1996).
11. PCT Int. WO 94 02119; Chem. Abstr. *120,* 173510r (1994).
12. Goldberg-Cettina M., Liu P., Nightingale J., Kurihara-Bergstrom T.: Int. J. Pharm. *114,* 237 (1995).
13. Sarkany I., Hadgraft J. W., Caron G. A., Barret C. W.: Brit. J. Dermatol. *77,* 569 (1965).
14. Austr. pat. 534,455; Chem. Abstr. *101,* 78855f (1984).
15. Ohshima T.: J. Pharmacobio.-Dyn. *7,* 648 (1984); Chem. Abstr. *102,* 32050g (1985).
16. Bouwstra J. A.: Int. J. Pharm. *52,* 47 (1989).
17. Aquiar A. 1, Weiner M. A.: J. Pharm. Sci. *58,* 210 (1969).
18. US 4, 289, 764.
19. EP 452, 837; Chem. Abstr. *116,* 67207e (1992).
20. US 4, 070, 462.
21. US 4, 861, 764; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
22. US 4, 845, 233; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
23. Golden G. M., McKie J. E., Potts R.O.: J. Pharm. Sci. 76,25(1987).
24. Aungst B. J., Blake J. A., Hussain M. A.: Pharm. Res. 7,712(1990).
25. Neubert R.: Pharm. Res. *6,* 743 (1989).
26. Williams A. C, Barry B. W.: Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. *9,* 305(1992).
27. Barry B. W.: J. Controlled Release *6,* 85 (1987).
28. Goodman M., Barry B. W.: Int. J. Pharm. *57,* 29 (1989).
29. Fabin B., Touitou E.: Int. J. Pharm. *74,* 59 (1991).
30. JP 04, 82, 829; Chem. Abstr. *117,* P 76534g (1992).
31. Mahjour M., Mauser B. E., Fawzi M.B.: Int. J. Pharm. *56,* 1 (1989).
32. DE 4, 022, 815; Chem. Abstr. *116,* P1 13576z (1992).
33. Dugard P. H., Scott R. C: Intl. J. Pharm. *28,* 219 (1986).
34. Demski R. E., Portnoff J. B., Wase A. W.: J. Pharm. Sci. *58,* 579 (1969).
35. Coldman M. F., Poulsen B. J., Higuchi T.: J. Pharm. Sci. *58,* 1098(1969).
36. Pardo A., Shiri Y., Cohen S.: J. Pharm. Sci. *80,* 567 (1991).
37. Seki T., Kawaguchi T., Juni K., Sigibayashi K., Morimoto Y.: J. Controlled Release *17,* 41 (1991).
38. Chukwumerije O., Nash R. A., Matias J. R., Orentreich N.: J. Invest. Dermatol. *93,* 349 (1989).
39. Rojas J., Falson F., Couarraze G., Francis A., Puisieux F.: S. T. P. Pharma Sci. *1,* 70 (1991).
40. Loftsson T., Somogyi G., Bodor N.: Acta Pharm. Nord. *1,* 279 (1989).
41. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
42. Kaiho F., Koike R., Nomura H., Hara H., Maruoka K., Dohi M., Kato Y.: Chem. Pharm. Bull. *37,* 1114 (1989).
43. Morimoto Y., Hatanaka T., Oguchi M., Sugibayashi K., Kobayashi M., Kimura M.: S. T. P. Pharma Sci. 2, 253 (1992).
44. EP 431,942; Chem. Abstr. *115,* 239731u (1991).
45. JP 04, 202, 140; Chem. Abstr. *118,* 87624h (1993).
46. US 5, 023, 252; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
47. JP 04, 275, 217; Chem. Abstr. *118,* 45801h (1993).
48. EP 380, 989; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
49. Ziegenmeyer J.: Pharm. Ztg. *134,* 9 (1989).
50. US 4, 902, 676; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
51. EP 582,458; Chem. Abstr. *120,* 200444f (1994).
52. US 4, 808, 414; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
53. Akihiro A.: Int. J. Pharm. *93,* 1 (1993).
54. JP 04, 360, 828; Chem. Abstr. *118,* 132231m (1993).
55. US 4, 743, 588; v: Transdermal enhancer patent literatuře. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
56. Ritschel W. A., Hussain S. A.: Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. *10,* 39(1988).
57. EP 436, 217; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
58. Michniak B. B., Player M. R., Fuhrman L. C, Christensen C. A., Chapman J. M. Jr, Sowell J. W. Sr: Int. J. Pharm. *94,* 203(1993).
59. Michniak B. B., Player M. R., Fuhrman L. C, Christensen, C. A., Chapman J. M. Jr., Sowell J. W. Sr.: Int. J. Pharm. *110,* 231 (1994).
60. US 4, 732, 892; v: Transdermal enhancer patent lite-

rature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
61. EP 440, 298; Chem. Abstr. 775, 189795v (1991).
62. Hrabálek A., Doležal P., Roman M., Šklubalová Z., Macháček M.: *Sborník příspěvků. 49. Sjezd chemických společností. Bratislava 1995,* 3, *str. 287.*
63. EP 309, 624; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
64. Büyüktimkin S.; Büyüktimkin N.; Rytting J. H.: Int. J. Pharm. 727, 245(1996).
65. EP appl. 85 400, 771.
66. Fleeker C., Wong O., Rytting J. H.: Pharm. Res. *6,* 443 (1989).
67. Hirvonen J., Rytting J. H., Paronen P., Urtti A.: Pharm. Res. *8,* 933 (1991).
68. Hirvonen J., Sutinen R., Paronen P., Urtti A.: Int. J. Pharm. *99,* 259(1993).
69. US 4, 980, 378; Chem Abstr. 775, 263486p (1991).
70. Doležal P.; Hrabálek A.; Semecký V.: Pharm. Res. *10,* 1015,(1993).
71. Hrabálek A., Doležal P., Roman M., Macháček M., Šklubalová Z.: Pharmazie *49,* 325 (1994).
72. JP 03, 48, 618; Chem. Abstr. 775, 239134x (1991).
73. Hadgraft J.: Pharm. Intl. 5, 252 (1984).
74. US 3, 932, 653; Chem. Abstr. *84,* P111673a (1976).
75. Sasaki H., Kojima M., Mori Y., Nakamura J., Shibasaki J.: J. Pharm. Sci. *80,* 533 (1991).
76. Seki T., Toeda CH., Kawaguchi T., Juni K., Sugibayashi K,, Morimoto Y.: Chem. Pharm. Bul. *38,* 3086 (1990).
77. Irwin W.J., Sanderson F. D., Po A., Li Wan.: Int. J. Pharm. *66,* 243(1990).
78. Aoyagi T., Yamamura M., Matsui K., Nagase Y.: Drug. Des. Discovery *8,* 37 (1991).
79. Stoughton R. B, v knize: *Progress in Biological Sciences in Relation to Dermatology* (Rook A., Champion R. H., ed.), str. 263. Cambridge University Press, Cambridge 1984.
80. JP 06, 72, 879; Chem. Abstr. 720, 331130y (1994).
81. US 4, 973, 708; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
82. US 4, 879, 275; Chem. Abstr. 773, 103404r (1990).
83. US 4, 847, 250; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
84. Fr. Demande 90/8, 273; Chem. Abstr. 776, P 194330q (1992).
85. Michniak B. B., Player M. R., Chapman J. M. Jr., Sowell J. W. Sr.: Int. J. Pharm. *91,* 85 (1993).
86. Okamoto H., Hashida M, Sezaki H.: J. Pharm. Sci. *77,* 418(1988).
87. US 3, 989, 815.
88. Baker E. J., Hadgraft J.; Pharm. Res. 72, 993 (1995).
89. Hou S. Y. E., Flynn G. L.: J. Pharm. Sci. *86,* 85 (1997).
90. Stoughton R. B., McClure W. O.: Drug Dev. Ind. Pharm. 9, 725(1983).
91. US 4, 879, 275; Chem. Abstr. 773, 103404r (1990).
92. JP 21, 29, 274; v: Transdermal enhancer patent literatuře. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
93. US 5, 043, 441; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
94. Williams A. C, Barry B. W.: Int. J. Pharm. *56,* 43 (1989).
95. Feldman R. S., Maibach H. I.: Arch. Dermatol. *109,* 58(1974).
96. Wong O., Tsuzuki N., Nghiem B., Kuehnhoff J., Itoh T., Masaki K., Huntington J., Konishi R., Rytting J. H., Higuchi T.: Int. J. Pharm. *52,* 191 (1989).Int. J. Pharm. *52,* 191 (1989).
97. US 4, 677, 131; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.; J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
98. US 4, 845,233.
99. US 4, 876, 249; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
100. US 4, 960, 771; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1(1993).
101. Michniak B. B., Player M. R., Godwin D. A., Phillips C. A., Sowell J. W. Sr.: Int. J. Pharm. 776, 201 (1995).
102. US 4, 441, 893; Chem. Abstr. 700, 39602c (1984).
103. JP 01, 224, 329; Chem. Abstr. 773, 29278j (1990).
104. US 5, 030, 629; Chem. Abstr. 775, 263486p (1991).
105. JP 03, 58, 941; Chem. Abstr. 775, 99349y (1991).
106. EP 349, 763 v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
107. Bahl M. K. G.: J. Soc. Cosmet. Sci. *36,* 287 (1985).
108. PCT Int. WO 87 03473; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release 25, 1 (1993).
109. JP 02, 180,036; Chem. Abstr. 774, 12220g (1991).

110. PCT Int. WO 90 08,553; Chem. Abstr. *114,* 235050c (1991).
111. US 4, 888, 362; v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
112. PCT Int. WO 92 07, 586; Chem. Abstr. *117,* 55992q (1992).
113. Loftsson T., Bodor N.: Acta Pharm. Nord. *1,* 185 (1989).
114. Loftsson T., Olafsdottir B. J.: Eur. J. Pharm. Biopharm. *37,* 30(1991).
115. Nakano M., Juni K., Arita T.: J. Pharm. Sci. *65,* 709 (1976).
116. US 4, 788, 062 v: Transdermal enhancer patent literature. Santus G. C, Baker R. W.: J. Controlled Release *25,* 1 (1993).
117. PCT Int. WO 91 15210; Chem. Abstr. 775, 263509y (1991).
118. JP 04, 74, 133; Chem. Abstr. 777, 76537k (1992).
119. JP 03, 99, 023; Chem. Abstr. *116,* 28155s (1992).
120. PCT Int. WO 9845233.

A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Škubalová, O. Farsa, and A. Krebs *(Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové):* **Transdermal Penetration Enhancers**

The paper presents the first systemic classification and analysis of transdermal penetration enhancer structures from the point of view of medicinal chemistry. The mechanism of effect of these compounds is not based on a receptor interaction, nevertheless we have found some structural regularities of the enhancing effect. Molecules of the most effective enhancers nearly always contain a fragment of the natural moisturising factors present in human skin at normal physiological conditions. The simplest structural fragment of efficient enhancers is X-CO-N = where X, is $-CH_2-$, $-NH_2$, -NH-, and it should contain a long alkyl or alkenyl (C_8–C_{20}) chain as well, including possible isosteric modifications. The ω-amins acid derivatives as the substances complying fully with these criteria, have been intensely studied.

VÝZNAM CYTOCHROMŮ P450 PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ

MARIE STIBOROVÁ[a], JIŘÍ HUDEČEK[a], PETR HODEK[a] a EVA FREI[b]

[a]Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, [b]Institut für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Německo

Došlo dne 5.III. 1998

Klíčová slova: cytochrom P450, aktivace toxikantů, karcinogeneze

Obsah

1. Úvod
2. Cytochromy P450
3. Cytochromy důležité pro aktivační reakce protoxikantů a prokarcinogenů
   - 3.1. Cytochromy P450 1A1 a P450 1A2
   - 3.2. Cytochromy P450 2A6, P450 2B6, P450 2C (2C8, 2C9, 2C19) a P450 2D6
   - 3.3. Cytochrom P450 2E1
   - 3.4. Cytochrom P450 3A4
   - 3.5. Cytochromy P450 11, P450 17, P450 19 a P450 21
4. Zásah cytochromů P450 do chemické kancerogeneze
5. Závěr

1. Úvod

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1., nověji také označované jen jako „proteiny P450") patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek (xenobiotik). Enzymy této skupiny jsou v poslední době stále intenzivněji studovány. Sloučeniny, které jsou substráty takových enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny a nedochází tak k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Vedle detoxikace těchto sloučenin může docházet i ke vzniku takových derivátů, které jsou biologicky aktivnější: některé z pozitivního hlediska (např. aktivní formy některých léčiv), jiné mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní. Poznání metabolismu xenobiotik u člověka tedy také potenciálně umožňuje např. zvyšovat nebo modulovat účinek léčiv nebo naopak snižovat jejich vedlejší účinky, umožňuje ale i omezovat rizika vznikající při expozici lidské populace potenciálně toxickým a karcinogenním látkám. Jedny z nejdůležitějších enzymů metabolizujících xenobiotika jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidases"), v nichž jako terminální oxidasa funguje právě hemový enzym cytochrom P450 (P450) (cit.[1,2]). V menší míře se na této metabolické přeměně podílejí i samostatně působící hemové enzymy peroxidasy [nespecifické i specifické – např. prostaglandin H synthasa (PHS), myeloperoxidasa][3-5] a mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (Zieglerův enzym)[6-8].

Cytochromy P450 jsou v organismu především zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, vedoucí k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a exkreci z organismu. Jsou to enzymy, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv, environmentálních chemikálií (sloučenin dostávajících se do životního prostředí především lidskou činností), ale i látek přírodních či endogenních[1,2,9-11].

Značný počet studií, zabývajících se cytochromy P450 sleduje jejich účinnost v metabolismu léčiv. A to jak jejich podíl na tvorbě finálních metabolitů léčiv, které jsou snadno z lidského těla vylučovány, tak i na reakcích vedoucích ke zvýšení jejich farmakologické aktivity nebo vyvolávajících toxické efekty. Aktivita jednotlivých cytochromů P450 (tj. různých forem tohoto enzymu) může determinovat reakci pacienta na podané léčivo. V řadě případů je léčivo preferenčně metabolizováno na farmakologicky účinný produkt pouze některým z cytochromů P450. V případě deficience či naopak zvýšené koncentrace takového cytochromu P450 u různých pacientů je pak účinnost léčiva značně rozdílná. Znalost, které z lidských forem cytochromu P450 metabolizují jednotlivá léčiva, a informace o jejich výskytu u různých jedinců je tedy z klinického hlediska nepostradatelná. V současnosti je již známa celá řada neinvazivních testů ke stanovení hlavních forem P450 u člověka, které se používají při studiu metabolismu léčiv u dobrovolníků. Jedním z nich je použití specifických substrátů ve studiích *in vivo*[9]. Nejčastěji jsou v takových studiích používány kofein, kumarin, debrisochin, dextromethorfan, chlorzoxazon, nifedipin. Na základě metabolické aktivity zjištěné pro jednotlivé formy P450 jsou sledovaní jedinci zařazeni do dvou nebo tří kategorií pomalého, středního a rychlého metabolizátora[2]. Není jistě utopií, že v budoucnosti bude před návrhem chemoterapie u každého pacienta proveden „screening" jeho cytochromů P450, aby podaná léčiva byla účinná a měla přitom co nejmenší vedlejší účinky. Bude to nejen zájem pacientů a lékařů, ale i farmaceutických firem. Nejnovější poznatky shrnující aktivity cytochromů P450 z pohledu jejich účinnosti v metabolismu léčiv lze nalézt v přehledných článcích nedávno publikovaných (např.[1,2,11]).

Proto se v předkládaném přehledu věnujeme především těm cytochromům P450, které mají největší význam pro metabolismus látek na toxické a karcinogenní produkty a jsou nebezpečné z hlediska možného potencování rozličných patologických stavů se zvláštním zřetelem na procesy chemické kancerogeneze.

2. Cytochromy P450

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než např. hemoglobin[12,13]. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel

cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií z doby více než před 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů kodujících cytochromy prokaryontních i eukaryontních organismů. I přes značné rozdíly v substrátové specifitě a struktuře všechny obsahují konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazného místa pro hem. Jen v lidském organismu bylo dosud identifikováno 43 forem cytochromu P450 (cit.[12]).

Předpokládá se, že prehistorické mikroorganismy využívaly cytochrom P450 k hydroxylaci organických látek, které po této aktivaci mohly být použity jako zdroj energie. I v současnosti existují mikroorganismy, jejichž cytochromy P450 mají právě tuto funkci. Cytochrom P450 101, označovaný také jako P450cam (z angl. „camphor") zavedením hydroxylové skupiny do skeletu kafru vlastně zahajuje jeho metabolismus. Právě těmito schopnostmi cytochromů P450 se nechala inspirovat řada světových laboratoří a snaží se molekulárně biologickými technikami vytvořit vhodné kmeny mikroorganismů exprimující takové cytochromy P450, které by byly použitelné pro degradaci různých obtížně odstranitelných kontaminant životního prostředí a odpadů produkovaných lidskou činností.

V procesu vzniku a vývoje mnohobuněčnosti začínají cytochromy P450 v organismech plnit i další funkce. Vedle již zmíněného metabolismu xenobiotik se tak uplatňují v biosyntéze např. barviv květů, mastných kyselin, kyseliny skořicové a dále pak fyziologicky významných sloučenin jako jsou např. steroidní hormony, vitaminy D, prostaglandiny. S tímto vývojem souvisel i vznik složitějšího systému cytochromu P450 s vývojově vyšším typem spolupracujícího enzymu, cytochrom P450 reduktasy, a vznik tzv. multiplicity cytochromů P450. Každý vyšší organismus je již vybaven více formami cytochromu P450, které mají i své specifické biosyntetické funkce. Ovšem i přes různorodost funkcí cytochromů P450 v naprosté většině případů platí, že jejich substráty jsou hydrofobní látky.

S vývojem živočišné říše je spojena i další, nově vzniklá role cytochromů P450, kterou je jejich současná funkce v procesu detoxikace cizorodých látek. Koexistence rostlin a živočichů vyvolala nutnost vzniku ochranných mechanismů, kterými rostliny bránily svou existenci před živočichy vyhledávajícími rostlinnou potravu. Na přítomnost látek ochraňujících rostliny, jimiž jsou různé fytotoxiny a fytoalexiny, živočichové odpovídali zmnožením svých cytochromů P450 a jejich adaptací pro účely detoxikace a urychlení eliminace takových sloučenin. To bylo důvodem, proč je toto období (před 800 miliony let) charakteristické extrémním zmnožením forem cytochromu P450 (cit.[13]). V této souvislosti je třeba zmínit, že dlouhodobě se vyvíjející vztah producent (rostlina) - konzument (živočich) v daném ekosystému umožňuje vyváženou koexistenci zástupců obou říší. Živočich (včetně člověka) však může být velmi negativně ovlivněn konzumací rostlinné potravy, na jejíž složení není adaptován, protože ochranný systém cytochromu P450 bud selže nebo dokonce způsobuje i potenciaci účinku rostlinných toxinů[14-17]. Navíc celá řada organických sloučenin rostlinného původu má schopnost indukovat cytochrom P450 (t.j. způsobit zvýšení biosyntézy jedné nebo více forem), a to jak ty formy, které se podílejí na biosyntetických reakcích, tak ty, které plní detoxikační úlohu[18,19]. Obdobná situace nastala v ještě větším rozsahu, když člověk začal syntetizovat do té doby neexistující sloučeniny a vnášet je do životního prostředí. Ať se jedná o chemikálie cílevědomě připravené (např. léčiva[1], agrochemikálie[2], barviva[2]) nebo vedlejší či odpadní produkty (např. zplodiny hoření obsahující benzo[*a*]pyren[9], nitrosaminy[20,21], aromatické aminy[9,22]), vždy existuje závažné riziko, že některá z těchto sloučenin může být systémem cytochromu P450 přeměněna na cytotoxické či mutagenní nebo karcinogenní deriváty poškozující nositele tohoto enzymu. Poněvadž již nelze zastavit produkci stávajících a vývoj stále nových cizorodých látek, je třeba soustředit se na výzkum enzymů interagujících s těmito sloučeninami s cílem předpovědět možné následky jejich produkce a použití pro lidskou populaci.

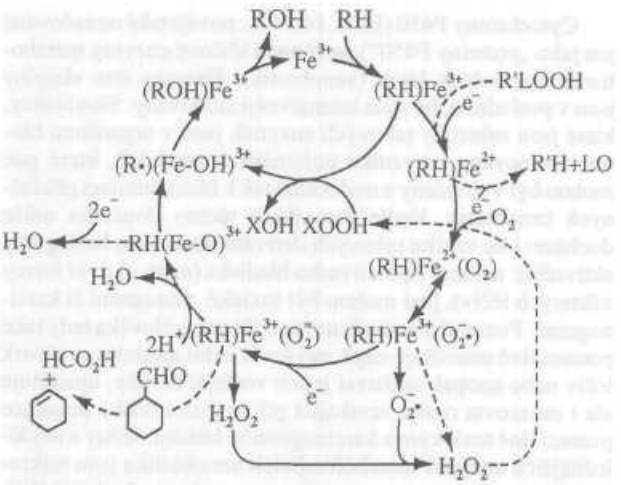
Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují především v játrech, nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií.

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, v nichž je porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje vyjímečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti)[23-25]. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody.

Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu - NADPH:cytochrom P450 reduktasou – nebo dalšími enzymy mitochondrií. Většina reakcí, které lze sumárně vyjádřit jako:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu (kde je MFO systém lokalizován) nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450.



Obr. 1. Reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle cit.[26]). RH - substrát, ROH - monooxygenační produkt, R'LOOH – lipidický hydroperoxid, R'H a LO - redukční produkty hydroperoxidu, XOOH - peroxy sloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe - atom hemového železa enzymu

Redukovaný P450 pak aktivuje molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody. Vedle kyslíku může P450 pro oxidativní reakce využívat peroxidy a peroxikyseliny. Ty se tak stávají donorem atomu kyslíku. Schéma reakčního cyklu P450 je uvedeno na obrázku 1.

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. V současnosti bylo již popsáno na 500 izoenzymů P450, které náleží do 74 rodin, 14 z nich jsou rodiny savčích cytochromů P450. Těchto 14 rodin obsahuje 26 podrodin, z nich 20 bylo nalezeno v lidském genomu[1,2,12,27-29]. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu[28]. Jednotlivé izoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Např. izoenzym P450 1A2 je členem podrodiny A náležející do enzymové rodiny 1. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40 % homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 60 % (cit.[1]). Pro zjednodušení Nebert a spolupracovníci navrhli nové systematické názvosloví genů a forem P450 (cit.[27]), ve kterém se formy P450 označují zkratkou CYP (CYtochrome P450), za níž pak následují označení rodin a podrodin podle výše uvedených kriterií. Výsledné označení příslušného enzymu je pak např. pro P450 1A2 zkracováno na CYP1A2.

3. Cytochromy P450 důležité pro aktivační reakce protoxikantů a prokarcinogenů

Na otázku, které z cytochromů P450 přítomných v lidských tkáních jsou pro zdravý stav a vývoj u člověka (a pro navození patologických stavů) nejdůležitější, není snadné nalézt odpověď. Důležitost (významnost) jednotlivých cytochromů P450 je třeba posuzovat z několika hledisek. Jedním z nejdůležitějších hledisek je podíl těchto enzymů na metabolismu cizorodých látek. Ty totiž mohou být, a ve většině případů také jsou, toxické. Z jaterních cytochromů P450 jsou v procesu metabolismu cizorodých látek nejvýznamnější izoenzymy P450 1A2, 2A6, 2D6, 2C (2C8, 2C9, 2C18 a 2C19), 2E1 a 3A4 (tab. I). Z cytochromů P450 přítomných ve vyšších koncentracích v jiných tkáních (ledviny, plíce, kůže, tkáně gastrointestinálního traktu a močových cest) (tab. II) jsou v přeměně cizorodých látek (včetně protoxikantů a prokarcinogenů) efektivní cytochromy P450 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4 (cit.[2,31,35-38]).

Dalším z důležitých hledisek je množství těchto enzymů v lidských tkáních. Z pohledu celkového množství by nejvýznamnější úlohu měly hrát cytochromy P450 3A4 a izoenzymy podrodiny 2C, dále pak P450 1A2 a 2E1 (tab. I). Vzhledem k širší substrátové specifitě metabolizují tyto izoenzymy P450 také látky endogenní, i když endogenní látky jsou v lidském organismu preferenčně metabolizovány genetickými rodinami (podrodinami) cytochromů P450 s vyhraněnější substrátovou specifitou. Zde je nutné podotknout, že i metabolismus některých endogenních látek je pro patologické procesy (např. procesy kancerogeneze) velmi důležitý (viz dále). Cytochromy, které katalyzují reakce metabolismu tromboxanů, chole-

Tabulka I
Cytochromy P450 lidských jater metabolizující cizorodé látky

P450[a]	Inducibilita	% z celkového P450
1A2	inducibilní i konstitutivní	13,0
1B1	inducibilní	1,0
2A6	inducibilní	4,0
2B6	konstitutivní i inducibilní	0,2
2C	konstitutivní	18,0
2D6	konstitutivní	2,5
2E1	konstitutivní i inducibilní	7,0
3A4	konstitutivní i inducibilní	28,0

[a] Údaje převzaty z cit.[2,30-34]

Tabulka II
Tkáňová distribuce extrahepatálních cytochromů P450 metabolizujících cizorodé látky u člověka

P450[a]	Inducibilita	Tkáň
1A1	inducibilní	plíce, ledviny, gastrointestinální trakt (GIT), placenta, kůže, lymfocyty
1B1	inducibilní	ledviny, kůže, prostata, děloha, lidský plod, (prsní žlázy)
2A6	inducibilní	plíce
2B6	konstitutivní i inducibilní	GIT, plíce
2C	konstitutivní	hltan, GIT, plíce
2D6	konstitutivní	GIT
2E1	konstitutivní i inducibilní	plíce, placenta a další
3A (3A4,3A5)	konstitutivní i inducibilní	ledviny, děloha, plod. plíce, GIT, placenta

[a] Údaje převzaty z cit [30,31,35-38]

Tabulka III
Faktory ovlivňující množství cytochromů P450 u člověka

P450[a]	Faktor
1A1, 1A2, 2E1, 3A3, 3A4, 3A5	výživa
1A1, 1A2	kouření
2E1	alkohol
1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 3A3,4,5	léčiva
1A1, 1A2, 2A6, 1B, 2E1, 3A3,4,5	vnější prostředí (polutanty)
1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1	genetický polymorfismus

[a] Údaje převzaty z cit.[30,45,46,48]

Tabulka IV
Variabilita obsahu cytochromů P450 u člověka a jejich induktory

P450[a]	Rozsah variability obsahu P450	Induktor
1A1	100 krát	tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)
1A2	**40 krát**	TCDD, kouření, jídlo připravené na dřevěném uhlí
2A6	30-100 krát	(konstitutivní enzym)
2B6	50 krát	barbituráty, dexamethason
2C	25-100 krát	barbituráty, ethanol
2D6	více než 100 krát	barbituráty, ethanol
2E1	20 krát	ethanol, hladovění, isoniazid, onemocnění cukrovkou
3A4	30 **krát**	barbituráty, dexamethason, rifampicin

[a] Údaje převzaty z cit [29,30,32,37,49]

sterolu, prostaglandinů, prostacyklinů, vitaminu D3 a žlučových kyselin jsou příslušníky následujících rodin: P450 5, P450 7, P450 8, P450 24, P450 27 a P450 51 (cit.[12,27,28,30]).

Separátně je nutno zmínit participaci cytochromů P450 na biosyntéze endogenních látek jako jsou steroidy a hormony. Pro metabolismus steroidních hormonů jsou nejdůležitější cytochromy P450 podrodin 11, 17, 19 a 21 (cit.[2,30-39-45]). Jsou lokalizovány v membránách endoplazmatického retikula (podobně jako ostatní cytochromy P450) a navíc zejména v membránách mitochondrií tkání produkujících steroidní hormony[2,39-41].

Množství cytochromů P450 v jednotlivých tkáních nelze brát absolutně. Jejich obsah v lidských tkáních je závislý na mnoha faktorech jako je např. genetický polymorfismus, vliv vnějších podmínek (environmentální polutanty chemické ev. fyzikální povahy), výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu, působení podávaných léčiv[30,46,47] (tab. III). Jsou to enzymy jak konstitutivní, tak i inducibilní. Z nich k silně inducibilním enzymům patří většina forem (izoenzymů) cytochromu P450. To znamená, že i v případě, kdy je o určitém cytochromu P450 deklarováno, že je přítomen třeba i jen v mizivém množství, může jeho koncentrace v organismu (tkáních, orgánech) za určitých podmínek narůst extrémně. Příklady induktorů jsou uvedeny v tabulce IV. Experimenty prokazující indukci jednotlivých forem P450 příslušnými induktory byly prováděny *in vivo* na laboratorních zvířatech nebo *in vivo* na lidských buněčných liniích[2,30]. Variabilita obsahu jednotlivých cytochromů P450 je uvedena rovněž v tabulce IV. Tato variabilita je dána uvedenou možností indukce, ale podstatný je především již zmíněný genetický polymorfismus. Genetický polymorfismus je faktorem, kdy vrozené změny DNA vedou k absenci P450, k nemožnosti indukce P450 nebo i ke tvorbě formy P450, která má změněnou katalytickou aktivitu[30]. Polymorfismus je definován jako geneticky podmíněná odlišnost postihující alespoň 2 % uvažované populace[30]. Změny, které se vyskytují méně často, se obvykle nazývají „genetická deficience" nebo „vrozené chyby metabolismu". Polymorfismus cytochromů P450 se velmi podstatně liší u různých lidských ras a populací[30]. Velmi často je dnes sledován na úrovni genu metodami založenými na řetězové polymerasové reakci s následným štěpením produktů restrinkčními enzymy.

Další hledisko, které je třeba brát v úvahu, je substrátová specifita cytochromů P450. Obecně lze konstatovat, že cytochromy P450 mají širokou substrátovou specifitu. Přeměňují tedy celou řadu substrátů. Jednotlivé cytochromy P450 však přece jen vykazují substrátovou specifitu poněkud odlišnou, i když se jejich schopnost přeměňovat různé substráty částečně překrývá. Je evidentní, že např. pro studium kancerogeneze mají největší význam ty z cytochromů P450, u nichž převažují reakce vedoucí k přeměně prokarcinogenů (exogenních i endogenních) na jejich aktivní formy. Cytochromy P450, které se významněji podílejí na přeměně prokarcinogenů, jsou především cytochromy P450 1A1, 1A2, 2E1 a 3A4 (cit.[31-33,36]).

Vzhledem ke schopnosti cytochromů P450 katalyzovat reakce vedoucí ke zvýšení polárnosti substrátů mohou produkty těchto reakcí být jednak vyloučeny z organismu, nebo se aktivovat a vázat na endogenní látky, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. Touto modifikací dochází ke změně jejich fyziologické funkce. Jinou možností jak tyto systémy svou funkcí poškozují buňky je tvorba radikálů, aktivních forem kyslíku, peroxidace lipidů a pod.[50] I když je obtížné zcela zobecnit, které z cytochromů P450 preferují aktivační reakce prokarcinogenů, lze říci, že i z tohoto hlediska (podobně jako z hlediska substrátové specifity) jsou stěžejními P450 1A1, 1A2, 2E1 a 3A4 (cit.[2,31,33,36]). Příklady substrátové specifity jednotlivých cytochromů P450 u člověka ve směru aktivace protoxikantů a prokarcinogenů jsou uvedeny v tabulce V.

Při posuzování významnosti cytochromů P450 pro vývoj a regulaci procesů nádorového bujení je třeba brát v úvahu i skutečnost, nakolik se podílejí na metabolismu (biosyntéze či odbourávání) látek, které potencují kancerogenezi nebo těch, které v nádorových buňkách působí jako agens tyto buňky ničící. V tomto směru jsou významné cytochromy P450 participující na metabolismu nejen exogenních prokarcinogenů, ale i steroidních látek a na přeměně protinádorových léčiv, tedy opět P450 1A1, 1A2 a 3 A4, dále i 2C. Na katalýze těchto reakcí se také podílejí cytochromy P450, které mají mnohem vyhraněnější substrátovou specifitu pro metabolismus steroidů, přičemž s mizivou účinností metabolizují látky cizorodé. Do této skupiny patří P450 11A1 = P450scc (z angl. „side chain cleavage"), P450 11B1, P450 11B2, P450 19 a P450 21. Reakce, které katalyzují, jsou především hydroxylace na uhlících steranového skeletu steroidů. Zřejmě nejvýznamnější je P450 19, označovaný také jako aromatasa. Je tomu tak proto, že enzym ovlivňuje vývoj nádorů (např. nádorů prsu), jejichž růst je závislý na hladinách estrogenních hormonů[2,9]. Látky, které regulují aktivitu aromatasy jsou dokonce již používány jako antinádorová chemoterapeutika[60].

3.1. Cytochromy P450 1A1 a P450 1A2

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou nejvýznamnější bereme-li v úvahu jejich úlohu při aktivaci prokarcinogenů (environmentálních chemikálií, toxických látek, toxických léčiv)[9,31,37,61-64]. Příklady uvádí tabulka V. Mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů[2]. Oba enzymy si jsou značně podobné (vykazují až 70 % homologii v aminokyseli-

Tabulka V
Lidské cytochromy P450 aktivující toxické a karcinogenní sloučeniny a příklady takových sloučenin

P450[a]	Substrát	Induktor
1A1	benzo[*a*]pyren ajiné polycyklické uhlovodíky, 2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP), tamoxifen, aflatoxin B1, 6-nitrochrysen, tabákově specifický nitrosamin, 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	TCDD, 5,6-benzoflavon, benzo[*a*]pyren, 3-methylcholanthren, kouření, 2-acetylaminofluoren, omeprazol
1A2	4-aminobifenyl, 2-naftylamin, 2-aminofluoren, 2-aminoanthracen, 2-acetylaminofluoren, paracetamol, aflatoxin B1, benzo[*a*]pyren, N-nitrosonikotin, NNK, pyrolytické produkty potravin: heterocyklické a aromatické aminy jako např.: 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo-[4,6-*b*]pyridin (PhIP), 2-amino-6-methyldipyrido-[1,2-*a*:3,2'-*d*]imidazol (Glu P-1), 2-aminopyrido-[1,2-*a*:3,2'-*d*]imidaol (Glu P-2), 2-amino-3methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin (IQ), 2-amino-3,5-dimethylimidazo-[4,5-*f*]chinolin (MeIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-*f*]chinolin (MeIQx), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indol (TRP P-2)	TCDD, benzo[*a*]pyren, omeprazol, heterocyklické aminy, 5,6-benzoflavon, polychlorované bifenyly
2A6	N-nitrosodiethylamin, NNK, butadien, 6-aminochrysen, aflatoxin B1,	
2B6	aflatoxin B1, 6-aminochrysen, dibenzo[*a*,*h*]anthracen, nikotin, NNK	barbituráty, dexamethason
2E1	benzen, styren, vinylchlorid, vinylbromid, akrylonitril, vinylkarbamát ethylkarbamát, trichlorethylen, N-nitrosodimethylamin, NNK, chloroform	ethanol, aceton, isoniazid, toluen, hladovění
3A4	aflatoxin B1, aflatoxin G1, tamoxifen, sterigmatocystin, benzo[*a*]pyren, 7,8-dihydroxy-7,9-dihydrobenzo[*a*]pyren, 6-aminochrysen, 1-nitropyren, tris(2,3-dibromopropyl)fosfát, 17b-estradiol	rifampicin, erythromycin, fenobarbital klofibrát, dexamethason

[a] Údaje převzaty z cit.[2,9,29,31-33,37,51-59]

nové sekvenci, která je vysoce konzervovaná). Oba enzymy katalyzují i stejné reakce. Liší se však především v lokalizaci. P450 1A1 je přítomen v mizivých koncentracích v játrech, naopakje zastoupen v jiných tkáních[9]. Jedná se o enzym, který je silně indukován u kuřáků. Navíc se předpokládá, že rozsah inducibility tohoto enzymu lze korelovat s dispozicí vzniku rakoviny plic[9]. Naopak však existují i literární údaje deklarující, že pokusy korelovat inducibilitu P450 1A1 se vznikem rakoviny plic u kuřáků nebyly průkazné"[30]. Cytochrom P450 1A1 byl detegován v plicích kuřáků a navíc v několika nádorových tkáních (buňky plicního karcinomu, nádorů prsu)[9,63,64]. Zcela nedávno bylo zjištěno, že genetický polymorfismus cytochromu P450 1A1 ovlivňuje výskyt nádorů (počet i růst) nejen plic a prsu, ale i kůže[9].

Cytochrom P450 1A2 je typickým jaterním enzymem. Má velmi širokou substrátovou specifitu (tab. V). Významnými substráty jsou aromatické aminy, které vznikají jako pyrolytické produkty tepelné úpravy potravin (proteinů, aminokyselin)[2,9]. Jejich koncentrace v organismu mohou narůstat jako následek pravidelné konzumace tepelně upravených potravin obsahujících vysoké koncentrace těchto pyrolysátů[9]. Díky své silné karcinogenitě mohou pak tyto aromatické aminy zvyšovat i riziko tvorby nádorů.

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 se podílejí i na aktivaci genotoxických chemikálií přítomných v cigaretovém kouři. P450 1A2 se učastní i metabolismu steroidů.

Podobně jako v případě cytochromu P450 1A1 i přítomnost P450 1A2 v tkáních koreluje s rizikem výskytu rakoviny[31,32,37]. S výskytem cytochromu P450 1A2 souvisí vznik kolorektálních nádorů a nádorů močového měchýře[9]. Oba enzymy regulují i hladiny endogenních aduktů v DNA (tzv. „I-compound"). Mechanismus však není doposud vysvětlen[65].

3.2. Cytochromy P450 2A6, P450 2B6, P450 2C (2C8, 2C9, 2C19) a P450 2D6

Z cytochromů P450 genové rodiny 2 u člověka je z důvodu významnosti nutné zmínit P450 2A6. U lidí totiž tvoří až 4 % celkového P450 (tab. I) a metabolizuje substráty, které mají význam pro lidské zdraví, např. nikotin, nitrosaminy, kumarin, látky používané k léčení AIDS (azidothymidin, zidovudin)[2,9,30]. Navíc aktivuje některé prokarcinogeny (např. tabákově specifický nitrosamin NNK, butadien, 2,6-dichlorbenzonitril, hexamethylfosforamid, 6-aminochrysen, aflatoxin B1)[2,9]. Vykazuje významný genetický polymorfismus.

Ačkoliv množství P450 2B6 v lidském organismu je velmi nízké (okolo 0,2 % z celkového množství P450, tab. I) nelze tento enzym vyloučit z participace na kancerogenezi. Podílí se totiž na aktivaci některých karcinogenů. Hraje roli i v metabolismu protinádorových léčiv jako jsou cyklofosfamid a ifosfamid[53,66].

Cytochromy P450 podrodiny 2C jsou u člověka hojně zastoupeny a mají velmi širokou substrátovou specifitu. Sice doposud neexistují žádné důkazy pro možné začlenění těchto cytochromů P450 do procesů kancerogeneze, ale hrají velmi významnou roli v metabolismu a účinnosti řady léčiv. Je pro ně totiž typický výrazný genetický polymorfismus, který způsobuje, že u určitých skupin lidské populace je zcela zabráněno chemoterapeutickému účinku některých léčiv, které jsou na cytochromech P450 podrodiny 2C metabolicky závislé. U lidí byly identifikovány čtyři formy tohoto enzymu (2C8, 2C9, 2C18 a 2C19)[30]. P450 2C8 a 2C9 aktivují karcinogenní benzo[*a*]pyren, v jeho aktivaci však hrají proti jiným formám P450 minoritní roli[2]. Genetický polymorfismus je zvláště charakteristický pro formy 2C9 a 2C19, klinicky významný je u formy 2C19, která navíc metabolizuje celou řadu léčiv (např. mephenytoin, citalopram, barbituráty, omeprazol, propranolol, diazepam)[2,30].

Lidský cytochrom P450 2D6 je rovněž zajímavý z toho hlediska, že vykazuje výrazný genetický polymorfismus[2]. Může být důležitý i pro patologické procesy chemické kancerogeneze. Předpokládalo se, že může ovlivňovat i výskyt nádorů plic[67] a močového měchýře[68]. Experimentální důkazy jsou však zatím nedostatečné a proto bylo od této teorie prozatím upuštěno[9].

3.3. Cytochrom P450 2E1

Cytochrom P450 2E1 se uplatňuje mimořádně významně v metabolismu toxikologicky důležitých látek (v tomto případě jde o sloučeniny s malou molekulovou hmotností). Je totiž zodpovědný za tvorbu reaktivních metabolitů z mnoha látek, se kterými se člověk často setkává (příklady jsou uvedeny v tab. V). Je konstitutivním enzymem jaterní tkáně, avšak je také indukovatelný řadou látek, které jsou většinou i substráty tohoto enzymu. Příklady induktorů P450 2E1 jsou uvedeny v tabulce V. Nejznámějšími induktory jsou ethanol a aceton, fyziologicky důležitá je indukce cytochromu P450 2E1 vyvolaná hladověním (endogenní tvorba acetonu). Aktivuje karcinogeny, zejména řadu nitrosaminů (především s alifatickými řetězci). Ty mají velký význam proto, že mohou vznikat i jako endogenní látky v zažívacím traktu člověka a dalších živočichů.

3.4. Cytochrom P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 je co do obsahu v lidských tkáních, i co do množství substrátů, které přeměňuje, rozhodně nejvýznamnějším cytochromem P450. Původně byl tento enzym nazýván podle schopnosti oxidovat nifedipin jako P450NF a pod tímto názvem byl také poprvé izolován[69]. Podrobnými studiemi pak bylo prokázáno, že se podílí na oxidaci velkého počtu karcinogenů, jako i léčiv a endogenních látek (steroidy) (tab. V) (cit.[9,69]). Je přítomen nejen v játrech, ale i v celé řadě dalších tkání (tab. I, II). Je indukován barbituráty, rifampicinem a dexamethasonem[9,70,71]. Příklady substrátů a induktorů cytochromu P450 3A4 jsou uvedeny v tabulce V. Z hlediska procesů kancerogeneze jsou důležitými substráty tohoto izoenzymu karcinogenní xenobiotika jako jsou některé přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a z endogenních látek pak steroidní sloučeniny (17-*beta*-estradiol, testosteron, progesteron, kortisol)[2,72].

3.5. Cytochromy P450 11, P450 17, P450 19 a P450 21

Zvláštními skupinami cytochromů P450 jsou enzymy metabolizující preferenčně endogenní látky se steroidní strukturou. Reakce katalyzované těmito enzymy probíhají primárně v kůře nadledvinek, pohlavních žlázách a v placentě. Cytochromy P450 rodiny 11 jsou lokalizovány v mitochondriích a další formy (P450 17, P450 19, P450 21) v mikrosomech[30,39,73]. Reakce, které tyto enzymy katalyzují, napomáhají udržovat steroidní látky v organismu na optimální hladině. Tyto cytochromy P450 mají nejužší substrátovou specifitu i specifitu účinu.

Jsou velmi důležité také z hlediska procesů kancerogeneze, a to ze dvou důvodů. Prvním z nich je skutečnost, že nevyváženost koncentrace některých steroidních hormonů (např. jejich zvýšené koncentrace) mohou vést ke karcinogenním procesům. Na druhé straně vyvážené hladiny steroidních látek jsou důležité i pro stav buněk některých nádorů. Proto se také regulátorů některých těchto cytochromů P450 dokonce používá v protinádorové terapii[60]. Takto jsou používány inhibitory cytochromu P450 17 jako antiandrogeny k léčení rakoviny prostaty[74,75] a především inhibitory cytochromu P450 19 (aromatasy)[60].

4. Zásah cytochromů P450 do procesů chemické kancerogeneze

Proces chemické kancerogeneze sestává přinejmenším ze tří fází: iniciační, promoční a progresní. V iniciační fázi dochází ke změně genetické informace zdravých buněk, které vedou ke tvorbě prekarcinogenní léze. Tato prekarcinogenní léze je vyvolána především rozličnými modifikacemi molekul DNA. Vzhledem k tomu, že právě modifikace molekul DNA jsou považovány za kritický krok kancerogeneze, jsou hledány cesty, jak je detegovat a jak jejich vzniku zabránit[76,81]. Iniciační fáze kancerogeneze je (vzhledem k její důležitosti) velmi detailně studována[80,82]. Z modifikací DNA je významná tvorba kovalentních aduktů DNA (kovalentní vazba karcinogenu na báze či deoxyribosu DNA), dále pak tvorba hydroxyderivátů bází DNA (oxidativní léze tvořené radikálovými formami kyslíku), tvorba cyklických aduktů, tvořených z bifunkčních genotoxických činidel, poškození DNA vyvolané radiací, tvorba pyrimidinových dimerů, apurinace a apyrimidinace DNA, tvorba interkalátů. Ovšem za nejzávažnější je třeba považovat tvorbu kovalentních aduktů.

Cytochromy P450 jsou jedny z nejvýznamnějších enzymů aktivujících prokarcinogeny na reaktivní ultimální formy, které tvoří kovalentní adukty. (Otázkou, které izoformy jsou nejvýznamnější pro aktivaci karcinogenů, se zabývá předchozí kapitola). Tyto enzymy se podílejí i na reakcích, při nichž se uvolňují aktivní formy kyslíku za tvorby oxidačních lézí v DNA - nejvýznamnější je v této souvislosti tvorba 8-hydroxyguaninu v DNA. Je tomu tak proto, že v průběhu reakcí katalyzovaných cytochromy P450 je tvorba kyslíkových radikálů součástí reakčního mechanismu (viz obr. 1). Z izoenzymů cytochromu P450 je to především P450 2E1, který aktivní formy kyslíku v průběhu reakcí snadněji uvolňuje[50,83]. Někdy jsou oxidativní reakce substrátů katalyzované tímto cytochro-

mem P450 vlastně zprostředkovány právě aktivními formami kyslíku[30].

Apurinace a apyrimidinace DNA jsou sice přirozenými procesy, dochází k nim však mnohem častěji, jsou-li báze DNA nějakým způsobem pozměněny. Právě kovalentní modifikace bází DNA, které vedou k rychlé apurinaci či apyrimidinaci, jsou dnes považovány za velmi podstatný faktor v procesu kancerogeneze[84] - a za vznik kovalentních modifikací jsou právě cytochromy P450 zodpovědné.

Tvorba interkalátů v DNA může být rovněž procesem nezávislým na enzymové katalýye. Avšak řada interkalačních činidel je efektivnější až jako metabolity vzniklé v biotransformačních reakcích (tedy i v reakcích katalyzovaných cytochromem P450).

Klíčovými faktory promoční fáze (zvýšená proliferace primárně pozměněných buněk) jsou především aktivity proteinkinas a fosfatas a jejich regulace[85]. Růst nádoru ovlivňují i další faktory, zejména produkty onkogenů, uvolňované po aktivaci (derepresi) onkogenů buď onkogenním virem nebo jiným kancerogenním podnětem[85-88]. Takovým dalším podnětem mohou být právě i oxidativní změny DNA, způsobené radikálovými formami kyslíku. Jejich vznik je, jak bylo výše uvedeno, podmíněn aktivitami některých cytochromů P450 (P450 2E1) a dalších hemových enzymů - peroxidas.

Progresní fázi kancerogeneze můžeme zjednodušeně přirovnat k fázi iniciační. Procesy modifikace DNA jsou v progresní fázi ještě efektivnější[89]. Ve fázi progrese dochází k tvorbě buněk již totálně maligně pozměněných. Funkce aktivačních enzymů participujících na vzniku aduktů DNA (modifikované DNA) je tedy zcela zřejmá.

5. Závěr

Uvedené příklady dokumentují, jaký význam a jak rozporuplnou roli pro lidské zdraví mají cytochromy P450. Vedle „tradičních" reakcí detoxikace cizorodých látek a aktivace léčiv se stejnou měrou uplatňují také potenciálně nebezpečné aktivační reakce protoxikantů a prokarcinogenů: v procesu karcinogeneze mohou cytochromy P450 pravděpodobně spolupůsobit i dalšími mechanismy. Detailní poznání mechanismu enzymové aktivity těchto hemoproteinů a jejich specifity proto může významně přispět k pokroku v terapii i prevenci rakoviny a dalších chorob.

Autoři děkují za podporu Německému centru výzkumu rakoviny a grantům MŠMT ČR (VS 96 141), GA ČR (203/95/0604 a 203/96/0177) a GA UK (87/95).

LITERATURA

1. Spatzenegger M., Jaeger W.: Drug Metab. Rev. *27,* 397 (1995).
2. Rendic S., Di Carlo F. J.: Drug Metab. Rev. *29,* 413 (1997).
3. Eling T. E., Thompson D. C, Foureman G. L., Curtic J. F., Hughers M. F.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *30,* 1 (1990).
4. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Anzenbacher P.: Drug Metab. Drug Interact. *9,* 17 (1991).
5. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H.: Collect. Czech. Chem. Commun. *62,* 971 (1997).
6. Ziegler D. M., Pettit F. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 188 (1964).
7. Damani L. A., v knize: *Metabolism of Xenobiotics* (Gorrod J. W., Oelschlager H., Caldwel J., ed.), str. 59. Taylor and Francis, London 1988.
8. Kvasničková E., Hais I. M.: Cesk. Farm. *XLIII,* 315 (1994).
9. Guengerich F. P., Shimada T., v knize: *Human Drug Metabolism. From Molecular Biology to Man* (Jeffery E. H., ed.), str. 6. CRC Press, London, Tokyo 1993.
10. Souček P., Gut I.: Xenobiotica *22,* 83 (1992).
11. Gut I., Souček P„ Hodek P.: Prac. Lek. 7, 15 (1992).
12. Nelson D. R., Koyamans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Freyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I., Nebert D. W.: Pharmacogenetics *6,* 1 (1996).
13. Nebert D. W., Nelson D. R., Feyereisen R.: Xenobiotica 79,1149(1989).
14. Stiborová M., Fernando R. C, Schmeiser H. H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: Carcinogenesis *15,* 1187 (1994).
15. Schmeiser H. H., Bieler C., Wiessler M., van Ypersele de Strihou C, Cosyns J.-P.: Cancer Res. *56,* 2025 (1996).
16. Schmeiser H. H., Frei E., Wiessler M., Stiborová M.: Carcinogenesis *18,* 1055 (1997).
17. Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P., van Ypersele se Strihou C, Schmeiser H. H.: Carcinogenesis *18,* 1063 (1997).
18. Liu G.-T.: Drug Metab. Rev. *23,* 439 (1991).
19. Kvasničková E., Šroler A.: Cesk. Farm. *XL1,* 338 (1992).
20. Preussmann R., Wiessler M.: Trends Pharm. Sci. *8,* 185 (1987).
21. Stiborová M., Hansíková H., Frei E.: Cancer Lett. 770, 11 (1996).
22. Kadlubar F. F.: ISI Atlas Sci.: Pharmacol. 7, 129 (1987).
23. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: J. Mol. Struct. 274, 149 (1989).
24. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C, Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v klnize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A. I., Bachmanova G. I., ed.), str. 1. INCO-TNC, Moscow 1992.
25. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *243,* 811 (1998).
26. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: FASEB J. *6,* 669 (1992).
27. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J, Esrabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C, Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips J. R., Sato R., Waterman M. R.: DNA *8,* 1 (1989).
28. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C, Gotoh O., Okada K., Nebert D. W.: DNA Cell Biol. *12,* 1 (1993).
29. Gonzales F. J., Korzekwa K. R.: Annu. Rev. Toxicol. Pharmacol. *35,* 369 (1995).
30. Guengerich F. P., v knize: *Cytochrome P450- Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P. R., ed.), 2 vyd., str. 473. Plenum Press, New York 1995.

31. Gonzalez F. J., Gelboin H. V.: Drug Metab. Rev. *26,* 165 (1994).
32. Ioannides C, Parke D. V.: Drug Metab. Rev. *25,* 485 (1993).
33. Juchan M. R., Lee Q. P., Fantel A. G.: Drug Metab. Rev. *24,* 195 (1992).
34. Yamazaki H., Shimada T., Guengerich F. P.: Xenobiotica 26,395(1996).
35. Smith D. A.: Eur. J. Pharm.Sci. *2,* 69 (1994).
36. Park B. K., Pirmohamed M., Kitteringham N. R.: Pharmacol. Theor. *68,* 385 (1995).
37. Neal G.-E.: Toxicol. Lett. *82/83,* 861 (1995).
38. Hakkola J., Pasanen M., Hukkanen J., Pelkonen O., Maenpaa J., Edwards R. J., Boobis A. R., Raunio H.: Biochem. Pharmacol. 57, 403 (1996).
39. Hanukoglu I.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *43,* 779 (1992).
40. White P. C, Pascoe L., Curnow K. M., Tamnin G., Rosler A.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *43,* 827 (1992).
41. Swinney D. C, Mak A. Y.: Biochemistry *33,* 2185 (1994).
42. Vanden Bossche H.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *43,* 1003 (1992).
43. Simpson E. R., Makendroo M. S., Means G. D., Kilgore M. W., Hinshelwood M. M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C. R., Michael M. D., Mendelson C. R., Bulun S. E.: Endocr. Rev. 75, 342 (1994).
44. Dowset M.: Annu. Oncol. *5,* S3 (1994).
45. Lephart E. D.: Brain Res. Rev. *22,* 1 (1996).
46. Daly A. K.: J. Mol. Med. *73,* 539 (1995).
47. Stephens E. A., Taylor J. A., Kaplan N., Yang C.-H., Hsiech L. L., Lucier G. W., Bell D. A.: Pharmacogenetics *4,* 185(1994).
48. Bock K. W., Schrenk D., Foster A., Griese E.-U., Morike K., Brockmeier D., Eichelbaum M.: Pharmacogenetics *4,* 209 (1994).
49. Wrighton S. A., Vanden Branden M., Stevens J. C, Shipley L. A., Ring B. J.: Drug Metab. Rev. *25,* 453 (1993).
50. Tichavská B., Gut I.: Chem. Listy *88,* 580 (1994).
51. Heyn H., White R. B.,, Stevens J. C: Drug Metab. Dispos. *24,* 948 (1996).
52. Donato M. T., Castell J. V., Gomez-Lechon M. J.: Drug Metab. Dispos. *23,* 553 (1995).
53. Chang T. K. H., Weber G. F., Crespi C. L., Waxman D. J.: Cancer Res. *53,* 5629 (1993).
54. Ono S., Hatanaka T., Miyzawa S., Tsuitsui M., Aoyama T., Gonzalez F. J., Satoh T.: Xenobiotica *26,* 1155 (1996).
55. Chang T. K. H., Gonzalez F. J., Waxman D. J.: Arch. Biochem. Biophys. *311,* 437 (1994).
56. Yamazaki H., Mimura M., Oda Y., Gonzalez F. J., ElBayoumy K., Chae H. Y., Guengerich F. P., Shimada T.: Carcinogenesis 75, 465 (1994).
57. Garton K. J., Meinwald J., Thumel K. E., Kjarasch E.: Drug Metab. Dispos. *23,* 1426 (1996).
58. Nakagawa T., Sawada M., Gonzalez F. J., Yokoi T., Kamataki T.: Mutat. Res. *354,* 181 (1996).
59. Mitra A. K., Thummel K. E., Kalhorn T. F., Kharsch E. D., Unadkat J. D., Slattery J. T.: Clin. Pharmacol. Ther. *58,* 556 (1995).
60. Miller W. R.: Cancer Treatment Rev. *23,* 171 (1997).
61. Nelson S. D.: Semin. Liver Dis. *10,* 267 (1990).
62. Vermeulen N. P. E., Bessems J. G. M., Van den Straat R.: Drug Metab. Rev. *24,* 367 (1992).
63. McLemore T. L., Adelberg S., Liu M. C, Mahon N. A., Yu S. J., Hubbard W. C, Czerwinski M., Wood T. G., Storeng R., Lubert R. A., Eggleston J. C, Boyd M. R., Hines R. N.: J. Natl. Cancer Inst. *83,* 1333 (1990).
64. Kawajiri K., Nakchi K., Imai K., Watanabe J., Hayashi L. S.: Crit. Rev. Oncol. Hematol. *14,11* (1993).
65. Moorthy B., Chen S., Li D., Randerath K.: Carcinogenesis *14,* 879 (1993).
66. Bohnenstengel F., Hofman U., Eichelbaum M., Kroemer H. H.: Eur. J. Clin. Pharmacol 57, 297 (1996).
67. Ayesh R., Idle J. R., Ritchie J. C, Crothers M. J., Hetzel M. R.: Nature 572, 169 (1994).
68. Kaisary A., Smith P., Janczq E., McAlister C. B., Wilkinson G. R., Ray W. A., Ray R.A., Branch R. A.: Cancer Res. *47,* 5488 (1987).
69. Brian W. R., Sari M.-A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L. S., Guengerich F. P.: Biochemistry *29,* 11280 (1990).
70. Watkins P. B., Wrighton S. A., Meurel P., Schuetz E. G., Mendez-Picon G., Parker G. A., Guzelian P. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *82,* 6310 (1985).
71. Guengerich F. P.: Cancer Res. *48,* 2946 (1988).
72. Flaishaker I. C, Pearson L. K., Peters G. R.: J. Pharm. Sci. *84,* 292 (1995).
73. Kagawa N., Waterman M. R., v knize: *Cytochrome P450 – Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P. R., ed.), 3 vyd., str. 419. Plenum Press, New York 1995.
74. Hartman R. W.: Eur. J. Pharm. Sci. 2, 15 (1994).
75. Burke D. F., Laufhton C. A., Snook C. F., Neidle S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 5, 1125 (1995).
76. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Chem. Res. Toxicol. *8,* 489 (1995).
77. Binková B.: Chem. Listy *87,* 564 (1993).
78. Chang L. W., Hsia S. M. T., Chang P.-C, Hsieh L.-L.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *34,* 41 (1994).
79. Randerath K., Randerath E.: Drug Metab. Rev. *26,* 67 (1994).
80. Keith G., Dirheimer G.: Current Oppinion Biotechnol. 6, 3 (1995).
81. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: Chem. Listy *92,* 661 (1998).
82. Beach A. C., Gupta R. C: Carcinogenesis *13,* 1053 (1992).
83. Yang C. S., Yoo J.-S. H., Ishizaki H., Hong J.: Drug Metab. Rev. *22,* 147 (1990).
84. Chen L., Devanesan P. D., Higginbothan S., Ariese F., Jankowiak R., Small G. J., Rogan E. G., Cavalieri E. L.: Chem. Res. Toxicol. *9,* 897 (1996).
85. Slaga T. J.: *Mechanism of Tumor Promotion.* Vol. 1-4. CRC Press, Boca Raton 1984.
86. Trush M. A., Kenser T. W.: Free Radical Biol. Med. *10,* 201 (1991).
87. Kenser T. W., Taffer B. G.: Adv. Free Radical Biol. Med. 2, 347 (1986).
88. Marnett L. J.: Carcinogenesis *8,* 1365 (1987).
89. O'Connel J. F., Klein-Szanto A. J. P., DiGiovanni D. M., Fries J. W., Slaga T. J.: Cancer Res. *46,* 2863 (1986).

M. Stiborová[3], I. Hudeček[a], P. Hodek[3], and E. Frei[b]
("Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, [b]Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany):
Cytochromes P450 and Human Health

Cytochrome P450 is a generic name applied to a group of hemoproteins. These enzymes belong to the most significant involved in the metabolism of many xenobiotics (pharmaceutical drugs or their additives, environmental pollutants), several natural products and endogenous compounds. They catalyze oxidation, peroxidation and reduction reactions, which are involved in the first (so-called derivative) phase of biotransformation of the above-mentioned compounds. Humans are known to widely differ in levels of individual cytochromes P450 and in rates of metabolism of xenobiotics and other substrates of these enzymes. Differences can clearly be related to those in biological response to chemicals and their toxicity. This review is focused mainly on significance of individual forms of cytochrome P450 in reactions, that lead to activation of protoxicants and procarcinogens to their ultimate derivatives. Recent reports on the involvement of cytochromes P450 in processes of chemical carcinogenesis are discussed.

ROSTLINNÉ FENOLY V ALLELOPATII

BOŘIVOJ KLEJDUS a VLASTIMIL KUBÁŇ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 18.II.1998

Klíčová slova: fenolické látky, rostlinný materiál, allelopatie, HPLC

Obsah

1. Úvod
2. Typy laboratorních testů (bioassay)
3. Půdní faktory
4. Biotické faktory
5. Extrakce a izolace fenolických allelochemikálií
6. Identifikace a stanovení rostlinných fenolů
7. Závěr

1. Úvod

Všechny organismy existují v úzké vazbě se svým abiotickým i biotickým prostředím. Významné jsou především takové vazby, které přímo souvisí se zajištěním výživy a rozmnožování. U autotrofních organismů (především fotolithotrofů) jsou to především vazby na abiotické prostředí, zatímco u heterotrofů (hlavně parazitů a symbiontů) pak vazby na biotické prostředí. Proces utváření takovýchto vazeb se neuskutečňuje *sua sponte,* ale na základě informací, tedy i „poznání" parazita či symbionta nebo vzájemného rozpoznání organismů v populaci. Přenos informací se děje pomocí produkce specifických chemických sloučenin, které jsou organismem vylučovány do okolního prostředí (nadzemními i podzemními částmi rostlin, pokožkou, exkrementy atd.).

Vzájemné vztahy mezi rostlinami a mezi nimi a prostředím ovlivňují především jejich relativní stálost v biotopu. Tyto vztahy můžeme rozdělit do tří kategorií - akce, reakce a koakce a obecně je zahrnout pod pojem allelopatie (vzájemné ovlivnění)[1-3]. Allelopatie je definována jako biochemická interakce mezi různými rostlinnými druhy (včetně půdních mikroorganismů). Jejím výrazným rysem je především účast tzv. allelopatik, chemických látek, které fungují především jako přenašeče informací. Allelopatické účinky jsou mimořádně významné pro vzájemné vztahy mezi rostlinnými druhy jak v přirozených ekosystémech, tak i v agrosystémech[1,2].

Příkladem vzájemného působení rostlin může být například existence tzv. mykorrhizosféry v lesních porostech, kdy většina vyšších rostlin spojuje svůj kořenový systém s různými mikroorganismy. Zatímco například houba poskytuje rostlině svými houbovými vlákny některé nerostné látky (např. fosfáty aj.), rostlina naopak zásobuje houby produkty fotosyntézy (organickými látkami, např. cukry, aminokyselinami atd,). V některých případech může být tato symbióza volnější (ektomykorrhiza), jindy je velmi úzká (endomykorrhiza), kdy houbová vlákna prorůstají dovnitř kořenů hostitelské rostliny nebo dokonce i několika rozdílných rostlin. Transport hmoty se pak může uskutečňovat mezi houbou a hostitelskou rostlinou nebo dokonce i mezi několika hostitelskými rostlinami prostřednictvím houby. Tím se může do značné míry eliminovat případný deficit určitých živin vlivem zhoršeného metabolismu nebo nepříznivých vlivů vnějšího prostředí na oba symbionty.

Zcela opačným příkladem může být například cizopasná rostlina *Striga hermothica,* která parazituje na kořenové části prosa, kukuřice, čiroku a luštěnin. Rostlina produkuje až 10^5 miniaturních semen, která mohou přežít v půdě až několik desetiletí. Vyklíčení semen je podmíněno přítomností dostatečných koncentrací specifických chemických látek (tzv. sargolaktonu) v kořenových exudátech hostitelské rostliny. Teprve přítomnost sargolaktonu v půdě způsobuje vyklíčení semen Strigy a následně i tvorbu kořenových výběžků (haustorium), kterými Striga proniká do kořenového systému hostitele, odčerpává mu živiny a metabolity a tím hostitele účinně oslabuje nebo likviduje. Některé rostliny naopak vylučují allelochemikálie, které v počátečních stádiích vývoje retardují klíčení semen nebo vývoj jiných rostlin ve svém blízkém okolí. Tak si pro sebe zabezpečují dostatek energie a živin.

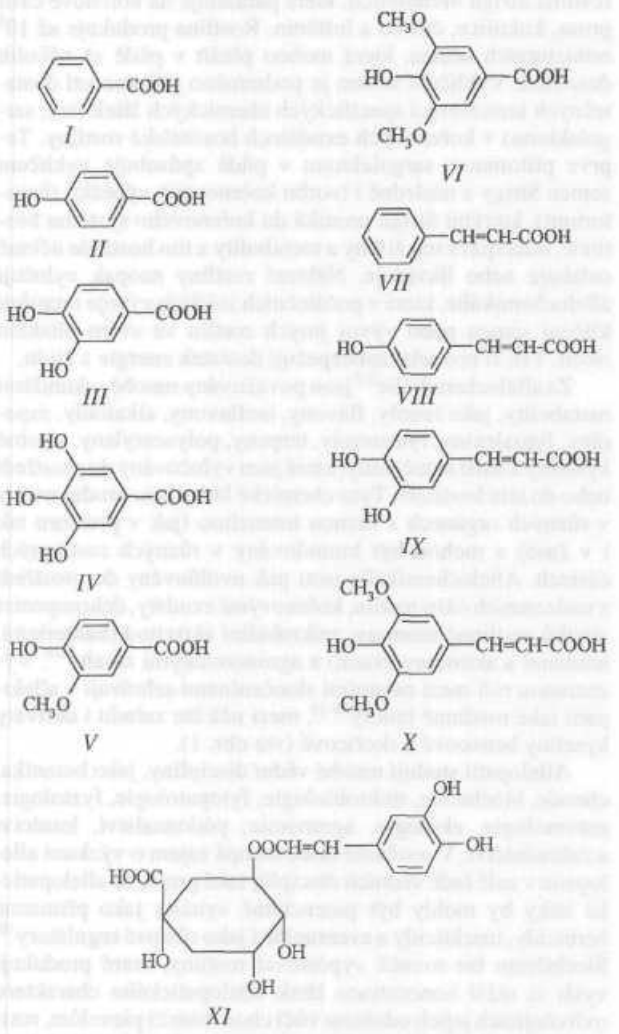
Za allelochemikálie[3-5] jsou považovány mnohé sekundární metabolity, jako fenoly, flavony, isoflavony, alkaloidy, saponiny, fytoalexiny, fytosteroly, terpeny, polyacetyleny, mastné kyseliny a další sloučeniny, které jsou vylučovány do prostředí nebo do těla hostitele. Tyto chemické látky jsou produkovány v různých orgánech s různou intenzitou (jak v prostoru tak i v čase) a mohou být kumulovány v různých rostlinných částech. Allelochemikálie jsou pak uvolňovány do prostředí z nadzemních částí rostlin, kořenovými exudáty, dekompozicí zbytků rostlinné biomasy, mikrobiální aktivitou (bakteriemi, houbami a aktinomycetami) a agronomickými zásahy[6-9]. Významnou roli mezi ostatními sloučeninami sehrávají v allelopatii také rostlinné fenoly[10-15], mezi něž lze zařadit i deriváty kyseliny benzoové a skořicové (viz obr. 1).

Allelopatii studují mnohé vědní disciplíny, jako botanika, chemie, biochemie, mikrobiologie, fytopatologie, fyziologie, entomologie, ekologie, agronomie, půdoznalství, lesnictví a zahradnictví. V současné době stoupá zájem o výzkum allelopatie v celé řadě vědních disciplín také proto, že allelopatické látky by mohly být potenciálně využity jako přirozené herbicidy, insekticidy a eventuelně i jako růstové regulátory[16]. Šlechtěním lze rovněž vypěstovat rostliny, které produkují vyšší či nižší koncentrace látek allelopatického charakteru ovlivňujících jejich odolnost vůči chorobám či plevelům, rostliny s vysokou produkcí lehce těkavých allelochemikálií působících proti hmyzím škůdcům atp.

2. Typy laboratorních testů (bioassay)

Pro sledování účinnosti a pochopení vlivů allelopatických látek v allelopatii je nutné zvolit vhodný biologický test, tzv.

bioassay. Pro volbu nejvhodnějšího testu k posouzení allelopatických účinků a pro zhodnocení mechanismu snižování produkce kulturních rostlin v agrosystémech je doporučováno několik kroků, které zahrnují pozorování a měření v terénu, provádění provozních a poloprovozních pokusů, pokusů ve sklenících nebo pokusných nádobách a konečně i laboratorní testy se semeny nebo klíčícími rostlinami. Cílem těchto testů by mělo být určení allelopatického potenciálu, stanovení celkové koncentrace allelopaticky aktivních látek, identifikace a stanovení koncentrace jednotlivých allelopatik, stanovení allelopatického potenciálu vybraných látek nebo jejich směsí, procenta návratnosti (recovery) a rovněž osudu allelopatických látek v půdě a organismech. K těmto účelům je možno použít jednak extrakty nebo výluhy z celých rostlin nebo jejich částí nebo přímo izolované chemické sloučeniny nebo jejich



Obr. 1. Deriváty kyseleliny benzoové a skořicové. / kyselina benzoová, // kyselina 4-hydroxybenzoová *p*-hydroxybenzoová), /// kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (protokatechová), *IV* kyselina 3,4,5--trihydroxybenzoová(gallová), *V* kyselina 3-hydroxy-4-methoxybenzoová (vanilová), *VI* kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová (syringová), *VII* kyselina skořicová, *VIII* kyselina 4-hydroxyskořicová (*p*-kumarová), *IX* kyselina 3,4-dihydroxyskořicová (kávová), *X* kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová (ferulová), *XI* kyselina chlorogenová

směsi. Z hlediska působení lze testy rozdělit na testy ve vodních kulturách, čistých (písek, netečný materiál...) či přesně definovaných tuhých substrátech (zeolity, půda...) a na působení plynných nebo lehce těkavých komponent.

Dalším problémem je výběr vhodného rostlinného materiálu, neboť účinky jednotlivých allelochemikálií jsou velmi různorodé. Účinky rozdílných látek stejné chemické povahy se mohou u jedné rostliny lišit podobně jako účinky jedné látky u různých rostlin. Naopak mohou být vnější projevy působení různých látek u jedné nebo i více rostlin podobné či shodné. Všechny allelochemikálie však v určitém rozmezí koncentrací fyziologicky ovlivňují (stimulují nebo inhibují) růst a vývin rostlin. Celá řada z nich má vliv na klíčeni, jiné způsobují depresi transpirace rostlin nebo inhibují fosforylační mechanismus. Jiné depolarizují membránový potenciál buňky, mění strukturu a vlastnosti membrán a tím příjem živin. Některé zasahují do buněčného dělení a nebo enzymatických procesů, snižují mitotickou aktivitu a ovlivňují respiraci atd. Mechanismus jejich působení však doposud není jednoznačně znám.

K stanovení allelopatického potenciálu mohou být použity rozdílné typy laboratorních metod[17,18]. Klíčem semenje jedním z důležitých parametrů pro určení allelopatického potenciálu fenolických sloučenin[3,4]. Avšak použití tohoto parametru pro vyhodnocování laboratorních testů má značné nedostatky[18,19], neboť interakce v tomto případě navíc zahrnují jak promotory, tak i inhibitory působících fenolických allelochemikálií. Další metoda používá semenáčků, u kterých se jako kritéria intenzity fytotoxicity fenolických látek u biologického materiálu[18] používá vyhodnocení hmotnosti čerstvých výhonků a kořenů.

Řada studií využívájako testovacího materiálu pro biometody salátu pro jeho vysokou citlivost k allelochemikáliím. Blum a Rebeck[20] popisují vliv kyseliny ferulové na tvorbu kořenového systému. Chou a Patrick[21] identifikovali kyselinu máselnou, 4-hydroxymáselnou, fenyloctovou, benzoovou, *p*--hydroxybenzoovou, vanilovou, ferulovou, syringovou, *p*-kumarovou a kávovou, resorcinol, floroglucinol a salicylaldehyd v produktech dekompozice zbytků zrn žita. V produktech dekompozice zbytků žita nalezli[21] kyselinu ferulovou, vanilovou, fenyloctovou, *p*-kumarovou, 4-hydroxybenzoovou, salicylovou a *o*-kumarovou a salicylaldehyd. Testovali allelopatický efekt těchto sloučenin na růst salátu a zjistili, že kyseliny fenyloctová, 4-fenylmáselná, salicylová, benzoová a *o*-hydroxyfenyloctová byly inhibitory růstu salátu v koncentracích 25-50 ppm, kdežto ostatní fenolické sloučeniny byly allelopaticky aktivní v koncentracích teprve od 100 ppm. Podobně Li a spol.[23] studovali interakce kyseliny *trans*-skořicové, *o*-, *m*-, *p*-kumarové a chlorogenové a vliv těchto fenolických látek na růst salátu.

Dornbos a Spencer[22] popisují využití agarových desek jako biometody (bioassay) pro studium klíčeni vojtěšky (*Medicago sativa*) a trávy (*Lolium multiflorum*). Vybrané allelochemikálie přidávali do kultivačního média a zjišťovali jejich vliv na průběh klíčeni.

3. Půdní faktory

Pro pochopení účinků fenolických látek a sledování interakcí v eko- a agrosystémech je nutné zohlednit taktéž faktor půdy, neboť půda je velmi složitý fyzikální, chemický a biologický systém. Jednotlivé fenolické allelochemikálie, které

vstupují do půdního systému, jsou vystaveny procesům jako retence, transformace a transport[5]. Na vstup do půdy a působení fenolických allelochemikálií mají vliv rovněž půdní charakteristiky jako vodní režim, obsah živin, teplota, pH a obsah organické hmoty[5].

Retenční procesy zpomalují pohyb allelochemikálií v prostředí. Huang a spol.[24] studovali retenci fenolických kyselin vanilové, syringové, ferulové, *p*-kumarové a *p*-hydroxybenzoové na hydroxohlinitých a železitých sloučeninách obsažených v půdě a jílech. Fenolické kyseliny jsou známy svou adsorpcí na minerálech v jílech a na hydroxidech železa[24-25]. *Ortho*-substituované fenolické sloučeniny, jako kyselina salicylová a *o*-kumarová, a dihydroxy-substituované fenolické sloučeniny, jako kyselina protokatechová a kávová, se adsorbují na jílové minerály ve formě chelátů s kovy[26]. Dalton a spol.[27] studovali diference v dynamice sorpce exogenně dodaných kyselin ferulové, *p*-kumarové, *p*-hydroxybenzoové a vanilové v různých typech půd. Shledávají významnou sorpci všech testovaných látek ve všech typech půd. Návratnost (recovery) těchto fenolických kyselin je různá v závislosti na typu použité půdy, půdního profilu, čase a typu funkčních skupin obsažených na aromatickém jádře fenolických sloučenin. Transformační procesy mění formy a vedou k částečné nebo kompletní degradaci.

Transportní procesy determinují rychlost s jakou se pohybují fenolické allelochemikálie v půdním prostředí. Půdní proměnné jako pH, obsah živin a organické hmoty, iontoměničové a oxidační schopnosti sehrávají důležitou roli v osudu fenolů v půdě. Inderjit a Dakshini[18] ukázali na vysoce významnou úlohu kvality půdy ve vztahu k allelopatii. Allelopatický efekt fenolických sloučenin vzrůstá v půdách chudých na živiny[28]. Stowe a Osborn[29] studovali vliv dusíku a fosforu na fytotoxicitu fenolických sloučenin a shledali, že fenolické sloučeniny byly účinnými inhibitory růstu především při nízkých koncentracích živin. Allelopatická aktivita kyseliny hydroxyskořicové a jejího fotochemického degradačního produktu ceratiolinu, uvolněného z *Ceratiolia ericoides*, byla zvýšena u nízkých obsahů dusíku a draslíku v půdě[30]. Blum a spol.[31] popisují, že koncentrace fenolických allelochemikálií byla ve vzájemném vztahu s pH půdy, vlhkostí, celkovým obsahem uhlíku a celkovým obsahem dusíku v půdě.

4. Biotické faktory

Hustota porostu, růstová stádia, mikrobiální aspekty a stáří rostlin patří mezi biotické faktory podílející se na aktivitě fenolických sloučenin[3]. Whitehead a spol.[32] ukázali, že koncentrace fenolických sloučenin v půdě je významným faktorem pro růst a diferenciaci rostlin. Weidenhamer a spol.[33] demonstrovali, že pokles fytotoxicity vzrůstá s hustotou porostu (plant denzity), poněvadž při vyšší hustotě přijímá každá rostlina menší množství každé potenciální allelochemikálie. Gallet a Lebreton[34] uvádějí, že pouze jedna až tři minoritní fenolické sloučeniny, získané ze zeleného listí, byly také nalezeny v hnědém listí. Dokazují, že kyselina protokatechová a *p*-kumarová byly zastoupeny v hnědém listí ze 20-30 % z původního obsahu v zeleném listí, a že *p*-hydroxyacetofenonu bylo v hnědém listí pouze 5 % oproti původnímu obsahu v zeleném listí a *p*-hydroxybenzaldehyd a katechol z hnědého listí dokonce úplně vymizely.

Mikroorganismy jsou všeobecně zapojeny do allelopatie[3,18]. Houby *Pullularia fermentans* degradují rutin na floroglucinol, na kyselinu protokatechovou a na kyselinu 2-protokatechuyl-floroglucinol-karboxylovou[35]. Mikroorganismy *Rhodotorula rubra* a *Cephalosporium curtipus* metabolizují kyselinu ferulovou na kyselinu vanilovou, pak na kyselinu protokatechovou a v konečné fázi na kyselinu P-keto-adipovou. Metabolity z mnoha mikroorganismů sehrávají důležitou roli ve fytotoxicitě rozložených zbytků rostlinných orgánů[36]. Gallet a spol.[34] popisují vymizení *p*-hydroxyacetofenonu u smrku a kyseliny kávové u borůvek. Tento efekt připisuji působení specifických mikroorganismů.

5. Extrakce a izolace fenolických allelochemikálií

Většina fenolických sloučenin, identifikovaných jako allelochemikálie, byla extrahována z rostlinného materiálu. Určité sloučeniny obsažené v rostlinných částech mohou vykazovat inhibiční efekt v druhových testech, ale ve výluzích a exudátech z rostlin tento efekt nevykazují. K potvrzení aktivních fenolických látek v allelopatii je vhodné shromáždit data o koncentraci bioaktivních fenolických sloučenin v médiu (které jsou uvolňovány do prostředí), údaje o časovém působení, o statické a dynamické účinnosti fenolických sloučenin, existenci aditivních (synergických) nebo parciálních antagonistických aktivit fenolických sloučenin i dalších látek.

Metody extrakce a izolace fenolických látek z rostlinného materiálu jsou založeny převážně na aciditě karboxylových a hydroxylových skupin vázaných na aromatické jádro. U různých matric pevných vzorků, jako jsou půda a rostliny, bývá v první fázi prováděná účinná a rychlá ultrasonifikace, prostá extrakce kapalinou, někdy pouze digesce rozpouštědlem nebo soustavou rozpouštědel, v nichž jsou analyty dobře rozpustné. Torri a spol.[37] srovnávali použití konvenčního sonifikátoru s homogenizátorem pro extrakci fenolických sloučenin z čerstvého listí *Acomostylis rossi* a *Ouratla luceus*. Dokazují, že větší výtěžnost a účinnost měla homogenizační technika.

V poslední době se stále více využívá kombinace separačních a obohacovacích technik, které zajišťují prekoncentraci sledovaných analytů a případně i odstranění nežádoucích komponent z analyzovaného materiálu. Pevné místo v této oblasti zaujímá extrakce tuhým sorbentem (Solid Phase Extraction - SPE)[38]. Glowniak a spol.[39] popisují přečištění rostlinného extraktu a izolaci fenolických kyselin na SPE kolonkách plněných sorbenty s oktadecylovými a kvarterními amoniovými skupinami. Buiarelli a spol.[40] provedli srovnání SPE techniky (kvarternární amin v kombinaci s oktadecylovým sorbentem) s klasickou extrakcí diethyletherem a extrakcí diethyletherem v kombinaci s PEG. Nejlepší výtěžnost dávala SPE technika. V poslední době se stále více využívá nových typů sorbentů. Pocurull a spol.[41] použili kombinace Carbopack s poly(styren-divinylbenzenovým) sorbentem, kde využívají sorbce aromatického jádra fenolických sloučenin na tento kopolymer. Klejdus a spol.[42] provedli srovnání řady SPE sorbentů. Mezi nejvhodnější se jeví polymerní sorbenty. Verotta a Peterlongo[43] použili pro izolaci fenolických látek extrakci tekutinou (oxidem uhličitým) v nadkritickém stavu (Supercritical Fluid Extaction - SFE).

Koncentrace fenolických sloučenin může být stanovena dvěmi skupinami metod: 7) chemickou, která využívá redoxní reakce kovové vazby a postupy založené na specifické chemické aktivitě[44] a 2) tzv. protein-binding assay, která využívá stanovení tanninové kapacity fenolických sloučenin[45]. Waterman a Mole[15] porovnávali různé metody pro stanovení celkového obsahu fenolů Folinovu-Denisovu, Folinovu-Ciocalteauovu a Priceovu-Butlerovu metodu. V těchto případech mohou vznikat interference nefenolických sloučenin, což má za následek nepřesnost ve stanovení celkových koncentrací fenolických sloučenin. Van Alstyne[46] srovnává tři metody pro stanovení fenolických sloučenin: *1)* Folinovu-Ciocalteauovu metodu pro sloučeniny rozpustné v 80 % methanolu, 2) Folinovu-Ciocalteauovu metodu pro sloučeniny rozpustné v 75 % methanolu a 25 % kyselině trichloroctové, *3)* metodu s použitím polyvinylpolypyrollidonu, který je vhodný pro navázání fenolických sloučenin. Shledává, že první z těchto tři metod dává nejreprodukovatelnější výsledky.

Pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin v půdě bývá použito adice fytotoxických látek a srovnání jejich koncentrace v půdě před adicí fytotoxických látek. Inderjit a Dakshini[18] diskutují význam chemické prozíravosti během izolace allelochemikálií. Navrhují omezení použití organických rozpouštědel a mletí vzorků pro extrakci. Organická rozpouštědla mohou strhávat sloučeniny z organické hmoty, mikrobiálních membrán atd.[47] Mletí může mít za následek uvolnění určitých enzymů, solí, aminokyselin a dusíkatých sloučenin, které nemohou být jinak uvolňovány během přirozených podmínek[18].

Pro separaci fenolických sloučenin z půdy je k dispozici řada metod. Blum a spol.[48] doporučují pro extrakci volných a reverzibilně vázaných fenolických sloučenin vodu a EDTA. Autoři[48] uvádějí, že extrakce půd EDTA a vodou dávají allelopaticky významné hodnoty volných a reverzibilně vázaných fenolických sloučenin. Kaminsky a Muller[49] navrhují alkalickou hydrolýzu s použitím 0,5 % $Ca(OH)_2$ a 2 M-NaOH. Dalton a spol.[50] doporučují extrakci z neutrálního prostředí s použitím vody a Na_2EDTA o pH 7,5 jako chelatačního činidla. Tato metoda je využitelná pro potvrzení přítomnosti a odhad obsahu aktivních fenolických sloučenin v půdě. Dalton a spol.[51] srovnávali rozdílné extrakční postupy z hlediska jejich schopností separace v návaznosti na sledování ve vodě rozpustných fenolických sloučenin z půdy. Kladou důraz na význam výběru vhodného extrakčního postupu ve vztahu k získám ekologicky relevantních výsledků.

6. Identifikace a stanovení rostlinných fenolů

Detekce a identifikace biologicky aktivních látek hraje strategickou roli v allelopatickém výzkumu. Mezi orientační techniky patří chromatografie na tenké vrstvě (TLC) popř. na koloně (CC). Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení jednotlivých fenolických sloučenin v půdě a rostlinných extraktech či kořenových exudátech jsou s úspěchem používány[52-54] především chromatografické a elektromigrační metody - HPLC, GC a CE (cit.[55]), hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR).

Nejčastěji se používá uspořádání s reverzní fází na alkylovaných silikagelech C18 případně styren divinylbenzenových kopolymerech s oktadecylovým řetězcem. Pro stanovení fenolických sloučenin byl[55-58] například s výhodou použit sorbent Hypersil BDS C18, který vykazuje vysokou selektivitu, účinnost a symetrii tvaru píků oproti běžně používaným sorbentům typu ODS C18. Pouze výjimečné se používá silikagel alkylovaný s 6 ev. 8 C v řetězci. Separace se provádí pomocí izokratické nebo gradientově eluce mobilní fází, kterou tvoří směs methanolu nebo acetonitrilu s vhodnými tlumiči (kyselina mravenčí, octová, fosforečná atd.). Detekce jednotlivých látek se provádí buď spektrofotometricky v UV oblasti (220-300 nm, jen výjimečně nad 300 nm). Identifikace jednotlivých látek spočívá v porovnání retenčních časů s časy standardů, což v mnoha případech vede k omylům. Tyto údaje někdy bývají doplněny srovnáním spekter v UV-VIS oblasti pomocí DAD detektoru a odpovídajících knihoven spekter. Stanovení obsahu allelochemikálií bylo prováděno v různých typech matrice (lišejníky, kůra stromů, půda, rostlinné extrakty atd.)[59-68].

V půdě byly identifikovány kyseliny *p*-hydroxybenzoová, vanilová, syringová, ferulová, *p*-kumarová, zatímco přítomnost kyseliny kávové prokázána nebyla[59]. Výsledky však silně závisí na účinnosti extrakčního postupu a citlivosti detekce. V bramborách byly prokázány kyselina chlorogenová, gallová, protokatechová a kávová, přičemž největší výtěžek fenolkarboxylových kyselin byl získán při varu pod zpětným chladičem[60]. Na základě sledování obsahu jednotlivých fenolických látek v kůře stromů byly prokázány sezónní vlivy, vliv odrůd a dalších faktorů na odolnost vůči infekcím *Discosporium populeum*[61]. Obsah fenolických sloučenin v kůře topolů umožňuje rozlišení odrůd topolů odolných či citlivých k bakteriální nákaze[62]. Sekundární metabolity, především fenolkarboxylové kyseliny, byly rovněž identifikovány v lišejnících[63].

Kyseliny skořicová, *p*-kumarová, kávová a ferulová spolu s dalšími sloučeninami byly identifikovány jako meziprodukty při dozrávání papriky *Capsicum annuum*[64]. Fenolkarboxylové kyseliny byly identifikovány v buněčných stěnách po digesci mikrovlnnou energií[65]. Vanilin, kyselina vanilová, 4-hydroxybenzoová a 4-hydroxybenzaldehyd a další sloučeniny byly separovány a identifikovány HPLC a metoda je použitelná pro sledování vlivu odrůd, agronomických postupů a postupů zpracování na kvalitu vanilky[66]. Kyseliny gallová, chlorogenová, 4-hydroxybenzoová, *p*-kumarová, ferulová a vanilová byly nalezeny v deseti různých druzích sóji *Glycine max* a jejich obsah lze použít k identifikaci druhů[67]. Obsah kyseliny 4-hydroxybenzoové a 4-hydroxyfenyloctové byl stanoven ve slámě a produktech její dekompozice LC s elektrochemickou detekcí[68].

Cenné informace o chemické struktuře studovaných metabolitů můžeme získat on-line a off-line spektrálními technikami[54]. Mezi off-line techniky patří spektrofotometrické metody v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) nebo infračervené oblasti (IR), hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR). On-line techniky zahrnují GC, HPLC a CE ve spojení s diode array detekcí (UV-VIS DAD) nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie LC/MS, LC/MS/MS, GC/MS a v neposlední řadě i kombinaci LC s nukleární magnetickou rezonancí LC/NMR. Nejnovější uvedení tandemu LC/NMR představuje účinný doplněk k LC/UV/MS technikám. Především vyřešení potřebných rozhraní pro spojení těchto technik s HPLC a CE nám poskytne během jedné analýzy dostatek informací o struktuře identifikovaných metabolitů.

7. Závěr

Rostlinné fenolické sloučeniny jsou jednou z významných skupin sekundárních metabolitů podílejících se podstatnou rolí v allelopatii. Navíc je prokázána i genotypová odlišnost v produkci allelochemikálií a jejich odlišná účinnost na různé druhy a různé genotypy téhož druhu[66-68]. Allelochemikálie plní také úlohu informační nebo jsou fyziologickou součástí obrany či útoku rostliny (látky ochranného charakteru) při biotických vztazích rostlin s jinými organismy, mezi různými druhy rostlin (allelochemický efekt - allomony, kairomony, depresanta) nebo uvnitř druhu (interspecifický chemický efekt - autotoxiny, adaptivní autoinhitory a feromony). Některéjsou pro rostlinu životně důležité, např. fytohormony, jiné se jeví jako skutečné odpadní produkty.

Působení allelochemikálií je podmíněno řadou jejich fyzikálních a chemických vlastností. Účinky rostlinných extraktů nebo izolovaných látek na rostliny, fytopatogenní organismy a dokonce i vybrané druhy hmyzu[69] byly již testovány dříve, avšak účinky na respiraci, buněčné dělení, aktivitu emzymů a strukturální stavbu pletiv a buněk teprve nedávno[73,74]. Při studiu vzájemných interakcí byly zkoumány vztahy uvnitř druhů[16,75], mezi rostlinami, mikroorganismy a živočichy[76], mezi stromy a jinými rostlinami a navzájem[77] i vzájemné vztahy hostitele a parazita a autotoxicita[77-79]. V rámci eusymbiózy byla věnována pozornost spolužití dvou druhů odlišných organismů v relativně přesně vymezeném prostoru (pletivu), dále vztahu k chemickému složení rostlinných exudátů a jejich možnému využití v praxi[79,81]. Existují také práce, které sledují vliv těchto látek na kvalitu zemědělské produkce z hlediska stravitelnosti, přijmu a chutnosti a výživné hodnoty[82].

V předkládané práci jsou podány možnosti uplatnění a vhodnosti nasazení biotestů (bioassay) na ověření biologické aktivity fenolických látek, vlivů půdních a biotických faktorů k pochopení účinků a interakcí fenolických sloučenin v ekosystémech. Je popsána vhodnost použití nových extrakčních technik jako jsou extrakce pevnou fází (SPE) a extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE) pro izolaci fenolických sloučenin. Nástup tandemových technik, mezi které patří LC/MS, LC/MS/MS, CE/MS a LC/NMR ve spojení s HPLC/UV-VIS a CE/UV-VIS nám umožňují přesnou identifikaci látek a poskytnou informace o struktuře těchto biologicky aktivních látek. Zájem o studium vlastností a fyziologické účinky fytochemikálií roste především proto, že by mohly být potenciálně využity jako přírodní, k životnímu prostředí šetrné pesticidy a růstové regulátory, jako přírodní léčiva (kancerostatika, antipyretika aj.) a v řadě dalších oblastí. Rostlinné fenoly sehrávají důležitou úlohu ve farmakologii, medicíně, výživě zvířat a v neposlední řadě i v oblasti rostlinné říše svými chemickými účinky.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu MŠMT ČR v rámci programu „Posílení výzkumu na vysokých školách" reg. č. VS97014.

LITERATURA

1. Yamamoto Y.: J. Chem. Ecol. *21,* 1365 (1995).
2. Tamura S., Chang C, Suzuki A., Kumai S.: Agric. Biol. Chem. *33,* 391 (1969).
3. Rice E. L.: *Allelopathy.* Academic Press, Orlando 1984.
4. Waller G. R.: *Allelochemicals. Role in Agriculture and Forestry.* ACS Symposium Serie 330. American Chemical Society, Washington 1987.
5. Inderjit, Dakshini K. M. M., Einhellig F. A.: *Allelopathy. Organisms. ProcessesandAplications.* ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington 1995.
6. Muller C. H.: Bull. Torrey Bot. Club *93,* 332 (1966).
7. Muller C. H.: Vegetatio *18,* 348 (1969).
8. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Am. J. Bot. *79,* 977 (1992).
9. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Am. J. Bot. *81,* 799 (1994).
10. Levin D. A.: Am. Nat. *105,* 157 (1971).
11. Harborne J. B.: *Methods in Plant Biochemistry, I. Plant Phenolics.* Academic Press, London 1989.
12. Kuiters A. T.: Acta Bot. Neetherl. *39,* 329 (1990).
13. Siqueira J. O., Nair N. G., Hammerschmidt R., Safir G. R.: Crit. Rev. Plant Sci. *10,* 63 (1991).
14. Appel H. M.: J. Chem. Ecol. *19,* 1521 (1993).
15. Waterman P. G., Mole S.: *Methods in Ecology. Analysis of Phenolic Plant Metabolites.* Blackwell Scientific Publications, Oxford 1994.
16. Chung I. M., Miller D. A.: Agron. J. *87,* 920 (1995).
17. Leather G. R., Einhellig F. A.: *Bioassay in Study of Allelopathy, The Science of Allelopathy.* Wiley, New York 1986.
18. Inderjit, Dakshini K. M. M.: Bot. Rev. *61,* 28 (1995).
19. Stowe L. G.: J. Ecol. *67,* 1065 (1979).
20. Blum U., Rebbeck J.: J. Chem. Ecol. 75, 917 (1989).
21. Chou C. H., Patrick Z. A.: J. Chem. Ecol. *2,* 369 (1976).
22. Dornbos D. L. Jr., Spencer G. F.: J. Chem. Ecol. *16,* 339 (1990).
23. Li H. H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J., Tsuzuki E.: J. Chem. Ecol. *19,* 1775 (1993).
24. Huang P. M., Wang M. K., Wu M. H., Hsu N. W.: Soil Sci. *123,* 213(1977).
25. Kogel I., Zech W.: Senegal Geoderma 35, 119 (1985).
26. Shindo H., Kuwatsuka S.: Soil Sci. Plant. Nutr. *21,* 227 (1975).
27. Dalton B. R., Weed S. B., Blum U.: Soil Sci. Soc. Am. J. *53,* 757 (1989).
28. Lehman R. H., Rice E. L.: Am. Midl. Nat. 87, 71 (1972).
29. Stowe L. G., Osborn A.: Canad. J. Bot. *58,* 1149 (1980).
30. Fischer N. H., Williamson G. B., Weidenhamer J. D., Richardson D. R.: J. Chem. Ecol. *20,* 1355 (1994).
31. Blum U., Gerig T. M., Worsham A. D., King L. D.: J. Chem. Ecol. 79, 2791(1993).
32. Whitehead D. C, Dibb H., Hartley R. D.: J. Appl. Ecol. *19,* 579 (1982).
33. Weidenhamer J. D., Hartnett D. C, Romeo J. T.: J. Appl. Ecol. *26,* 613 (1989).
34. Gallet C, Lebreton P.: Soil Biol. Biochem. *27,* 157 (1995).
35. Hattori S., Noguchi I.: Nature *184,* 1145 (1959).
36. Chapman S. J., Lynch J. M.: Plant Soil *74,* 457 (1983).
37. Torti S. D., Dearing M. D., Kursar T. A.: J. Chem. Ecol. 27,117(1995).
38. Tatarkovičová V.: Chem. Listy *87,* 114 (1993).
39. Glowniak K., Zgorka G., Kozyra M.: J. Chromatogr. A *25,* 730 (1996).
40. Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Levetsovitou Z.: J. Chromatogr. A *695,* 229 (1995).

41. Pocurull E., Calull M., Marce R., Borrull F.: J. Chromatogr. A 779, 105 (1996).
42. Klejdus B., Kubáň V.: Bude publikováno.
43. Verotta L., Peterlongo F.: Phytochem. Anal. *4,* 178 (1993).
44. Hagerman A. E., Butler L. G.: J. Chem. Ecol. 75, 1795 (1991).
45. Mole Si, Waterman P. G.: Oecologia 72, 148 (1987).
46. van Alstyne K. L.: J. Chem. Ecol. *21,* 45 (1995).
47. Schmidt S. K.: J. Chem. Ecol. *16,* 3547 (1988).
48. Blum U., Worsham A. D., King L. D., Gerig T. M.: J. Chem. Ecol. *20,* 314(1994).
49. Kaminsky R., Muller W. H.: Soil Sci. *124,* 205 (1977).
50. Dalton B. R., Blum U., Weed S. B.: J. Chem. Ecol. 9, 1185(1983).
51. Dalton B. R., Weed S. B., Blum U.: Soil Biol. Biochem. *21,* 1011 (1989).
52. Li H. H., Lajide L., Nishimura H., Hasegawa K., Mizutani J.: Weed Res. *38,* 282(1993).
53. Nakahisa K., Tsuzuki E., Terao H., Kosemura S.: Jpn. J. Crop Sci. *63,* 278 (1994).
54. Hostettmann K., Wolfender J. L., Rodriguez S.: Planta Med. *63,* 2 (1997).
55. Kubáň V., Absolínová H., Klejdus B., Smolíková M., Bartošová L.: *First World Congr. Allelopathy, Book of Abstracts, University of Cadiz, 1996, D3, 145.*
56. Bartošová L., Klejdus B., Smolíková M., Kubáň V.: J. Allelopathy, přijato do tisku.
57. Smolíková M., Klejdus B., Kubáň V., Bartošová L.: J. Allelopathy, přijato do tisku
58. Klejdus B., Rozinková E.: *7th Int. Symp. Forage Conservat. Book of Abstracts, VÚVŽ Nitra 1995, 165.*
59. Kelley W. T., Coffey D. L., Mueller T. C: J. Am. Offic. Anal. Chem. Int. *77,* 805 (1994).
60. Rodriguez de Sotillo D., Hadley M., Holm E. T.: J. Food Sci. *59,* 649 (1994).
61. Baiocchi C, Marengo E., Roggero M. A., Giacosa D., Vietto L., Toccori S.: Chromatographia *39,* 481 (1994).
62. Baiocchi C, Marengo E., Saini G., Roggero M. A., Giacosa D.: J. Chromatogr. *644,* 259 (1993).
63. Yoshimura I., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Huneck S., Yamada Y.: Phytochem. Anal. 5, 197 (1994).
64. Sakamoto S., Goda Y., Maitani T., Yamada T., Nunomura O., Ishikawa K.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1141 (1994).
65. Provan G. J., Scobbiet L., Chesson A.: J. Sci. Food Agric. *64,* 63 (1994).
66. Taylor S.: Flavour Fragrance J. *8,* 281 (1993).
67. Ramakrishna M. B. V., Mital B. K., Gupta K. C, Sand N. K.: J. Food Sci. Technol. *26,* 154 (1989).
68. Galletti G. C, Piccaglia R., Concialini V.: J. Chromatogr. *507,* 439 (1990).
69. Takahashi Y.: J. Jpn. Soc. Gras. Sci. *38,* 226 (1992).
70. Luu K. T., Matches A. G., Peters E. J.: Agron. J. *74,* 805 (1982).
71. Hall M. H., Henderlong P. R.: Crop Sci. *29,* 425 (1989).
72. Calera M. R., Anaza A. L., Gavilames-Ruiz M.: J. Chem. Ecol. *21,* 289 (1995).
73. Ben Hammouda M., Kremer R. J., Minor H. C: Crop Sci. *35,* 1652 (1995).
74. Smith M. T., Van Staden J.: Environ. Exp. Bot. *35,* 113 (1995).
75. Hedge R. S., Miller D. A.: Agron. J. *84,* 940 (1992).
76. Duhan J. S., Sharma P. K., Laxminarayana K.: Allelopathy J. 7, 47 (1994).
77. Quasem R. J.: Allelopathy J. 7, 29 (1994).
78. Tesař M. B.: Agron. J. *85,* 256 (1993).
79. Oleszek W.: J. Chem. Ecol. *19,* 1063 (1993).
80. Oleszek W.: Wiad. Bot. *36,* 17 (1992).
81. Scehovic J.: *Zb. konf. „Súčasné poznatky v produkci a využití trávnych porastov",* VÚTE, B. Bystrica 1992, 94.

B. Klejdus and V. Kubáň *(Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno):* **Plant Phenolic Compounds in Allelopathy**

Applications and importance of bioassays for controlling of biological activity of phenolic compounds, effect of soil and biotic factors for understanding these effects and interactions of phenolic substances in ecosystems are discussed. New extraction techniques, i.e. solid phase extraction (SPE) and supercritical fluid extraction (SFE) for isolation of phenolic substances are described in comparison with classical techniques. Application of tandem (hyphenated) techniques, such as LC/MS, LC/MS/MS, CE/MS and LC/ NMR in combination with classical separation HPLC/UV-VIS and CE/UV/VIS techniques allows exact identification of natural substances and gives detailed information on structure of these biologically active substances. An enormous interest in studies of basic characteristics, physico-chemical properties and physiological activities of phytochemicals increases mainly because of their potential application as natural, nontoxic pesticides and growth regulators, as natural phytopharmaceutics (cancerostatics, antipyretics etc.) and in other branches. Natural phenols also play an important role in pharmacology, medicine, animal feeding and in the environment by their chemical effects.

TOXICITA HVĚZDNICOVITÝCH SPŘIHLÉDNUTÍM KFARMACEUTICKY VÝZNAMNÝM DRUHŮM

LUDĚK JAHODÁŘ a JANA KLEČÁKOVÁ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: jahodar@faf.cuni.cz

Došlo dne 29.III.1998

Klíčová slova: Asteraceae, hvězdnicovité, toxicita, přírodní látky

Obsah

1. Úvod
2. Toxikologicky významné produkty specializovaného metabolismu
   2.1. Kaurany
   2.2. Seskviterpenické laktony
   2.3. Thujon
   2.4. Pyrrolizidinové alkaloidy
   2.5. Polyiny
3. Závěr

1. Úvod

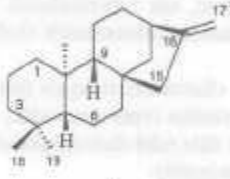
Čeleď hvězdnicovitých rostlin *(Asteraceae, Compositae)* patří mezi druhově nejobsáhlejší ve světové floře. Zahrnují více než 21 000 druhů (V ČR je evidováno kolem 400) rozšířených po celé planetě od tropů po polární oblasti k hranicím vegetace. Jde převážně o byliny, v tropických oblastech roste i nemnoho druhů dřevin. Vytváří se v nich mohutný potenciál látek využitelných pro člověka. Primární a sekundární metabolické pochody přináší bohatství polysacharidů, olejů, silic, které na sebe obracíjí zájem potravinářského a farmaceutického průmyslu o tyto rostliny. Většina druhů má nápadná květenství - úbory, která je činí dekorativními. Mnohé jsou speciálně pro tyto účely šlechtěny a pěstovány. Člověk se tedy zcela běžně setkává s druhy hvězdnicovitých rostlin ve volné přírodě, mnohdy je účelově pěstuje pro konzumaci nebo dekoraci. Bohužel mnohé produkty metabolismu nejsou člověku (popř. zvířeti) zcela neškodné a jejich konzumace, či pouhý kontakt může přinést zdravotní problémy. Právě tyto problémy jsou námětem předkládaného textu.

2. Toxikologicky významné produkty specializovaného metabolismu

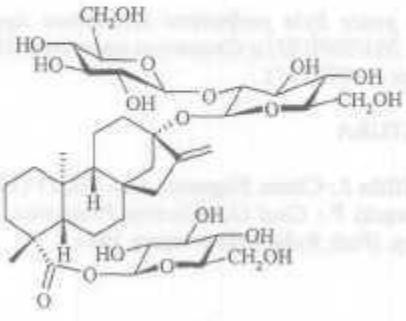
Inkriminovanými látkami jsou terpeny (kauranové deriváty, seskviterpenické laktony a thujon), pyrrolizidinové alkaloidy a polyiny (polyacetyleny).

2.1. Kaurany

Kaurany jsou diterpeny s rigidní tetracyklickou strukturou. V přírodě se většina kauranových derivátů vyskytuje ve formě derivátů kaurenu ((–)-kaur-16-enu) *(I).* Kauren je též intermediátem biosyntézy řady rostlinných a houbových metabolitů, včetně giberelinů a diterpenových alkaloidů. Kaurany jsou v rostlinách široce rozšířené. Vykazují významnou biologickou aktivitu včetně toxicity. Ve vztahu k rostlinám čeledi *Asteraceae* je třeba se zmínit o kaurenových glykosidech druhu *Stevia rebaudiana* a glykosidech 2-hydroxykaurenu a 2-hydroxy-19-norkaurenu označovaných jako atraktylosidy popř. karboxyatraktylosidy z rodu řepeň *(Xanthium).* Steviosid *(II)* izolovaný z listů stévie *(Stevia rebaudiana)* je široce užívanou náhražkou sacharosy v diabetických a anorektických dietách. Vykazuje až 300x větší sladivost než sacharosa. Jeho využití jako potravního aditiva předcházely široké farmakologické a toxikologické studie, které vedly k limitované použitelné dávce 8 mg/kg/den (cit.[1]). Toxikologicky významné studie prokázaly při vysokých dávkách mutagenitu u *Salmonella typhimurium*[2,3]. Dávky 8 mg/kg u potkanů způsobovaly hypotenzi, zvýšenou diurézu anatriurézu[4,5]. Podání steviosidu potkanům v dávce 1,5 g/kg podkožně zvyšovalo hladinu močoviny v krvi, plazmatického kreatininu a způsobovalo glykosurii. Způsobuje degeneraci buněk proximálních tubulů v ledvinách[6]. Perorální podávání steviosidu (2,5 g/kg/den) křečkům po 12 týdnů vyvolalo inhibici glukosové absorpce zprostředkované redukcí aktivity střevní Na^+/K^+ ATPasy a absorptivity v příslušné oblasti střeva. Nižší dávky nepůsobily žádné změny[7]. Steviosid a jeho aglykon steviol signifikantně ovlivňují řadu mitochondriálních funkcí, a to především narušením dílčích pochodů oxidační fosforylace[8]. Dlouhodobé a výrazné překračování doporučované dávky může, podle výše uvedeného, představovat určité zdravotní riziko.

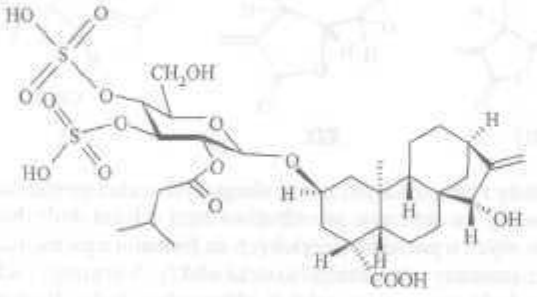


I

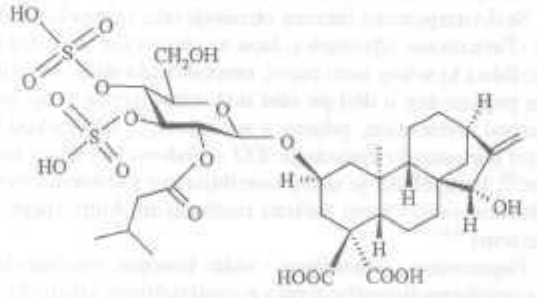


II

Glykosidy atraktylosid *(III)* a karboxyatraktylosid *(IV)* vykazují strychninový účinek, jsou specifickými inhibitory ADP/ATP transportu přes mitochondriální membrány. Váží se na ADP/ATP nosič (adeninnukleotidtranslokasa) a stabilizují jej na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány, tak je znemožněn přenos do matrix mitochondrie. Druhá karboxylová skupina v *IV* výrazně zvyšuje inhibiční efekt - *in vivo* je *IV* 10 krát toxičtější než ///. Naopak aglykon pocházející od ///je 150 krát méně aktivní než glykosid[9]. Intravenózně podaná dávka 13 μmolu/kg *IV* nebo 32,4 μmolu/kg /// vyvolala u psů hlubokou hypoglykémii, respirační depresi a hypoxemii[10]. V izolovaných potkaních mitochondriích redukovala dávka 53 μmolu *III* dýchání na 50 % (cit.[11]). 15-oxo-16,17-dihydroderivát /// byl také izolován jako glukuronosid z lidské moči, toto lze vysvětlit metabolizací kaurenových derivátů přítomných v kávě[12,13]. V čeledi *Asteraceae* byl tento typ látek prokázán jako toxické agens rodu *Xanthium. X. strumarium* a *X. spinosum* jsou zastoupeny i v naší flóře. V zahraniční literatuře jsou popisovány rozsáhlé intoxikace domácího skotu[14,15]. Toxikologické studie se provádí i u nás[16]. Oba druhy jsou v některých zemích oblíbenou léčivou rostlinou.



III

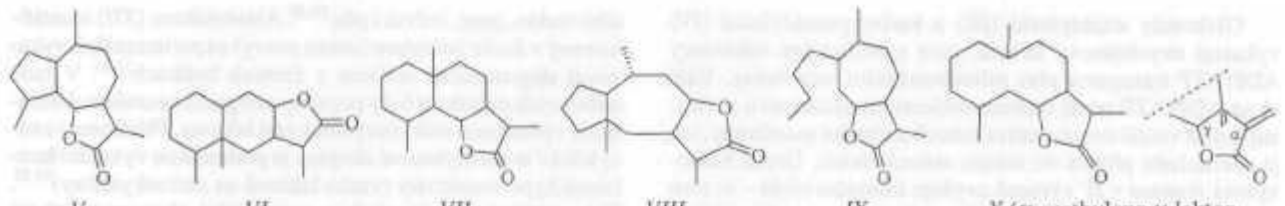


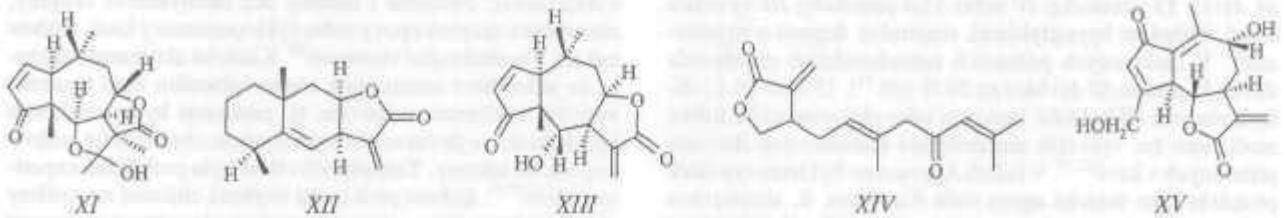
IV

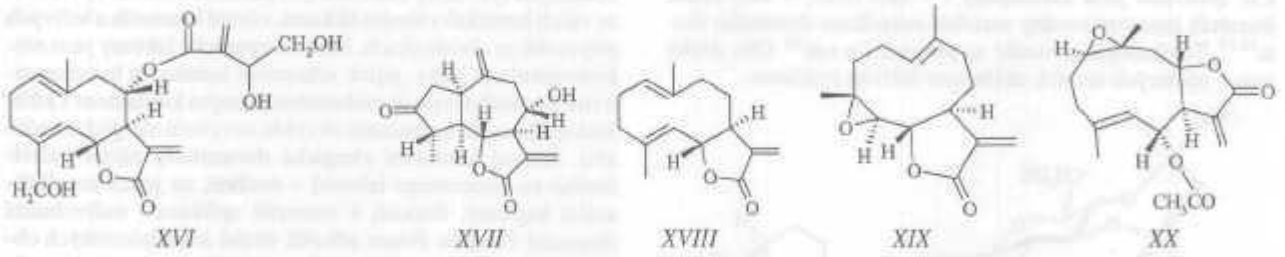
2.2. Seskviterpenické laktony

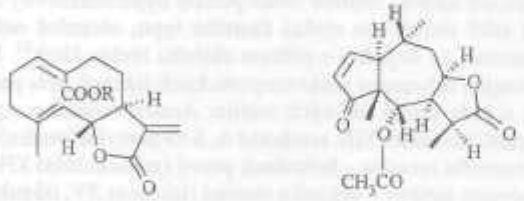
Seskviterpenické laktony se velmi hojně vyskytují v čeledi *Asteraceae,* často jsou hořkými, zřídka vonnými metabolity jejích druhů. Dělí se na několik strukturních typů - guajanolidy *(V),* eremofilanolidy *(VI),* eudesmanolidy *(VII),* pseudoguajanolidy *(VIII),* xanthanolidy *(IX)* a nejrozsáhlejší skupinou jsou germakranolidy *(X).* Tyto typy jsou obvykle druhově specifické[17,18]. Vedle řady pozitivních biologických efektů (jsou účinnými látkami významných léčivých rostlin) vykazují některé nežádoucí až toxické, či alergenní účinky. Zvláště významné údaje byly zaznamenány v souvislosti s intoxikacemi ovcí spásajících druhy rodu *Helenium* (záplevák). Příčinou byl lakton tenulin *(XI)* způsobující podráždění zažívacího traktu, jater, ledvin i plic[19,20]. Alantolakton *(XII)* identifikovaný v *lnula helenium* (oman pravý) experimentálně vykazoval degranulační aktivitu v žírných buňkách[21,22]. V řadě odborných publikací byly popsány alergické kontaktní dermatitidy způsobené seskviterpenickými laktony. Přítomnost exocyklické α-methylenové skupiny je podmínkou vyvolání kontaktní hypersenzitivity (vazba laktonů na aminokyseliny)[23-25]. Toto zjištění přináší závěr o potenciální alergenní aktivitě u více jak 400 seskviterpenických laktonů identifikovaných v *Asteraceae.* Nicméně i laktony bez methylenové skupiny, ale nesoucí skupinu epoxy nebo cyklopentenový kruh, mohou mít též senzibilizující vlastnosti[26]. Klinické zkušenosti ukazují, že jednotlivci senzitivní k těmto laktonům mají tendenci vytvářet zkříženou reaktivitu, tj. prokazují hypersenzitivitu i při kontaktu s jiným rostlinným druhem obsahujícím seskviterpenické laktony. Tato přecitlivělost byla prokázána experimentálně[27-31]. Jednou prokázaná zvýšená citlivost na rostliny obsahující tyto látky znamená pro pacienta nutnost vyvarovat se všech kontaktů s těmito látkami, včetně kosmetik a léčivých přípravků je obsahujících. Seskviterpenické laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzitivitu pozdního typu je podmíněna přímým kontaktem s kůží. Jiná aplikace do organismu obvykle nevyvolá alergickou odezvu. Rozvoj kontaktní alergické dermatitidy závisí individuálně na koncentraci laktonů v rostlině, na jejich senzibilizující kapacitě, četnosti a intenzitě aplikace i individuální dispozici člověka. Pouze několik druhů hvězdnicovitých obsahujících laktony mohou vedle pozdní hypersenzitivity způsobit také alergickou reakci časného typu, nicméně nebylo prokázáno, že se jedná o přímou aktivitu těchto látek[32]. Senzibilizující schopnost seskviterpenických laktonů byla prokázána u řady druhů léčivých rostlin: *Arnica montana* - prha chlumní (helenalin *XIII,* arnikolid A, 6-O-acetylhelenalin)[33,34], *Chamomilla recutita* - heřmánek pravý (anthekotulid *XIV*)[30], *Cichorium intybus* - čekanka obecná (laktucin *XV,* laktukopikrin)[35], *Cnicus benedictus* - benedikt lékařský (knicin *XVI)*[36], *Cynara scolymus* - artyčok zeleninový (grossheimin *XVIII)*[37], *Helianthus annuus — slunečnice roční* (1,2-anhydrido-4,5-dehydroniveusin-A ap.)[38], *lnula helenium* - oman pravý *(XII,* izoalantolakton a další)[28,29,31,39], *Lactuca sativa* - locika setá, *L. virosa* - locika jedovatá *(XV,* laktupikrin)[40], *Saussurea lappa* - chrpovník lopuchový (kostunolid *XVIII)*[41] *Pyrethrum parthenium* - řimbaba obecná (parthenolid *XIX)*[42], *Pyrethrum cinerariifolium* - řimbaba starčkolistá (pyrethrosin *XX)*[43], *Taraxacum officinale* (glukosid kys. taraxinové *XXI)*[44] - pampeliška lékařská.

Druh *Arnica montana* a její tolerovaná náhražka *Arnica chamissonis* ssp. *foliosa* jsou tradičními léčivými rostlinami používanými ve značném počtu indikací. Prha, mimo jiné, obsahuje také až 0,3 % seskviterpenických laktonů, polyiny a prokázán byl pyrrolizidinový alkaloid. Vzpomenuté látky jsou často zdroji nežádoucích účinků. *XIII* je toxický pro savce (LD50 se pohybuje od 85 mg/kg u křečka, do 150 mg/kg u ovcí)[45], intoxikace člověkaje dokumentována pouze starými literárními údaji[46,47]. Jsou popisovány: abortivní efekt, silné zvracení, tachykardie, hyperemie obličeje, bodavá bolest, dechová dysfunkce, smrt způsobená cirkulační paralýzou. Alergická reakce v podobě kontaktních dermatitid po topické aplikaci léčiv a kosmetik je prokázaná i současnými studiemi a incidence hypersenzitivní odezvy se stále zvětšuje. Odpovědný je obsah X///ajeho derivátů a arnikolid A (cit.[48]) *(XXII).*









Výskyt laktonů vyvolávajících reakci organismu je zaznamenán i v heřmánku pravém. Rostlina je značně fytochemicky prostudována, její obsahové látky mají velmi dobrou terapeutickou hodnotu, nicméně obsah seskviterpenů (především *XIV)* a polyinů je příčinou i nežádoucích účinků. Pěstované (šlechtěné) chemotypy však obsahují toxické laktony minimálně. Běžně se vyskytují v příbuzném druhu *Anthemis cotula* - rmen smrdutý. Případy alergických reakcí (kontaktních dermatitid) na heřmánek jsou již dlouho zaznamenávány, i když v mnohých případech byla dodatečně zjištěna záměna za rmen. Za aktivitu je odpovědný *XIV* a hypersenzitivita na něj má charakter zkřížené reakce[49]. Bylo popsáno několik případů zánětu spojivky, nosní sliznice, průdušek, astmatu až anafylaktické reakce po pití heřmánkového čaje a vdechnutí siličných par do plic[50-54]. Skutečná příčina není přesně definována - alergenem je pravděpodobně bílkovinná složka.

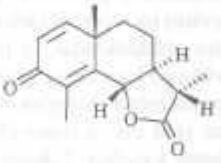
Pyrethrumparthenium (*Chrysanthemum parthenium*) - řimbaba obecná (nesprávně označovaná jako vratič obecný) obsahuje kromě silice nejméně 11 seskviterpenických laktonů (artekanin, kanin, chrysanthenolid, chrysanthenin A, B a další). Hlavním je *XIX.* Řimbaba je obecně uznávanou léčivou rostlinou, její indikační oblast zahrnuje bolesti hlavy včetně migrenózních, bolesti žaludku, zubů, menstruační obtíže ap. Je zajímavé, že přes obecně přijímanou opatrnost při využívání této rostliny v terapii nebyly, kromě alergických reakcí morčat naparthenolid[55] a zkříženou přecitlivělost mezi dalšími druhy hvězdnicovitých u pacientů alergických na řimbabu a parthenolid[56], zaznamenány významnější toxické efekty. Alergizující schopnost byla pozorována také u příbuzného druhu *Pyrethrum cinerariifolium* (řimbaba starčkolistá) obsahující *XX* (cit.[44]).

Seskviterpenické laktony obsahuje také pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale*). Jsou to především deriváty taraxakolidu a kyseliny taraxinové, taraxakosid a další. Intoxikace jsou popisovány u dětí po sání mléčného latexu, projevují se nauzeou, zvracením, průjmy a arytmiemi[57]. Alergickou kontaktní dermatitidu způsobuje *XXI* - glukosid kyseliny taraxinové[58]. Pampeliška je slabý senzibilizátor s tendencí vyvolat zkříženou reakci mezi dalšími rostlinnými druhy (např. heřmánkem)[59]-[60].

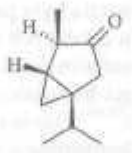
Eupatorium cannabinum - sadec konopáč obsahuje laktony germakranolidového typu a pyrrolizidinové alkaloidy s nasycenou necinovou částí. Ostatní metabolity pravděpodobně nebudou příčinou nežádoucích účinků. Seskviterpenický lakton eupatoriopikrin vykazuje LD_{50} u myší 20–40 mg/kg (nitrobřišně). Pro člověka používání drogy představuje potenciální zdravotní riziko a vyžaduje omezení v příjmu. Laktony jsou alergenní a to především v období kvetení[63].

Zajímavým metabolitem z pohledu fyziologického působení je seskviterpenický lakton a-santonin *(XXIII)* z *Artemisia cina* (pelyněk cicvárový). Rostlina není sice domácí provenience, nicméně ve farmacii patří k tradičním hlístopudným prostředkům, jejichž účinnost je dána výše uvedeným laktonem (přítomné jsou i jeho deriváty - artemisin, monogynin, mibulakton ap.). Terapeutická šíře santoninu není velká. Vnímavost na vedlejší účinky je velmi rozmanitá, obecně však vyšší u dětí[64]. Letální dávka pro člověka byla zaznamenána po 15 mg/kg perorálního podání[65]. U dětí může již 60 mg v jedné

dávce vyvolat vážné zdravotní komplikace a dvojnásobná dávka úmrtí[66]. V jiném případě byly popisovány až trojnásobné dávky bez významnější odezvy. Konzumace 10 g Flos cinae vedlo po dvou dnech k úmrtí[67]. Intoxikace santoninem se projevuje bolestmi hlavy, apatií, poruchami sluchu, perspirací až kardiovaskulárním a respiračním kolapsem. K dalším popisovaným projevům patří bolestivé močení, albuminurie, hematurie, edém sleziny a hypotermie. Centrální nervový systém je santoninem stimulován až k epileptiformním křečím, mohou se projevit halucinace, závratě, těkavost i blouznění. Jsou ovlivněny receptory sítnice (xanthopsie), zpočátku stimulačně, později tlumivě[57].



XXIII



XXIV

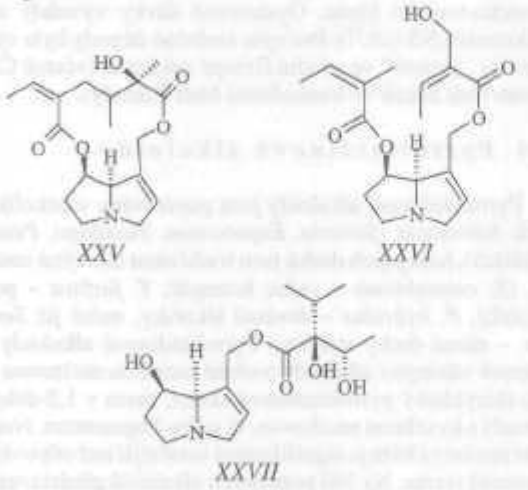
2.3. Thujon

Seskviterpenické laktony jsou popisovány i v dalších druzích rodu *Artemisia,* nicméně toxicita rodu je vztahována především k obsahu thujonu *(XXIV)* - bicyklické monoterpenické složce silice pelyňku pravého (A. *absinthium),* kozalce kořenného (A. *dracunculus),* pelyňku brotanu *(A. abrotanum),* pelyňku ročního (A. *annua),* pelyňku kamčatského (A. *verlatorum)* a dalších pelyňků (u nás se nevyskytujících), ale také ve vratiči obecném *(Tanacetum vulgare)* a dalších rodech a jejich druzích čeledi *Asteraceae.* Thujon je bicyklický thujanový monoterpenický keton. Silice ho obsahují 3 až 75 % (cit.[68]) Kontakt pokožky se silicí obsahující thujon způsobí její podráždění, svědění až ekzémy. Po požití mohou vznikat zdravotní problémy doprovázené zvracením, průjmem, hypertenzí, tachykardií, krvácením žaludeční sliznice, bronchopneumonií, edémem plic, klonicko-tonickými křečemi a degenerativními změnami na játrech a ledvinách. Rozsah projevů podmiňuje dávka přijatého agens a citlivost organismu na thujon[69]. Psychoaktivní vlastnosti látky jsou studovány v souvislosti s intoxikací označovanou jako absintismus vznikající následkem abúzu k alkoholickému nápoji - absintu. Tato populární lihovina konce minulého století obsahovala silici pelyňku pravého a dalších drog - zastoupení thujonu bylo značné. Absintismus jako zdravotní problém získal popularitu především pro svoji oblíbenost mezi velikány světové kultury. Koncem 80. let bylo publikováno několik odborných pojednání rekonstruujících zdravotní problémy Vincenta van Gogha. O něm se tradovalo, že své poetické vize měl podmíněné epilepsií a digitalisovou terapií, nicméně umělec nikdy epilepsii diagnostikovanou neměl a není známo, že by byl léčen digitalisem. Jeho abúzus alkoholického absintu byl však znám dobře. Dlouhodobé nadměrné pití absintu vedlo k exaltacím, sluchovým a zrakovým halucinacím, excitaci, později k nepříjemným halucinacím, křečím, paranoi, akutní manii, bolestem hlavy a hyperestézii[70]. Bezpochyby ovlivnění CNS bylo zapříčiněno obsahem thujonu v pelyňkové silici. Experimentálně bylo prokázáno podráždění žaludku po pelyňkové silici, nitrožilní podání (50 μl) způsobí u králíků významnou excitaci autonomního nervového systému s následnými projevy epileptického záchvatu. Thujon aplikovaný nitrožilně způsobuje klonicko-tonické křeče. Opakované dávky vyvolaly trvalé poškození CNS (cit.[71]). Pro výše zmíněné důvody byla výroba a prodej „absintu" ve střední Evropě zakázána (včetně ČSSR, patrně však nikoli ve frankofonní části Kanady).

2.4. Pyrrolizidinové alkaloidy

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou popisovány v několika rodech Asteraceae *(Senecio, Eupatorium, Tussilago, Petasites* a dalších), řada jejich druhů jsou tradičními léčivými rostlinami. *(E. cannabinum* - sadec konopáč, *T. farfara* - podběl lékařský, *P. hybridus* - devětsil lékařský, méně již *Senecio* spp. - různé druhy starčku). Pyrrolizidinové alkaloidy jsou esterově vázanými alkaloidy tvořené bazickou necinovou složkou (bicyklický pyrrolizidinový skelet, často v 1,2-dehydro--formě) a kyselinou necikovou, či jejím fragmentem. Nenasycená necinová báze je signifikantně toxičtější než odpovídající nasycená forma. Na 360 popsaných alkaloidů představují makrocyklické diestery, diestery otevřené nebo monoestery. Na základě biogeneze je lze rozdělit do 5 strukturních skupin, z nichž 3 jsou typické pro *Asteraceae*[72] - senecioninový typ (cca 100 struktur, *XXV),* triangularinový typ (60 struktur, *XXVI)* a lykopsaminový typ (cca 110 struktur, *XXVII).* Pyrrolizidinové alkaloidy byly nalezeny v kořenech, stoncích i květenstvích ve všech vývojových stupních. Je prokázána orgánová a pletivová specifická distribuce. Jsou syntetizovány v kořenech ve formě N-oxidů, poté lýkovou částí svazků cévních transportovány do místa uskladnění - buněčných vakuol. V hydrofilním prostředí vakuol jsou uloženy v původní N-oxidové formě. Ztrátou vody mohou přecházet do formy terciární báze[73]. Bylo prokázáno, že solím podobné polární N-oxidy jsou metabolicky netoxické a nejsou nebezpečné. Chovají se jako aminokyseliny - nemohou přecházet nespecificky mezi subbuněčnými nebo buněčnými kompartmenty na rozdíl od většiny terciárních alkaloidů. Transmembránový transport N-oxidů by vyžadoval specifický membránový nosič. N-Oxidy jsou relativně nestálé, lehce redukovatelné (stačí přítomnost cysteinu). Ve střevech obratlovců jsou netoxické N-oxidy redukovány na toxické terciární alkaloidy, tyto díky své lipofilitě neprotonovaného stavu pasivně pronikají membránami[74]. V jaterních buňkách jsou enzymově oxidovány na odpovídající pyrrolový derivát, který hydrolýzou přechází na derivát s vysoce alkylující exocyklickou methylenovou skupinou. Je to poněkud nešťastný metabolický proces, protože multifunkční oxidasy jsou obvykle odpovědné za detoxikační procesy probíhající v játrech[75,83]. N-Oxidy jsou lehce extrahovatelné z rostlinného materiálu, jsou tedy jistou součástí čajového nálevu připraveného z inkriminované drogy. Alkaloidy se výše uvedeným mechanismem rychle koncentrují v cílových orgánech -játrech a plicích. Podléhají detoxikační biotransformaci molekuly, a jak je uvedeno výše, jedna z jejich cest vede paradoxně k tvorbě pyrrolových derivátů silně elektrofilního charakteru, které po ztrátě zbytku kyseliny necikové reagují s nukleofily. Výsledkem jsou kovalentní spojení s proteiny, RNA a DNA. Tzv. kovalentní vazebný index k DNA (CBI) makrocyklických diesterových pyrrolizidinových alkaloidů - senecioninu nebo seneciofylinu je silnější než odpovídající hodnota pro benzpyren, stejná jako pro acetylaminofluoren a jen o málo nižší než pro aflatoxiny[76,88] Tento proces

je v bezprostředním vztahu k hepatotoxicitě, karcinogenitě a mutagenitě[89-92].

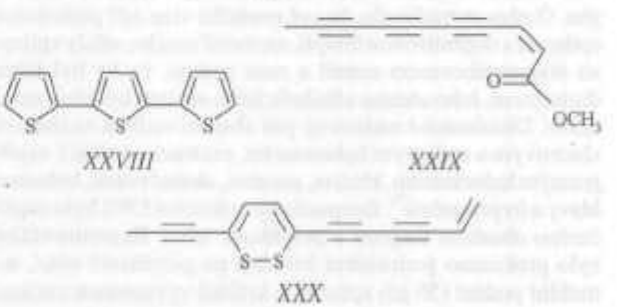


Není pochyb, že tyto alkaloidy jsou toxické pro člověka, bylo popsáno mnoho případů intoxikací po příjmu pyrrolizidinových alkaloidů ve formě fytofarmaka nebo potravy. Klinický obraz korespondoval s poškozením jater, rozvojem cirhózy a ascitu. Klíčovým syndromem intoxikace těmito alkaloidy je veno-okluzivní onemocnění (VOD) - senecióza. Extrapolovaná smrtná dávka těchto alkaloidů se pohybuje od 0,5 mg/kg do 3,3 mg/kg denního příjmu[77-79]. Senecióza je především onemocnění domácích zvířat (nejznámější je „Žďárská choroba koní") spásajících louky kontaminované starčkem (*Senecio)* nebo otočníkem (*Heliotropium* z čeledi *Boraginaceae),* nicméně byla popsána řada závažných VOD u člověka. V roce 1988, na základě rozsáhlých fytofarmakoepidemiologických studií, byl zaznamenán nejvážnější případ intoxikace člověka[80]. Bylo diagnostikováno VOD u novorozence, bezpochybně byla prokázána příčina v pravidelném příjmu alkaloidů jeho matkou v těhotenství. Matka si dlouhodobě připravovala léčivý čaj z podbělu a devětsilu. VOD způsobené těmito látkami se rozvíjí do tří stupňů: akutní VOD syndrom, subakutní a chronický VOD syndrom. Mortalita je signifikantně vyšší než u jiných forem cirhotického poškození jater. Identické symptomy jsou popisovány u všech případů intoxikací zvířat i experimentálních stavů[81,82], navíc tyto experimenty prokázaly poškození nejen jaterní tkáně, ale také plic, přičemž platí, že toxické metabolity mohou vznikat pouze v játrech. Je zřejmé, že jejich distribuci zajišťuje krevní transport[83,84]. Bylo prokázáno, že také jaterní tkáň lidského plodu je schopna metabolizovat alkaloidy na toxické pyrroly[85], případ novorozence s VOD byl již vzpomenut. Také experimenty na potkanech a myších v období březosti a laktace určují tato období jako riziková pro nový organismus[86,87]. Dosud registrované výsledky toxikologických studií vedly k limitování příjmu alkaloidů. Pro vnitřní použití je doporučen denní příjem pod 10 mg pyrrolizidinových alkaloidů, pro externí 100 mg po dobu maximálně 6 týdnů v roce. Také homeopatika nesmějí obsahovat více než 1 ppm těchto alkaloidů[61,62]. Zásadní omezení platí pro dobu těhotenství a laktace.

Pyrrolizidinové alkaloidy poškozují kromě jater a plic i další systémy. Bylo popsáno poškození centrálního nervového systému (Ozhalanger encephalitis)[36].

2.5. Polyiny

Více než 700 polyacetylenových sloučenin (polyinů) a jejich derivátů bylo dnes již izolováno a popsáno, podstatná část z nich je zastoupena v druzích čeledi *Asteraceae*[93,99]. Jejich tvorbu v organismu rostliny doprovází zatím řada otazníků, nicméně je prokázán jejich cytotoxický efekt vůči baktériím, houbám, nematodům a hmyzu. Nejaktivnější jsou thiofenové, furanové a disulfidové deriváty a zvláště významný chemotaxonomický atribut - terthiofen *(XXVIII),* jejichž výskyt je omezen právě do čeledi hvězdnicovitých. Tyto látky jsou fotosenzibilizátory, ale jejich toxicita může být komplexnější, zahrnujíc i nefotodynamické mechanismy působení. I když fototoxicita byla prokázána především na mikroorganismech, hmyzu a lidských erytrocytech, lze předpokládat, že patogeneze kožních defektů zvířat a člověka po kontaktu s některými zástupci hvězdnicovitých bude podmíněna stejnými mechanismy[94,95]. Fototoxicky významné jsou *cis-* a *trans-*izomery dehydromatrikaria esteru (methylester kyseliny 2-decen-4,6,8--triinové, *XXIX)* a dehydromatrikarinol identifikované v pelyňku Černobýlu, v druzích heřmánku a řebříčku, thiarubrin A *(XXX),* C (dithiacyklohexadienový polyin) izolovaný z třapatky srstnaté (*Rudbeckia hirta),* thiofenové polyiny ze svatoliny cypřišovité *(Santolina chamaecyparissus)* a ambrózie *(Ambrosia* spp.), furanový poly-en-in i spirocyklický difuranový polyin kopretiny bílé *(Leucanthemum vulgare)*[94,95]. Zvláštní pozornost by vyžadoval velmi specifický metabolit *XXVIII* s významnou biologickou aktivitou (obvykle přiřazovaný ke skupině thiofenových polyinů), jeho význam však klesá, zaměříme-li se na farmaceuticky využitelné druhy čeledi. Rozvoj fototoxické reakce je podmíněn řadou faktorů, mnohé dermatitidy popisované jako výsledek kontaktu s rostlinou nemusí být následkem fotodynamického působení. Toto se rozvíjí v případě polyacetylenů dvojím mechanismem. Typ I - zahrnuje tvorbu aktivované látky při působení UV záření - pravděpodobně volného radikálu, který pak poškozuje buňky. Typ II - polyiny přenáší energii k molekulárnímu kyslíku a mění jej v toxický singletový kyslík působící v cílové buňce. První je typický pro acyklické řetězce, biologická aktivita je závislá na počtu konjugovaných trojných vazeb. Cyklické části v molekule garantují průběh II. typu[96-98]. Projevy poškození jsou popisovány jako anomálie v buněčném dělení, změna permeability membrán a s tím související změny v aktivních transportních procesech, poruchy glykolýzy a buněčného dýchání, porušení syntézy bílkovin a DNA a buněčná smrt. Klinické projevy fotosenzibilizace závisí na typu fotodynamické látky, jaké její množství se dostalo periferním oběhem do pokožky, jak dlouhé bylo působení UV záření (stupeň poškození ovlivňuje ochrana pokožky před působením zá-



ní). Počáteční svědění, pálení a celkový nepokoj následuje erytém a edém, časté sekundární infekce mohou vést až k nekrotizaci velkých ploch pokožky. Z celkových projevů se může objevit žloutenka. Podle dosavadních znalostí fototoxické metabolity rostlin čeledi *Asteraceae* nedosahují takové toxikologické významnosti jako fotosenzibilizátory přítomné v jiných čeledích cévnatých rostlin[95].

3. Závěr

Nakonec bychom se odvolali na název článku, který ukazuje hranice našeho zájmu o bioaktivní metabolity rostlin čeledi hvězdnicovitých. Spektrum obsahových látek tak rozsáhlého taxonu je natolik různorodé, že bychom pracovali s podstatnou částí databáze strukturních typů produktů rostlinného metabolismu, abychom jej postihli. Řada autorů tak učinila již před námi[99-101], nicméně informační smršť přinášející ročně až 10 000 identifikovaných nových přírodních látek a jejich derivátů do paměťových katalogů si žádá užší třídění zájmů. Farmaceutické prostředí dnes zajímá především interakce mezi látkou (léčivo, jed) a organismem (člověka, zvířete), terapeutická šíře, biologická dostupnost, nežádoucí a toxické účinky, eliminace z organismu. Snaha Evropské unie o unifikaci požadavků na kvalitu všech typů léčiv včetně fytofarmak zvyšuje zájem o toxikologické studie vegetabilních drog a jejich biologicky aktivních metabolitů, které chyběly nebo byly nedostatečné. Toxikologie přírodních látek je součástí pre- i postgraduální výchovy posluchačů farmacie. Tímto směrem se ubírají i některé naše výzkumné projekty.

Realizace výzkumných projektů a napsání této publikace je umožněno grantovou podporou FRVS č. F1388/199, GA UK 115/1998/B B10.

LITERATURA

1. Xili L., Chengijany B., Ervi X., Reiming S., Yuengming W., Haodong S., Zhiyian H.: Food Chem.. Toxicol. *30,* 957 (1992).
2. Matsui M., Sofuni T., Nohmi T.: Mutagenesis *11,* 565 (1996).
3. Procinska E., Bridges B. A., Hanson J. R.: Mutagenesis *6,* 165 (1991).
4. Melis M. S.: J. Ethnopharmacol. *36,* 213 (1992).
5. Melis M. S.: J. Nat. Prod. *55,* 688 (1992).
6. Toskulkao C, Deechakawan W., Leardkamolkan V., Glinsukon T., Buddhasukh D.: Phytother. Res. *8,* 281 (1994).
7. Toskulkao C, Sutheerawatanananon M.: Nutr. Res. *14,* 1711 (1994).
8. Vignais P. V., Duce E. D. Vignais, P. M., Huet J.: Biochim. Biophys. Acta *118,* 465 (1966).
9. Ishii E. L., Schwab A. J., Bracht A.: Biochem. Pharmacol. *36,* 1417(1987).
10. Koechel D. A., Krejci M. E.: Toxicol. *79,* 45 (1993).
11. Obatomi D. K., Bach P. H.: Tox. Lett. *82,* 89 (1996).
12. Maier H. G., Wewetzer H.: Unters. Forsch. *167,* 105 (1978).
13. Ludwig H., Obermann H., Spiteller G.: Chem. Ber. *107,* 2409 (1974).
14. Cole R. J., Stuart B. P., Landsen J. A,, Cox R. H.: J. Agric. Food Chem. *28,* 1330(1980)
15. Cutler H. G., Cole R. J.: J. Nat. Prod. *46,* 609 (1983).
16. Jahodář L.: Dosud nepublikováno.
17. Seaman F. C: Bot. Rev. *48,* 121 (1982).
18. Rodriguez E., Towers G. H. N., Mitchell J. C: Phytochemistry *15,* 1573 (1976).
19. Herz W., v knize: *Effects of poisonous plant on livestock* (Keeler R. F., van Kampen K. R., James L. R., ed.). Academic Press, New York 1978.
20. Kim H. L., Rowe L. D., Camp B. J.: Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. *11,* 647(1975).
21. Witzel D. A., Ivie G. W., Dollahite J. W.: Am. J. Vet. Res. *37,* 859 (1976).
22. Elissalde M. H., Drowe L., Elissalde G. S.: Am. J. Vet. Res. *44,* 1894(1983).
23. Picman A. K., Rodriguez E., Towers G. H. N.: Chem. Biol. Interact. *28,* 83 (1979).
24. Dupuis G., Mitchell J. C, Towers G. H. N.: Can. J. Biochem. 52, 575(1974).
25. Dupuis G., Benezra C, Schlewer G., Stampf H.: Molec. Immunol. *17,* 1045 (1980).
26. Hausen B. M. Schmalle H. W.: Cont. Derm. 75, 329 (1985).
27. Picman A. K., Picman J., Towers G. H. N.: Cont. Derm. *8,* 294 (1982).
28. Benezra C, Schlewer G., Stampf J. L.: Rev. Franc. Allergol. *18,* 31 (1979).
29. Bleumink E., Mitchell J. C, Geissman T. A., Towers G. H. N.: Cont. Derm. 2, 81 (1976).
30. Hausen B. M., Busker E., Carle R.: Planta Med. *50,* 229 (1984).
31. Stampf J. L., Schlewer G., Ducombs G., Foussereau J., Benezra, C: Br. J. Derm. *99,* 163 (1978).
32. Senff H., Kalveram K. J., Huhlwein A., Hausen B. M.: Allergology 72,51 (1989).
33. Epstein W. L., Reynolds G. W., Rodriguez E.: Arch. Derm. 7/6, 59(1980).
34. Manners C. D., Ivie G. W., Mac Gregor J. T.: Toxicol. Appl. Pharmacol. *45,* 629 (1987).
35. Hausen B. N., Andersen K. E., Helander I., Gensch K. H.: Cont. Derm. *15,* 246 (1986).
36. De Smet P. A. G. M., Keller K., Hánsel R., Chandler R. F. (ed.): *Adverse Effects of Herbal Drugs,* sv. 1, str. 196, 231. Springer Verlag, Berlin 1992.
37. Hausen B. M.: *Allergiepflanzen-Pflanzenallergene,* sv. 1. Ecomed, Landsberg-München 1988.
38. Hausen B. M., Spring O.: Cont. Derm. *20,* 326 (1989).
39. Calnan C. D.: Cont. Derm. *4,* 115 (1978).
40. Hausen B. M., Andersen K. E., Helander I., Gensch K. H.: Cont. Derm. 75, 246 (1986).
41. Cheminat A., Stampf J. L., Benezra C, Farrall M. J., Frechet J. M. J.: Acta Derm. Venerol. *61,* 525 (1981).
42. Hausen B. M., Osmundsen E.: Acta Derm.Venerol. *63,* 63 (1983).
43. Mitchell J. C, Dupuis G., Towers G. H. N.: Br. J. Derm. *86,* 568 (1972).
44. Hausen B. M.: Derm. Beruf Umwelt *30,* 51 (1982).
45. Williams W. L., Chang G. S., Hall I. H., Lee K. H.: Biochemistry *23,* 5637 (1984).
46. Forst A. W.: Arch. Exp. Path. Pharmakol. *201,* 242(1943).

47. Merdinger O.: Münch. Med. Wschr. *85,* 1469 (1938).
48. Willuhn G.: Dtsch. Apoth. Ztg. *126,* 2038 (1986).
49. Hausen B. M., Busker E., Carle R.: Planta Med. *50,* 229 (1984).
50. Benner M. H., Lee H. J.: J. Allerg. *52,* 307 (1973).
51. Casterline C. L.: JAMA *244,* 330 (1980).
52. Zuskin E., Zkuric Z.: Br. J. Indust. Med. *41,* 88 (1984).
53. Subiza J., Subiza J. L., Hinojosa M., Garcia R., Jerez M., Valdivieso R., Subiza E.: J. Allergy Clin. Immunol. *84,* 353 (1989).
54. Subiza J., Subiza J. L., Alonso M., Hinojosa M. Garcia R., Jerez M., Subiza: Ann. Allergy *65,* 127 (1990).
55. Hausen B. M., Osmundsen P. E.: Acta Derm. Venerol. *63*, 308 (1983).
56. Schmidt R.J., Kongston, T.: Cont. Derm. *13,* 120(1985).
57. Roth L., Daunderer M., Kormann K.: *Giftpflanzen - Pflanzengifte,* 3. vyd., str. 125, 637. Ecomed, Landsberg-München 1988.
58. Hausen B. M.: Dermatosen *30,* 51 (1982).
59. Zeller W., De Gols M., Hausen B. M.: Arch. Dermatol. Res. *277,* 28(1985).
60. Larregue M., Rat J.-P., Gallet P., Bressieux J. M., Pousset J. L.: Ann. Dermatol. Venerol. (Paris) *105,* 547 (1978).
61. Anonymus: Pharm. Ztg. *135*, 2532, 2623 (1990).
62. Wiesenauer M.: *Homoopathie für Apotheker und Ärzte.* Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1989.
63. Evans F. J., Schmidt R. J.: Planta Med. *38,* 289 (1980).
64. Steinegger E., Hänsel R.: *Lehrbuch der Pharmakognosie*, 5. vyd., str. 167. Springer-Verlag, Berlin 1992.
65. Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (ed.): *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis,* 5. vyd., sv. 4: *Drogen* A-D., str. 368. Springer-Verlag, Berlin 1992.
66. Blacow N. W., Wade A. (ed.): *Martindale The Extra Pharmacopoeia, 26th Edn,* str. 156. The Pharmaceutical Press, London 1972.
67. Lewin L.: *Gifte und Vergiftungen. Lehrbuch der Toxikologie,* 5. vyd., str. 758. Karl F. Haug Verlag, Ulm/Donau 1962.
68. Banthorpe D. V., Baxendale D., Gatford C, Williams S. R.: Planta Med. *20,* 147 (1954).
69. Jahodář L., v knize: *Solutio*, str. 135. Medom, Praha 1997.
70. Albert-Puleo M.: Econ. Botany *32,* 65 (1978).
71. Arnold W. N.: JAMA *260,* 3042 (1988).
72. Hartmann T., Witte L., v knize: *Alkaloids: Chemical & Biological Perspectives* (Peletier S. W., ed.), sv. 9. Pergamon, GB-Trowbridge 1995.
73. Hartmann T., Ehmke A., Eilert U., Borstel K. von, Theuring C: Planta 777, 98 (1989).
74. Hartmann T.: Chemoecology *5/6, 3/4,* 139 (1994/1995).
75. Molyneux R. J.: Rev. Latinoamer. Quím. *19,* 135 (1988).
76. Eastman D. F., Dimenna G. P., Segall J.: Drug Metabol. Dispos. *16,* 236(1982).
77. Kumana C. R., Ng M., Lin H. J., Ko W., Wu P. C, Todd D.: Gut 26, 101 (1985).
78. Culvenor C. C. J., Edgar J. A., Smith L. W., Kumana C. R., Lin H. J.: Lancet *1,* 978 (1986).
79. Datta D. J., Khuroo M. S., Mattocks A. R., Aikat B. K., Chhuttani P. N.: J. Assoc. Phys. India *26,* 383 (1978).
80. Roulet M., Laurini R., Rivier L., Calame A.: J. Pediatr. *112*, 433 (1988).
81. Stuart K., Bras G.: Quart. J. Med. *26,* 291 (1957).
82. Schoental R.: Israel J. Med. Sci. *4,* 1133 (1968).
83. Barnes J. M., Magee P. N., Schoental R.: J. Pathol. Bacteriol. *88,* 521 (1964).
84. Butler W. H., Mattocks A. R., Barnes J. M.: J. Pathol. 700, 169 (1970).
85. Armstrong S. J., Zuckerman A. J.: Nature *228,* 569 (1970).
86. Luthy L., Heim T., Schlatter C: Toxicol. Lett. 77, 283 (1983).
87. Mattocks A. R., White I. N. H.: Chem. Biol. Interact. *15*, 173(1973).
88. Eastman D. F., Dimenna G. P., Segall J.: Drug. Metabol. Dispos. 76, 236(1982).
89. Takanashi H., Umeda M., Hirono J.: Mut. Res. *78,* 67 (1980).
90. Kraus C, Abel G., Schrimmer O.: Planta Med. 57, 89 (1985).
91. Styles J., Ashby J., Mattocks A.: Carcinogenesis 7, 161 (1978).
92. Anonymus: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans 10,* 265 (1976), *31,* 206 (1983).
93. Bohlmann F., v knize: *Chemistry and Biology of Naturally Occurring Acetylenes and Related Compounds* (Lam J., Breteler H., Arnason T., Hansen L. ed.). Elsevier, Amsterdam 1988.
94. Hudson J. B., Graham E. A., Lam J., Towers G. H. N.: Planta Med. *57,* 69(1991).
95. Baloun J., Jahodář L., Leifertová I., Štípek S.: *Rostliny způsobující otravy a alergie.* Avicenum, Praha 1989.
96. Constabel C. P., Neil Towers, G. H.: Planta Med. *55,* 35 (1989).
97. McLachlan D., Arnason T., Lam J.: Photochem. Photobiol. *39,* 177 (1984).
98. MacRae D. G., Yamamoto E., Towers G. H. N.: Bioch. Biophys. Acta *82,* 488 (1985).
99. Christensen L. P., Lam J.: Phytochemistry *30*, 2453 (1991).
100. Hegnauer R., v knize: *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood V. H., Harborne J. B., Turner B. L., ed.), str. 1, 283. Academic Press, London 1977.
101. *Dictionary of Natural Products.* Version 6:1. Chapman Hall - Electronic Pub. Div., London 1997.

L. Jahodář and J. Klečáková *(Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové):* **Toxicity with Respect to Pharmaceutically Important Species in the Family** *Asteraceae*

The large family of *Asteraceae* yields a broad spectrum of biologically active metabolites. Many of these compounds are applicable in medicine, some of them, however, exhibit adverse effects and a health risk, especially in self-medication with medicinal plants. The article is concerned with the toxicity of caurane diterpenes, sesquiterpenic lactones, thujone, pyrrolizidine alkaloids and polyynes. The biological activity and its intensity is related to the chemical structure, the mechanism of the effect and the clinical manifestations of intoxications are described forty species of medicinal plants are included with their potential adverse effects on human and animal organisms.

HOMOCYSTEIN - MOLEKULA TĚŠÍCÍ SE ROSTOUCÍ POZORNOSTI

KAMILA PŘISTOUPILOVÁ[a], TOMÁŠ IVAN PŘISTOUPIL[a] a MICHAEL HEYROVSKÝ[b]

[a]Na Hřebenkách 19, 150 00 Praha 5, [b]Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail: heyrovsk@jh-inst.cas.cz

Došlo dne 24.IV. 1998

Věnováno prof. Josefu Koštířovi k 92. narozeninám

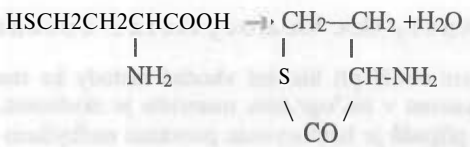
Klíčová slova: homocysteinemie, stanovení *S*-adenosylmethioninu, adenosin, oxid dusnatý

Obsah

1. Úvod
2. Homocystein v lékařství
3. Analytické metody pro stanovení homocysteinu
   3.1. Analytika homocysteinu obecně
   3.2. Stanovení homocysteinu v krvi
   3.3. Vyhlídky pro běžnou diagnostiku
4. Význam homocysteinu pro metabolismus buňky
   4.1. Seznam zkratek
   4.2. Vznik a recyklace homocysteinu, *S*-adenosylmethioninu, folátů a vitaminu B_{12}
   4.3. Vztahy mezi homocysteinem, foláty a vitaminem B_{12} v krevní plazmě
   4.4. Homocystein a metabolismus purinových nukleotidů
   4.5. Vztah homocysteinu k oxidu dusnatému v močovinovém cyklu
5. Závěr

1. Úvod

Aminokyselina homocystein, 2-amino-4-merkapto máselná kyselina $HS(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$, je nejbližší homolog cysteinu; na rozdíl od něj není součástí bílkovin. Počítá se mezi neesenciální aminokyseliny, tj. takové, které si organismus dokáže sám vytvořit. Jeho racemát krystalizuje z vodně-ethanolických roztoků, tvoří bezbarvé krystalky o bodu tání 233 °C, nad 263 °C se rozkládá. Chemicky má vlastnosti obdobné jako cystein[1], jeho odlišnou reakcí je tvorba thiolaktonu[2]:



(1)

který se zpětně rozevírá v alkalickém prostředí[3]. Reakcí síru obsahujících aminokyselin s kovy vazbou na dusík a síru vznikají cheláty[4], které mají u cysteinu a homocysteinu poněkud odlišné vlastností, protože cheláty cysteinu tvoří pětičlenné, kdežto cheláty homocysteinu šestičlenné kruhy. Podobně jako cystein, který přechází oxidací snadno na cystin, tvoří homocystein pod vlivem různých oxidačních činidel za mírných podmínek disulfid homocystin $HOOCCH(NH_2)(CH_2)_2SS(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$. Homocystin lze zpětně zredukovat na homocystein různými cestami, mezi jinými např. enzymaticky katalyzovanou specifickou reakcí s redukovaným glutathionem, která neplatí pro cystin[5].

Homocystin byl po prvé připraven v laboratoři amerického biochemika du Vigneauda[6] (pozdějšího nositele Nobelovy ceny za práce na biochemicky důležitých sloučeninách síry) demethylací a následující oxidací esenciální aminokyseliny methioninu $CH_3S(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$ zahříváním v koncentrované kyselině sírové. V téže laboratoři byly homocystin a homocystein posléze připraveny také synteticky[7]: reakcí benzylmerkaptoethyl chloridu s esterem malonové kyseliny, dekarboxylací produktu a následným odštěpením benzylové skupiny sodíkem v kapalném amoniaku vznikl homocystein a z něj oxidací homocystin.

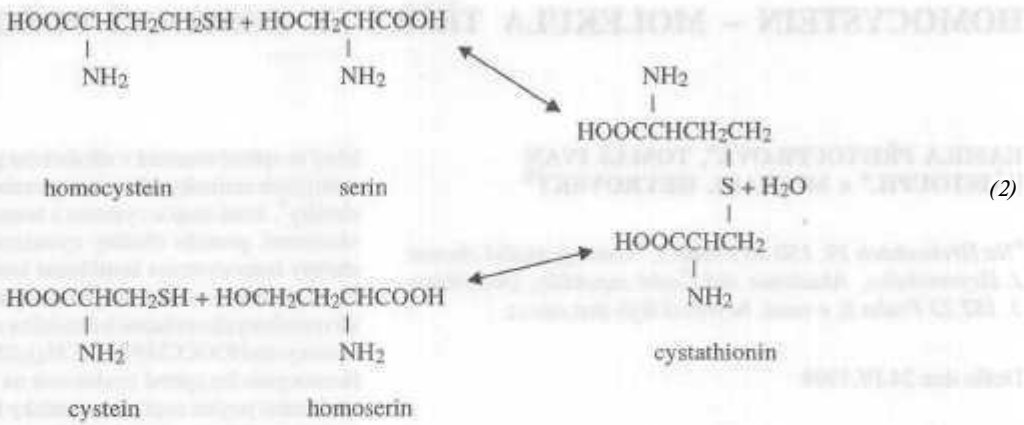
Demethylace methioninu na homocystein a podobně i zpětná reakce methylace homocysteinu na methionin probíhají *in vivo* za enzymatické katalýzy[8] v živočišných a rostlinných organizmech i v mikroorganizmech (viz níže). Významnou reakcí homocysteinu je jeho enzymatická přeměna na cystein a zpět přes společný meziprodukt cystathionin[9] viz (2).

Praktické použití nacházel homocystein jako léčivo (viz níže) a k dochucování potravin místo glutamátu.

Vzhledem k výše uvedeným vlastnostem byl homocystein nejprve pokládán pouze za jednu z mnohých biologicky účinných molekul; v učebnicích biochemie je dosud jen krátce zmiňován ve spojitosti s cystathioninem nebo s rozsáhle pojednávaným methioninem. Zvýšená pozornost mu začala být věnována teprve zásluhou lékařského výzkumu v poslední třetině dvacátého století[10]. Konečně v současné době je homocystein oceňován jako důležitý diagnostický indikátor především cévních onemocnění[11]. V odborné literatuře mu bylo věnováno již přes tisíc původních prací a díky svému obecnému významu našel v západních zemích cestu i do veřejných sdělovacích prostředků.

V našich lékařských kruzích se studiem homocysteinu ve vztahu k lékařské diagnostice zabývá již několik klinických laboratoří (viz např.[12]); v květnu 1997 a 1999 uspořádal profesor MUDr. J. Hyánek, náš přední odborník v tomto oboru, v Praze v nemocnici Na Homolce hojně navštívená pracovní sympozia s mezinárodní účastí na téma „Mírná hyperhomocysteinemie".

Koncem dvacátého století se tak stává významným přínosem lékařů a klinických biochemiků skutečnost, že prostřednictvím metabolického mezičlánku - homocysteinu - výrazně vstupuje do povědomí odborných pracovníků i laické veřejnosti důležitost poznávání vzájemné provázanosti jednotlivých biochemických cyklů, na které spočívá normální běh životních funkcí.



(2)

2. Homocystein v lékařství

Lékaři znali homocystein a jeho thiolakton nejprve jako léčivo při otravách, při jaterních onemocněních a v geriatrii, kde jeho vlivem, podobně jako působením jiných -SH látek, dochází k pozitivnímu ovlivnění důležitých enzymatických systémů. Postupem času však ovládl pozornost lékařů homocystein produkovaný metabolickými reakcemi v lidském organismu.

V šedesátých letech byla pozorována a popsána dědičná choroba, nazvaná homocystinurie[13]. U pacientů postižených touto chorobou dochází k nadměrnému hromadění methioninu a homocysteinu v tělních tekutinách (v krvi a v moči) důsledkem poruchy enzymu cystathionin syntasy, který převádí homocystein na cystathionin podle svrchu uvedené reakce (2). Vážné příznaky homocystinurie zahrnují zpomalený duševní vývoj, poruchy tvorby kostí a kardiovaskulární onemocnění, které je nakonec příčinou předčasného ukončení života pacientů ve věku do 20 až 30 let. Tento poslední poznatek upozornil lékaře na možnou souvislost zvýšené hladiny homocysteinu v organismu se srdečními chorobami.

Zatím co u homocystinurie dosahuje koncentrace homocysteinu v tělních tekutinách relativně vysokých hodnot, u pacientů trpících kardiovaskulárními chorobami je hladina homocysteinu zvýšena jen mírně. Proto bylo možno provádět výzkum naznačeným směrem jen postupně s tím, jak pokračoval vývoj metod ke stanovení homocysteinu.

Nejprve pokusy se zvířaty, pak zkušenostmi s dobrovolníky z řad lékařského personálu a nakonec s nemocničními pacienty bylo konečně v devadesátých letech v různých zemích spolehlivě statisticky prokázáno, že onemocnění periferních, koronárních i mozkových cév u člověka je doprovázeno zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi[14,15]. Závažnost onemocnění je při tom v přímé spojitosti s výškou této hladiny. V takových případech se hovoří o hyperhomocysteinemii, u níž jsou podle koncentrace homocysteinu rozlišovány tři stupně[16]: zatímco zdraví jedinci mají v průměru okolo 10 μmolu homocysteinu v 1 litru krevní plazmy, jsou tyto hodnoty u mírné homocysteinemie v rozmezí 16 až 30 $\mu mol.l^{-1}$, u střední mezi 31 a 100 $\mu mol.l^{-1}$ a u těžké nad 100 $\mu mol.l^{-1}$. Homocystinurie patří do poslední skupiny. Podle původu je hyperhomocysteinemie buď dědičná, působená některou poruchou v enzymech metabolického systému, nebo získaná, vyvolaná nedostatkem vitaminu B_6, B_{12} a kyseliny listové v organismu. Při diagnóze na základě zvýšené hladiny homocysteinu je třeba účast obou možných faktorů důkladně zvážit[17]. U české populace bylo nalezeno 15 % případů genetických odchylek spojených s hyperhomocysteinemií.

Systematickým výzkumem bylo zjištěno, že u zdravé populace je hladina homocysteinu v krvi u mužů o něco vyšší než u žen, že u těhotných žen klesá, že s věkem obecně stoupá, a že u kuřáků je vyšší než u nekuřáků. Přitom zvýšení hladiny homocysteinu v krevní plazmě o pouhých 12 % proti normálu znamená trojnásobné zvýšení nebezpečí srdečního infarktu[11]. Vyšší hladina homocysteinu se vyskytuje i u pacientů s chronickým selháním ledvin[18], u žen trpících opakovanými potraty[19] nebo u matek dětí s vrozenou poruchou neurální trubice[19-20].

K léčení hyperhomocysteinemie předepisují lékaři[21] užívání kyseliny listové případně doplněné vitaminem B_6 (pyridoxinem), ve zvláštních případech i vitaminem B_{12} (kobalaminem). Pro zdravou životosprávu je doporučováno jíst stravu bohatou na tyto látky, t.j. především zeleninu, luštěniny, obiloviny, mléčné výrobky a ovoce. V některých zemích jsou základní potraviny při výrobě obohacovány kyselinou listovou.

Podle dosavadních poznatků[22] spočívají škodlivé účinky zvýšené koncentrace homocysteinu v krvi mezi jiným v produkování reaktivních radikálů reakcí s kyslíkem, ve zvyšování srážlivosti krve, v narušování redoxní rovnováhy v krvi a ve tkáních a v poškozování vnitřních stěn cév. Za aktivní formu homocysteinu je některými autory pokládán jeho thiolakton[23,24]. K usazování cholesterolu na stěnách krevního řečiště dochází podle současných představ teprve po primárním působení homocysteinu. Odborníci předpovídají, že během 5 let bude stanovení homocysteinu v krvi požadováno kardiology stejně často jako stanovení cholesterolu, kterého se v USA provádí 25 milionů za rok.

3. Analytické metody pro stanovení homocysteinu

3.1. Analytika homocysteinu obecně

Hlavní obtíží při hledání vhodné metody ke stanovení homocysteinu v biologickém materiálu je zkušenost, že ve většině případů je homocystein provázen nadbytkem jiných

aminokyselin nebo -SH látek, které mu jsou svým chováním blízké a tudíž s ním při většině analytických metod interferují. Dosud navržené a užívané metody v sobě proto zahrnují separaci homocysteinu od průvodních sloučenin.

Okolnost, že na rozdíl od cysteinu homocystein tvoří v kyselém prostředí cyklický thiolakton (7), který vykazuje charakteristickou absorpci v krátkovlnné ultrafialové oblasti spektra (230 nm), byla využita k návrhu jeho analytického stanovení[5]. Jiná navržená metoda spočívala na převedení homocysteinu na N-trifluoromethylester a jeho separaci plynovou chromatografií[25].

V polarografii a voltametrii se homocystein chová primárně velmi podobně jako cystein[26]. Reakce katalytického vylučování vodíku z roztoků solí kobaltu na visící rtuťové kapkové elektrodě dovoluje odlišit homocystein od ostatních thiolů[27].

Pro stanovení homocysteinu v moči byla vypracována citlivá metoda založená na kombinaci vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s iontovou výměnou, která dovoluje oddělit homocystein od cysteinu, s elektrochemickou detekcí pomocí visící rtuťové kapkové elektrody[28].

3.2. Stanovení homocysteinu v krvi

K diagnostickým účelům se při hyperhomocysteinemii nejčastěji určuje koncentrace celkového homocysteinu v krevní plazmě[29]. Homocystein se totiž v krvi vyskytuje jednak volný, jednak vázaný na nízkomolární -SH látky a na bílkoviny, a částečně též oxidovaný jako homocystin; při tom vzájemný poměr všech forem je proměnný. Proto musí být homocystein před stanovením uvolněn ze všech vazeb redukcí, což se děje přidáním redukčního činidla ke krevní plazmě. K tomu jsou užívány deriváty fosfinu {tri-*n*-butyl nebo nověji tris(2-karboxyl-ethyl) fosfin}, a také dithiotreitol nebo borohydrid sodný. Dalším krokem předcházejícím vlastní analýzu je deproteinace, prováděná za přidání EDTA kyselinami chloristou, trichloroctovou nebo sulfosalicylovou, následovaná centrifugací. Podle zvolené analytické metody musí pak vzorek být upraven ke vlastní analýze příslušnou „derivatizací". Při použití automatického analyzátoru aminokyselin[30] se derivatizace provádí ninhydrinem; výhodou této metody je proměření i ostatních aminokyselin zúčastněných v metabolismu homocysteinu, nevýhodou je časová náročnost - uvádí se 138 min. na jednu analýzu ve srovnání s méně než 20 min. u metod s HPLC. - Při nejrozšířenějším způsobu analýzy využívajícím HPLC s fluorescenční detekcí[31] se derivatizace vzorku provádí 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonátem amonným; jiní autoři[32] za stejným účelem derivatizují thioly monobromobimanem. - Působením ethylchloromravenčanem na aminokyseliny vznikají těkavé N(O,S)-etoxy-karbonylové ethylestery aminokyselin, které lze rozdělit plynovou chromatografií a stanovit hmotnostní spektrometrií[33]. - Udávané detekční limity těchto metod jsou nižší než 0,5 $\mu mol.l^{-1}$ a objem vzorku krevní plazmy dostatečný k získání reprodukovatelných výsledků je 150 µl.

Kombinace separace kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí pro stanovení homocysteinu v krevní plazmě byla poprvé použita v r. 1982 (cit.[34]). Začátkem roku 1998 přichází americká společnost Bioanalytical Systems (BAS) se soupravou ke stanovení totálního homocysteinu v krevní plazmě (Total Plasma Homocysteine Kit), založenou na kapalinové chromatografii s elektrochemickou detekcí pomocí platinové indikační elektrody[35].

3.3. Vyhlídky pro běžnou diagnostiku

Uvedené metody stanovení celkového homocysteinu v krvi jsou složité a náročné, vyžadující nákladné aparatury a drahé chemikalie; současná cena jednoho stanovení v USA je zatím mezi 45 a 120 dolary. Odborné časopisy však průběžně přinášejí práce navrhující postupné zjednodušování užívaných způsobů, protože zájmem lékařů je dosáhnout stavu, kdy sledování hladiny homocysteinu bude obecně přístupným rutinním testem. Tím bude umožněno u případů zjištěné hyperhomocysteinemie včas nasadit vhodnou léčbu a předejít tak dalšímu vývoji celé řady nebezpečných onemocnění.

4. Význam homocysteinu pro metabolismus buňky

Tato kapitola shrnuje dosavadní poznatky o hlavních biochemických mechanismech a drahách, jichž se zúčastňuje homocystein. V návaznosti na naše předchozí teoretické studie[36,37] diskutujeme i širší souvislosti, které by mohly upozornit na další možnosti diagnózy a terapie u pacientů s hyperhomocysteinemií.

4.1. Seznam zkratek

AC	adenosylcyklasa
AcCoA	acetylkoenzym A
AdoCbl	adenosylkobalamin
ADP	adenosim-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
cAMP	cyklický AMP
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ASP	aspartát
C.A.C.	cyklus citronové kyseliny
Cbl	kobalamin (vitamin B_{12})
CH_3Cbl	methylkobalamin
CH_3FH_2	methyldihydrofolát
CH3FH4	meťhyltetrahydrofolát
CoA	koenzym A
CTP	cytidin-5'-trifosfát
F	folát (listová kyselina, pteroylglutamát)
FAD	flavinadenindinukleotid
FH_4	tetrahydrofolát
FUM	fumarát
GABA	*gama*-aminobutyrát
GC	guanosylcyklasa
GDP	guanosin-5'-difosfát
$GLUNH_2$	glutamin
GMP	guanosin-5'-monofosfát
cGMP	cyklický GMP
GSH	glutathion
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HoCySA	adenosylhomocystein
HoCySH	homocystein
HoSer	homoserin
HYX	hypoxanthin
IMP	inosin-5'-monofosfát

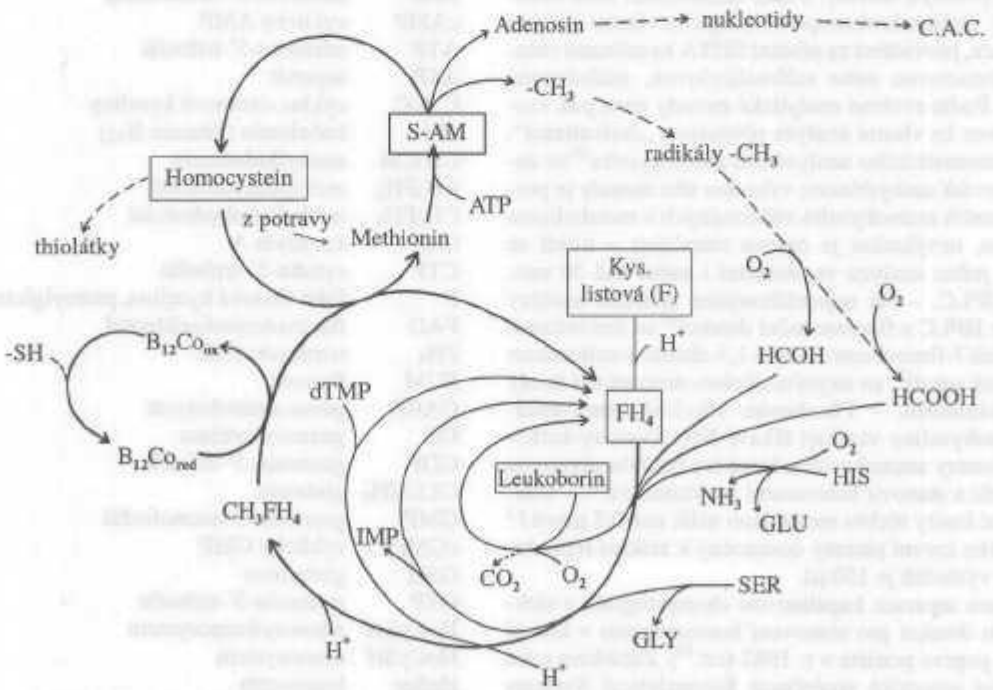
M.C.	močovinový cyklus
MTA	methylthioadenosin
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	NAD^+ fosfát
NADPH	redukovaná forma NADP
NH_2CP	karbamylfosfát
OAA	oxaloctová kyselina
OG	*alfa*-oxoglutarát
OHCbl	hydroxykobalamin
PDE	fosfodiesterasa
PEP	fosfoenolpyruvát
PÍ	anorganický fosfát
PP_i	pyrofosfát
PRPP	fosforibosyl-1 -pyrofosfát
PTH	pituitární hormon
PY	pyruvát
S-AM	*S*-adenosylmethionin
S-AH	*S*-adenosylhomocystein
SUCC	jantarová kyselina
SUCCoA	sukcinylkoenzym (jantarankoenzym) A
dTMP	deoxythymidin-5'-monofosfát
TRH	thyroidální hormon
dUMP	deoxyuridin-5' -monofosfát
UREA	močovina
UTP	uridin-5'-trifosfát

4.2. Vznik a recyklace homocysteinu, *S*-adenosylmethioninu, folátů a vitaminu B_{12}

V buňkách tkání se homocystein (HoCySH) uvolňuje z *S*--adenosylmethioninu (S-AM), který je přítomen v každé buňce. S-AM je univerzální zdroj methylové skupiny, který vzniká enzymovou reakcí methioninu s ATP. Vznik a způsob využití S-AM jsou specifické pro každou tkáň. Význam sledování změn hladiny HoCySH v séru si uvědomíme, když si představíme velké množství transmethylací, při kterých se HoCySH uvolňuje. Jeho přísun potravou je zanedbatelný. Nejvíce ho vzniká při tvorbě kreatinu ve svalech[38] (až 80 %), cholinu, resp. lecithinu, při stavbě buněčných membrán, při tvorbě karnitinu potřebného pro transport acylu vnitrobuněčnými membránami, a též katecholaminů nezbytných pro přenos nervových vzruchů. Pro proteosyntézu jsou významné methylace nukleových kyselin. Při každém předání -CH3 skupiny, potřebné pro syntézu výše zmíněných látek, se spolu s HoCySH uvolní také ekvivalentní množství adenosinu, čemuž překvapivě doposud nebyla věnována větší pozornost[37,39,40].

Pro život buňky má zásadní význam optimální tvorba S-AM, nezávislá na náhodném přísunu methioninu potravou[38]. Okamžité potřebné množství methioninu je zajišťováno recyklací HoCySH prostřednictvím komplikované reakce dvou vitaminů: B_{12} a folátu, za katalýzy methionin syntasy (obr. 1). K tomu účelu se musí nejprve v molekule vitaminu B_{12} zredukovat kobalt, t.j. musí přijmout elektron uvolněný v návazných chemických reakcích. Teprve v takto aktivovaném stavu převezme vitamin B_{12} od methyltetrahydrofolátu (CH_3FH_4) methylovou skupinu a přenese ji na HoCySH. Tím vznikne methionin, připravený pro reakci s ATP, aby vznikl S-AM. Methionin syntasa je prostřednictvím vitaminu B_{12} propojena s tokem elektronů, uvolňovaných při chemických reakcích probíhajících v buňce, zatímco účast folátů propojuje methionin syntasu s tokem protonů v dýchacím řetězci. Určujícími faktory v daném okamžiku pro vznik S-AM jsou tedy tok elektronů, tok protonů a uvolnění energie z ATP.

Kromě této „vitaminové" cesty, kterou je tvořen methionin, existuje v buňkách orgánů, které mají velkou spotřebu

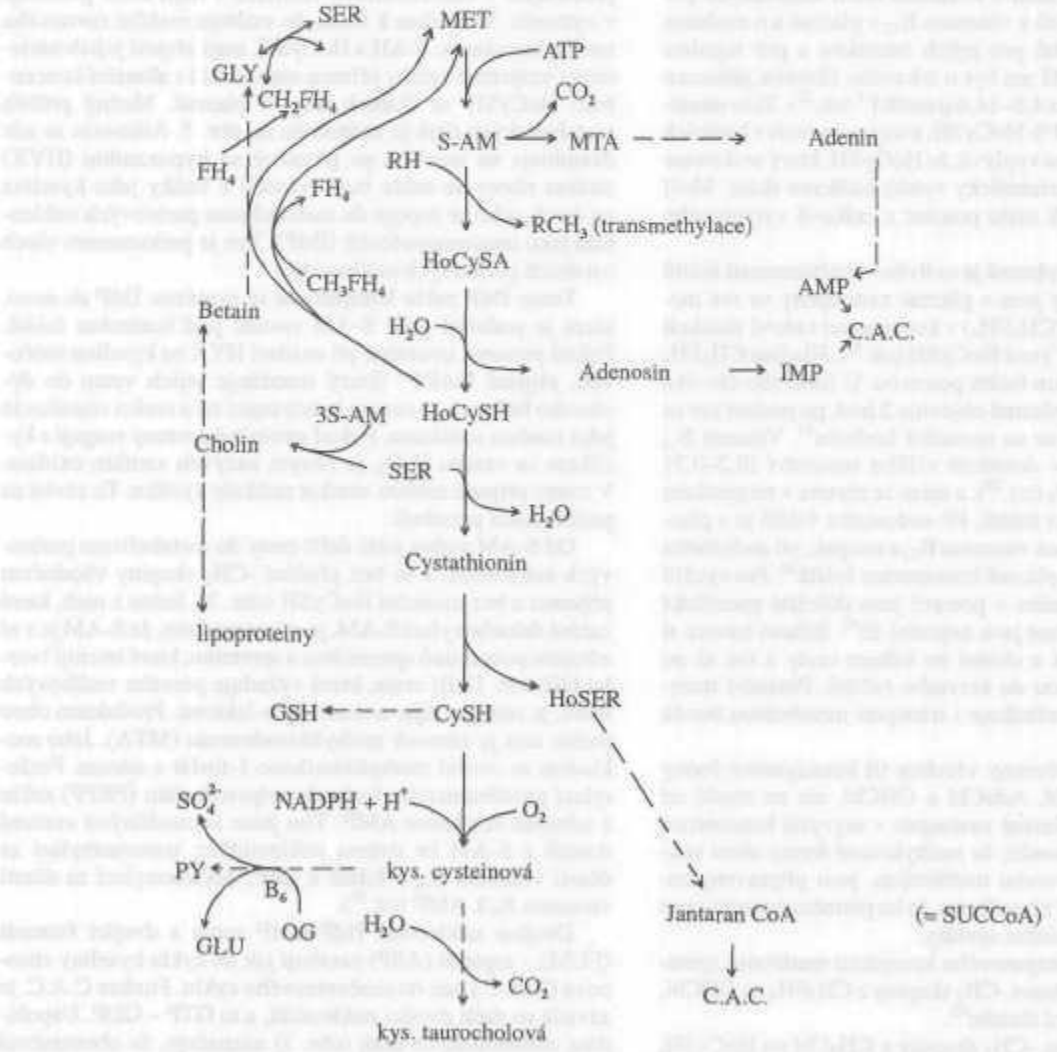


Obr. 1. Souvislost homocysteinu s Mátovým cyklem; k významu jednotlivých zkratek, které neodpovídají běžné chemické symbolice, viz odstavec 4. 1.

kyslíku (játra, ledviny, mozek), ještě další cesta, kterou se z HoCySH vytvoří methionin. Ta spočívá ve využití betainu, degradačního produktu cholinu, resp. lecithinu. Původně potřeboval cholin (lecithin) ke své syntéze tři molekuly methioninu v podobě S-AM. Z betainu se však vytvoří jen jedna molekula methioninu. Zbytek betainu je potom zdrojem jedné molekuly glycinu a dvou molekul jednouhlíkových zbytků (1C). Jejich návrat do metabolických drah je spojen s jejich oxidací za účasti dvou molekul tetrahydrofolátu (obr. 2).

Při tvorbě methioninu „vitaminovou" cestou je pro člověka důležité, že se současně s -CH3 skupinou uvolní také tetrahydrofolát (FH4). Ten může v mnoha případech působit detoxikačně tím, že váže volný formaldehyd a kyselinu mravenčí, vznikající při rozkladu látek oxidací jejich 1C zbytků. Podle koncentrace vodíkových iontů v daném prostředí umožní navázání 1C zbytku na tetrahydrofolát buď jeho oxidaci až na CO_2 (při vyšším pH), nebo redukci na -CH3 (při nižším pH). Při oxidaci 1C zbytku na CO_2 se tetrahydrofolát uvolní z vazby s ním bez potíží. Avšak po redukci 1C zbytku až na $-CH_3$ se tetrahydrofolát uvolní jen za pomoci vitaminu B_{12}, tj. tvorbou methioninu. Pokud z nějakého důvodu chybí buňkám vitamin B_{12}, nemohou tvořit dostatek methioninu pro vznik S-AM, a také jim chybí FH4 pro odstraňování volných radikálů vzniklých oxidací 1C zbytků. Redukce 1C zbytku nemusí proběhnout až do konečné methylové formy. Meziprodukty redukce (-CHO, =CH-, $-CH_2-$) se využijí buď pro syntézu IMP *de novo* nebo pro methylaci dUMP na dTMP (obr. 1). Tímto způsobem je metabolismus folátů vázán na syntézu nukleotidů *de novo.* Nukleotidy jsou jednak zdrojem genetického materiálu, jednak jsou využívány v enzymových dějích jako nosiče energie představované makroergickými fosfátovými vazbami v ATP, GTP, CTP a UTP.

Pokud nebyly vhodné podmínky pro návrat HoCySH zpět do metabolismu prostřednictvím syntézy methioninu, může jeho síra vstoupit do dalších důležitých metabolických cest. Po sloučení HoCySH se serinem na cystathionin (2) a po následném uvolnění cysteinu se zbylá část molekuly cystathioninu přemění postupně až na sukcinylCoA. I zde je potřebný vitamin B_{12} (obr. 2). V tomto případě je však ve formě adenosylkobalaminu (AdoCbl) na rozdíl od transmethylace, kde se uplatňuje ve formě methylkobalaminu (MetCbl) a hydroxokobalaminu (OHCbl).



Obr. 2. **Cyklus homocysteinu v metabolismu síry;** k významu jednotlivých zkratek, které neodpovídají běžné chemické symbolice, viz odstavec 4. 1.

Cystein uvolněný z cystathioninu se může uplatnit při proteosyntéze jako součást bílkovin. Dále může vytvářet s glycinem a glutamátem tripeptid glutathion (GSH), který je nepostradatelný při redox dějích katalyzovaných metaloproteiny, kdy se aktivuje molekulární kyslík. Z nebílkovinných látek, které obsahují síru, je právě GSH zastoupen v buňkách v největším množství.

Za účasti NADPH + H^+ může být cystein oxidován na kyselinu cysteinovou (cystein sulfinát) a dále až na sulfát prostřednictvím *alfa*-oxoglutarátu (OG) a transaminasy, katalyzované vitaminem B_6. Organický zbytek molekuly CySH se vrátí opět do metabolismu jako pyruvát spolu s glutamátem, vzniklým z OG. Cystein sulfinát se však může také po dekarboxylaci, oxidaci a reakci s kyselinou cholovou podílet jako taurocholát na trávení tuků. Záleží pravděpodobně na typu tkáně, jakým způsobem je cystein dále metabolizován (obr. 2).

4.3. Vztahy mezi homocysteinem, foláty a vitaminem B_{12} v krevní plazmě

Je třeba se také zmínit o kvantitativních vzájemných poměrech HoCySH, folátů a vitaminu B_{12} v plazmě a o možném významu těchto vztahů pro jejich interakce a pro regulaci metabolismu. HoCySH má být u zdravého člověka přítomen v plazmě v koncentraci 4,0-14,6 $\mu mol.l^{-1}$ (cit.[22]). Toto množství odpovídá jen 5-10 % HoCySH, který se vytvoří v buňkách během 24 hodin. Z toho vyplývá, že HoCySH, který se dostane do plazmy, je opět metabolicky využit buňkami tkání. Močí se vyloučí jen několik málo procent z celkově vytvořeného HoCySH (cit.[22]).

Obsah HoCySH v plazmě je ovlivňován přítomností folátů a vitaminu B_{12}. Foláty jsou v plazmě zastoupeny ve své methyltetrahydro formě (CH3FH4) v koncentraci řádově tisíckrát nižší (7,0–40 $nmol.l^{-1}$) než HoCySH (cit.[22]). Hladina CH3FH4 citlivě reaguje na přísun folátů potravou. U zdravého člověka se jejich maximum v plazmě objevuje 2 hod. po podání per os a během 24 hod. klesne na normální hodnotu[41]. Vitamin B_{12} je v plazmě řádově v desetkrát nižším množství (0,2-0,71 $nmol.l^{-1}$) než CH3FH4 (cit.[22]), a mění se zhruba v reciprokém poměru ke koncentraci folátů. Při nedostatku folátů je v plazmě zvýšená koncentrace vitaminu B_{12} a naopak, při nedostatku vitaminu B_{12} stoupá v plazmě koncentrace folátů[42]. Pro využití vitaminu B_{12} obsaženého v potravě jsou důležité specifické vazebné bílkoviny, které jsou nejméně tři[43]. Během trávení si vitamin B_{12} předávají a chrání ho během cesty z úst až po transport střevní stěnou do krevního řečiště. Poslední transportní bílkovina zprostředkuje i transport membránou buněk cílové tkáně.

V plazmě jsou přítomny všechny tři koenzymové formy vitaminu B_{12}: CH_3Cbl, AdoCbl a OHCbl, ale na rozdíl od ostatních tkání je v plazmě zastoupen v nejvyšší koncentraci CH_3Cbl (cit.[44]). Lze soudit, že methylované formy obou vitaminů, potřebné pro tvorbu methioninu, jsou připraveny zabránit úniku HoCySH z buněk tím, že ho přemění na methionin prostřednictvím methionin syntasy.

K aktivaci části enzymového komplexu methionin syntasy, která katalyzuje přenos -CH3 skupiny z CH_3FH_4 na OHCbl, je nutné silné redukční činidlo[45].

K dalšímu přenosu -CH_3 skupiny z CH_3Cbl na HoCySH, čímž vznikne methionin, stačí již jen malé množství energie. Tuto reakci katalyzuje jiný enzym v tomto multienzymovém komplexu[38].

Vznik methioninu provází jen nepatrná spotřeba kyslíku, proto není pravděpodobně doprovázen výrazným vznikem a zánikem volných radikálů kyslíku. Lze však očekávat vznik volných radikálů methylu při oxidaci methylových skupin degradovaných látek za nedostatku tetrahydrofolátu, zaviněného porušenou aktivitou methionin syntasy. Podle stabilní koncentrace HoCySH v plazmě lze soudit, že příslušná syntéza a degradace látek, které se podílejí na tvorbě methioninu, jsou dobře kontrolovány a koordinovány s dalšími metabolickými drahami prostřednictvím styčných poslů, mezi které nepochybně patří adenosin[46,47].

4.4. Homocystein a metabolismus purinových nukleotidů

Adenosin, který se při transmethylaci uvolnil spolu s HoCySH z adenosylmethioninu, může procházet buněčnými membránami, reagovat s jejich komponentami a ovlivňovat jejich polaritu. To znamená, že může svými reakcemi spojovat děje, probíhající v subcelulármch částicích s ději, které probíhají v cytosolu. Vzhledem k tomu, že existuje reakční rovnováha mezi adenosinem, S-AH a HoCySH, mají zřejmě jejich následující vzájemné vztahy přímou souvislost i s aktuální koncentrací HoCySH ve tkáních resp. v plazmě. Možný průběh metabolických dějů je znázorněn na obr. 3. Adenosin se zde deaminuje na inosin a po přeměně na hypoxanthin (HYX) ztrátou ribosy se může buď vyloučit z buňky jako kyselina močová, nebo se zapojit do metabolismu purinových nukleotidů jako inosinmonofosfát (IMP). Ten je prekursorem všech ostatních purinových nukleotidů.

Tento IMP může kompetovat se syntézou IMP *de novo,* která je podobně jako S-AM rovněž pod kontrolou folátů. Pokud protony, uvolněné při oxidaci HYX na kyselinu močovou, přijímá $NADP^+$ (který umožňuje jejich vstup do dýchacího řetězce), je enzym katalyzující tuto reakci označován jako xanthin reduktasa. Pokud uvolněné protony reagují s kyslíkem za vzniku H_2O_2, je enzym nazýván xanthin oxidasa. V tomto případě mohou vznikat radikály kyslíku. To závisí na podmínkách prostředí.

Od S-AM vedou ještě další cesty do metabolismu purinových nukleotidů, a to bez předání -CH_3 skupiny vhodnému příjemci a bez uvolnění HoCySH (obr. 2). Jedna z nich, která začíná dekarboxylací S-AM, je významná tím, že S-AM je v ní zdrojem polyaminů spermidinu a sperminu, které iniciují tvorbu bílkovin. Další cesta, která vyžaduje převahu vodíkových iontů, je zdrojem *alfa*-aminobutyro-laktonu. Produktem obou těchto cest je zároveň methylthioadenosin (MTA). Jeho rozkladem se uvolní methylthioriboso-1-fosfát a adenin. Fosforylací prostřednictvím fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) může z adeninu vzniknout AMP. Tím jsme se rozdílnými cestami dostali z S-AM ke dvěma nukleotidům: transmethylaci za účasti vitaminu B_{12} a folátů k IMP, dekarboxylací za účasti vitaminu B_6 k AMP (cit.[36]).

Dvojice nukleotidů IMP-AMP spolu s dvojicí fumarát (FUM) - aspartát (ASP) zasahují jak do cyklu kyseliny citronové (C.A.C.), tak do močovinového cyklu. Funkce C.A.C. je závislá na další dvojici nukleotidů, a to GTP - GDP. Uspořádání metabolických drah (obr. 3) naznačuje, že obousměrná přeměna GDP na GTP, se kterou je spojována změna průchod-

nosti iontových kanálů buněčné membrány[48], souvisí pravděpodobně s hlubokými změnami v metabolismu celé buňky.

Defosforylací AMP (člena prvé dvojice nukleotidů), který je produktem mnoha enzymových reakcí, vzniká adenosin. Setkali jsme se s ním také po rozpadu S-AM po transmethylaci, kdy se uvolnil spolu s HoCySH, který je zdrojem cysteinu. Adenosin a cystein patří mezi iniciátory změn propustnosti membrány, která je, mezi jiným, podmíněna změnou elektrochemického potenciálu. Adenosin podporuje polarizaci buněčné membrány a tím útlum nervového vzruchu, relaxaci svalových buněk[46,49] a působí proti srážení krve[47]. Cystein působí opačně. Adenosin ovlivňuje metabolismus síry tím, že tlumí využití S-AM pro transmethylaci. Složitost vztahů je zřejmá z toho, že následný vzestup koncentrace S-AM podporuje tvorbu cystathioninu ze serinu a HoCySH. S-AM tím brání opakovanému využití HoCySH pro tvorbu methioninu a podporuje tvorbu cysteinu a jeho vstup do metabolických drah (obr. 1). Inhibiční účinky na transmethylaci mají i další její produkty: HoCySH i jeho prekursor *S*-adenosylhomocystein (S-AH)[49]. Pokud je transmethylace blokována, může být S-AM využíván již zmíněnými cestami vedoucími k MTA. Síra obsažená v S-AM v tomto případě vstupuje do metabolismu jako methanthiol (obr. 2).

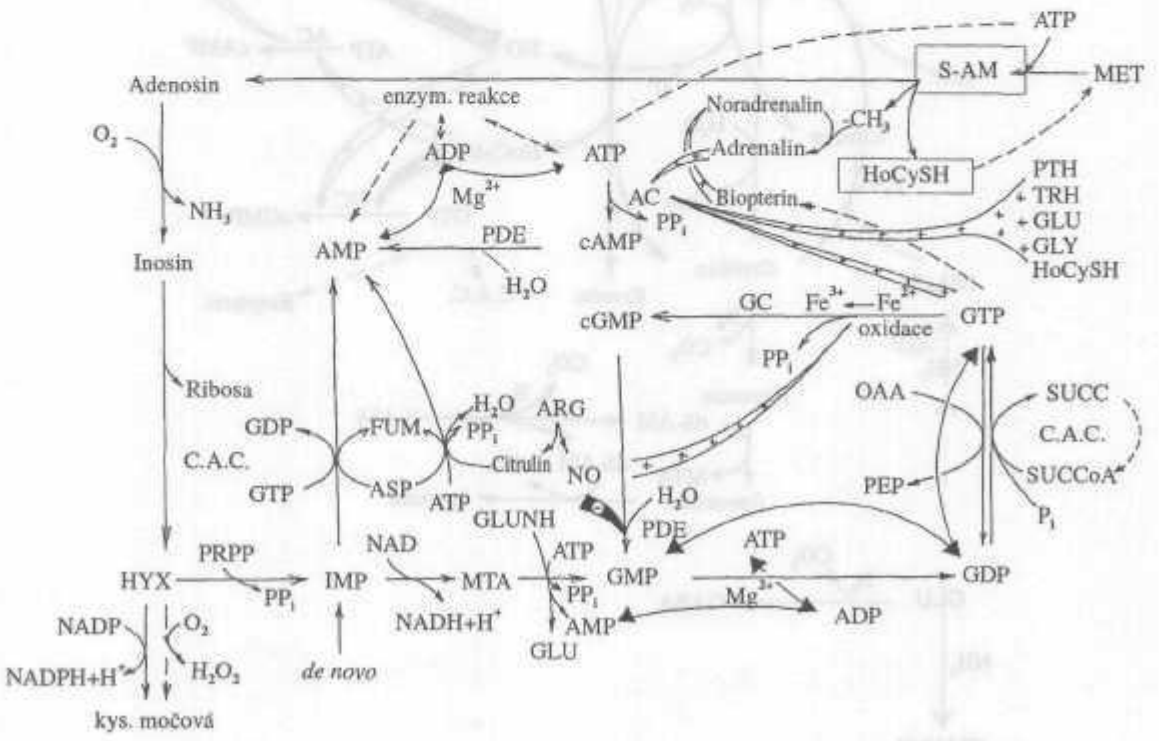
Je možné, že v těchto metabolických pochodech má důležité místo i tvorba a způsob využití serinu[38]. Tato aminokyselina může být využita: 7) pro tvorbu glycinu za účasti FH4 (a to jak přímo, tak i cestou, která zahrnuje syntézu a degradaci fosfolipidů. 1C zbytek použitý pro syntézu methioninu vitaminovou cestou, pochází z velké části právě ze serinu[50]); 2) pro tvorbu cystathioninu za účasti HoCySH. (Vedle cysteinu vzniklý homoserin (rovnice 2) je dále metabolizován za účasti AdoCbl (obr. 2)). Při vyrovnávání potřeby serinu pro různé metabolické pochody mohou hrát důležitou úlohu transaminasy, katalyzované vitaminem B_6 (cit.[37]).

Z uvedeného lze soudit, že excitace neuronů a konstrikce svalových buněk, spojené s depolarizací buněčné membrány, jsou doprovázeny změnami v metabolické cestě síry, methylové skupiny i adenosinu obsaženého v S-AM. Klinická zkušenost naznačuje, jak je důležitá cesta vedoucí od adenosinu k IMP a následně k dalším nukleotidům (obr. 3). V případě, kdy u pacienta dojde ke ztrátě aktivity adenosin deaminasy, následuje porucha proteosyntézy, která posléze vede k imunodeficienci.

IMP vzniklý *de novo* nebo recyklací může nejméně dvěma způsoby[36,37] ovlivnit průběh C.A.C. ale může zasáhnout i do močovinového cyklu. Syntéza IMP *de novo* za účasti folátů, která je energeticky velmi náročná a uplatní se pravděpodobně jen v případě, kdy je vyčerpán zdroj recyklace nukleotidů a tam, kde se tvoří nové buňky tkání.

4.5. Vztah homocysteinu k oxidu dusnatému (NO) v močovinovém cyklu

Vzrůst koncentrace HoCySH v plazmě je spojován, vedle jiných metabolických poruch, také s inhibicí guanosylcyklasy (GC), která přeměňuje GTP na cyklický GMP (cGMP) (obr. 3, 4). Aktivitu tohoto enzymu, který je hemoprotein, stimuluje

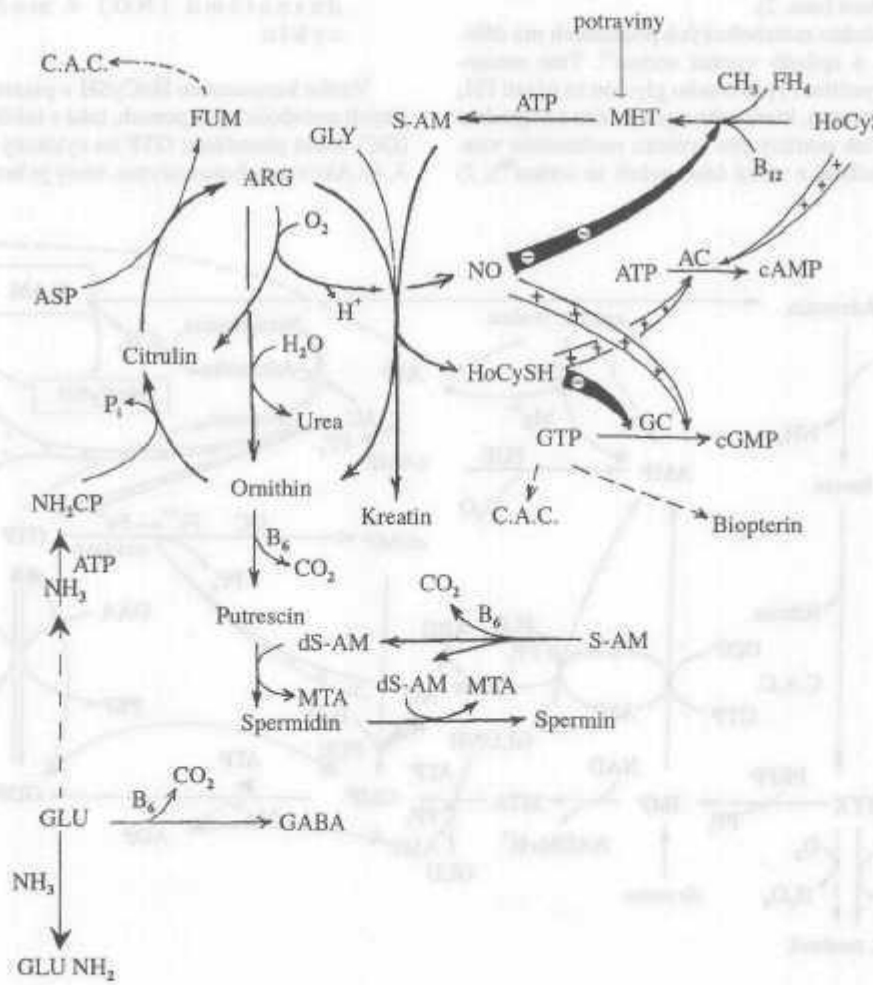


Obr. 3. **Účast homocysteinu na metabolickém cyklu purinových nukleotidů;** k významu jednotlivých zkratek, které neodpovídají běžné chemické symbolice, viz odstavec 4. 1. Černá směrovka (-) označuje inhibici dané reakce, bílá směrovka (+) její stimulaci

oxid dusnatý (NO). cGMP aktivuje otevírání membránového kanálu pro ionty vápníku a ovlivňuje tím elektrický potenciální rozdíl na membráně. Ionty Ca^{2+} a Na^{+} opouštějí vlivem NO buňku a K^{+} vchází dovnitř. NO brání též přeměně cGMP na GMP inhibicí enzymu fosfodiesterasy (PDE) (cit.[56]). Z toho vyplývá, že v obou případech se NO podílí na vzestupu koncetrace cGMP. Tímto způsobem by NO vyvolával prostřednictvím cGMP polarizaci membrán, která je v nervové tkáni spojena s útlumem nervového vzruchu. Účinek cGMP propustnost membrány pro ionty Ca^{2+} je opačný než účinek cyklického AMP (cAMP), jehož vznik z ATP katalyzuje adenylcyklasa (AC). NO vzniká z argininu v močovinovém cyklu a přes svoji značnou labilitu je důležitý pro buněčnou komunikaci. Před interakcí s další molekulou kyslíku nebo s kovem je pravděpodobně chráněn vazbou na albumin, a to na síru jeho cysteinu. Byla vyslovena domněnka, že plazmatický albumin působí jako reservoár NO, protože existuje rovnováha mezi NO-*S*-albuminem, NO a cysteinem. Předpokládá se, že NO-*S*-cystein projde membránou, a NO v buňce ovlivní aktivitu enzymů (např. metaloproteinů)[51].

Vzhledem k tomu, že tvorba NO je součástí normálních fyziologických pochodů[52], je pravděpodobné, že NO se svým zásahem do redox systémů podílí na udržení jejich rovnováhy. Ze známého účinku N_2O používaného při anestezi na methionin syntasu lze soudit, že asi také NO bude analogicky působit na ni i na jiné metaloproteiny, včetně GC. Účinek oxidů dusíku na methionin syntasu by však měl být odlišný od jejich účinku na GC. Zatím co oxidace železa v molekule GC enzym aktivuje, oxidace kobaltu v molekule vitaminu B_{12} methionin syntasu inhibuje[38].

Vazba NO na cystein, ale i na HoCySH a jiné thiolátky, může ovlivňovat jejich využití v enzymových dějích, ve kterých se uplatňují buď jako substrát nebo jako redukční činidlo. V tomto smyslu by vazba NO na HoCySH mohla zabraňovat jeho opakovanému využití pro syntézu methioninu. Bránila by i redukci 1C zbytku (vázaného na folát) na -CH3, která je rovněž stimulována přítomností -SH látek. Při syntéze methioninu z HoCySH opouští reakci FH_4 s tím, že se opět vrátí (po splnění specifických úkolů v buněčném metabolismu) s navázaným 1C zbytkem zredukovaným na -CH3. Vitamin B_{12} má možnost se při syntéze methioninu plně regenerovat (obr. 1). Účinkem N_2O tuto možnost regenerace oba vitaminy ztrácejí.



Obr. 4. **Souvislost homocysteinu s močovinovým cyklem;** k významu jednotlivých zkratek, které neodpovídají běžné chemické symbolice, viz odstavec 4. 1. Černá směrovka (-) označuje inhibici dané reakce, bílá směrovka (+) její stimulaci; dS-AM = dekarboxy S-AM

V případě, že by NO bránil recyklaci HoCySH, potom by pro tvorbu S-AM mohl být využitelný jen methionin z exogenních zdrojů.

Neuropatie, vzniklé následkem vdechování N_2O užívaného k anestezi byly skutečně léčitelné methioninem. Methionin však neléčil anemii, která u člověka provází neuropatie vyvolané N_2O. Ta byla léčitelná foláty, jejichž oxidované formy byly nevratně vyplaveny z organismu[53]. To by znamenalo, že neuropatie vznikly z nedostatku S-AM, zatím co anemie spíše z nedostatku folátů v jiných enzymových reakcích, než je syntéza methioninu. Neuropatie vzniklé působením N_2O mohou tedy souviset jednak s poruchou ve všech oblastech metabolismu, kam zasahují produkty rozpadu S-AM. Neschopnost recyklovat S-AM má za následek 1. nedostatek živin v buňce způsobený chybějícím karnitinem, 2. nedostatek fosfolipidů potřebných pro myelinizaci neuronů a 3. nedostatek adrenalinu (epinefrinu) pro aktivaci vzruchů. Změny v metabolismu purinových nukleotidů mohou postihnout i energetický metabolismus neuronů.

Za normálních metabolických podmínek by mohla koncentrace NO regulovat aktivaci methionin syntasy. Zvýšená koncentrace NO by měla (podobně jako vysoká koncentrace N_2O) vyvolat oxidaci a tím inaktivaci vitaminu B_{12} a také oxidaci již vzniklého CH3FH4 na CH3FH2, který není metabolicky využitelný. Tím by NO znemožnil syntézu methioninu, a následně i S-AM, recyklaci FH4 a vitaminu B_{12}. Inicioval by vyplavení CH_3FH_2 z organismu a zbrzdil by také reakce vyžadující účast -SH látek. NO aktivací GC (oxidací Fe(II) na Fe(III)?) zvyšuje tvorbu cGMP z GTP. GTP je však také prekursorem biopterinu, na kterém je závislá jak tvorba NO z argininu, tak i tvorba katecholaminů z tyrosinu. Ty stimulují, spolu s -SH látkami, tvorbu c AMP s opačným účinkem na Ca^{2+} iontový kanál než má cGMP (cit.[47]). To znamená, že zde lze očekávat zpětnovazebnou regulaci mezi tvorbou cGMP, biopterinu a cAMP. Nízká koncentrace NO by podporovala syntézu methioninu *de novo,* a tím i tvorbu S-AM reakce, které vyžadují jeho rozkladné produkty.

Nejvíce NO a HoCySH vzniká v močovinovém cyklu, ve kterém je arginin výchozím bodem tří důležitých metabolických cest (obr. 4). V prvé vzniká oxidací dusíku argininu NO a citrulin. V druhé cestě se arginin reakcí s glycinem stává prekursorem kreatinu. K jeho syntéze je potřebný ještě S-AM. Vyloučení kreatinu z organismu (v podobě kreatininu) představuje ireverzibilní ztrátu glycinu a 1C zbytku v podobě $-CH_3$. Po každé vyloučené molekule kreatinu však zůstává v organismu jedna molekula HoCySH. Třetí cestou se z argininu vytváří močovina, kterou se z organismu vylučuje jeden 1C zbytek a dvě aminoskupiny. Tuto cestu inhibuje kyselina listová[54], která tím v podstatě stimuluje první a druhou cestu. Z toho lze soudit, že tvorba HoCySH v močovinovém cyklu je pod vlivem folátů, a tudíž i vitaminu B_{12}, který s foláty kooperuje.

Ornithin, který je produktem jak cesty vedoucí od argininu ke kreatinu, tak cesty vedoucí od argininu k močovině, se podle podmínek prostředí a povahy tkáně přeměňuje reakcí s karbamylfosfátem na citrulin nebo po dekarboxylaci na putrescin. V prvém případě se tvorbou citrulinu uzavírá močovinový cyklus a zaměřuje se na vyloučení $-NH_2$ skupin z organismu. V druhém případě převládne dekarboxylace katalyzovaná vitaminem B_6 a vytvořením putrescinu se přeruší močovinový cyklus. Putrescin se po reakci s dekarboxylovaným S-ÁM stává zdrojem spermidinu a sperminu. Ze S-AM se nevytvoří HoCySH, ale MTA, o kterém jsme se již zmínili.

Nabízí se možnost úvahy, do jaké míry může právě rytmické využívám argininu (jako zdroje jednak HoCySH při tvorbě kreatinu, jednak NO při tvorbě citrulinu) hrát významnou roli při udržování redox rovnováh na buněčných membránách. Vzájemné propojení metabolických dějů, spojených s tvorbou cAMP a cGMP, které se významně podílejí na otevírání a zavírání Ca^{2+} iontového kanálu, je schematicky znázorněno na obr. 3.

Lze předpokládat, že s tvorbou kreatinu budou současně probíhat i další transmethylace vedoucí ke tvorbě adrenalinu a karnitinu, tj. látek, jejichž metabolismus je spojen s funkcí membrán. Schéma na obr. 3 by tomu nasvědčovalo.

5. Závěr

Zvýšená hladina HoCySH v krvi je jen špičkou ledovce. Upozorňuje na hluboké změny, které probíhají v celém metabolismu buněk poškozených tkání. Je postižen zejména jejich redox systém, který je závislý na regeneraci -SH skupin. Zvýšená koncentrace HoCySH tedy oznamuje, že je ohroženo buněčné dýchání. Nedílným průvodcem vznikajícího HoCySH je adenosin. Pokud se HoCySH hromadí a nerecykluje, chybí v metabolismu purinových nukleotidů i adekvátní množství adenosinu. Tím je ohrožena také plynulá tvorba energie. Ho -CySH, který se uvolnil z S-AM po transmethylaci, má tedy vztah k dýchání, představovanému thiolátkami, jejichž je Ho -CySH prekursorem, a k cyklu purinových nukleotidů (nosičů makroergických vazeb), do kterého vchází adenosin. Metabolickou cestu adenosinu lze sledovat až do C.A.C., zdroje buněčné energie v mitochondriích. Přeměna makroergických nosičů ATP a GTP na cAMP a cGMP je spojována se změnou prostupnosti membrán pro ionty, a tím i se změnou potenciálního rozdílu na buněčné membráně. Jak lze sledovat na obr. 4, vznik cAMP i cGMP ovlivňují HoCySH a NO, které oba mají svůj hlavní původ v močovinovém cyklu.

Uvedená studie naznačila, že tvorba a využití HoCySH podléhá velmi komplikovaným a vzájemně koordinovaným biochemickým vztahům mezi příslušníky různých metabolických okruhů. Hledat příčiny vzestupu koncentrace HoCySH v plazmě daného pacienta a správně interpretovat souvislosti s jeho chorobným vztahem není jednoduchá záležitost.

LITERATURA

1. Jocelyn P. C: *Biochemistry of theSH Group.* Academic Press, London 1972.
2. Baernstein H. D.: J. Biol. Chem. *106,* 451 (1934).
3. du Vigneaud V., Patterson W. I., Hunt M.: J. Biol. Chem. 726,217(1938).
4. Natusch D. F. S., Porter L. J.: J. Chem. Soc. (A), *1971,* 2527.
5. Racker E.: J. Biol. Chem. *217,* 867 (1955).
6. Butz L. W., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. *99,* 135 (1932).
7. Patterson W. I., du Vigneaud V.: J. Biol. Chem. *111,* 393 (1935).
8. du Vigneaud V., Chandler J. P., Moyer A. W.: J. Biol. Chem. *139,*917 (1941).

9. Kaplan M. M., Flavin M.: Biochem. Biophys. Acta *104,* 390 (1965).
10. McCully K. S.: *The Homocysteine Revolution.* Keats Publishing, New Canaan 1997.
11. Boushey C. J., Beresford S. A. A., Omenn G. S., Motulsky A. G.: J. Am. Med. Assoc. *274,* 1049 (1995).
12. Šimon J., Racek J., Rosolová H.: Cas. Lek. Cesk. 755, 263 (1996).
13. Hyánek J., Kafka J., Seemanová E.: Cesk. Pediat. *27,* 394 (1972).
14. Guba S. S., Fink L. M., Fonseca V.: Am. J. Clin. Pathol. 706, 709 (1996).
15. Blancher J., Montalescot G., Ankri A., Chadefaux-Vekemans B., Benzidia R., Grosgogeat Y., Kamoun P., Thomas D.: Arch. Mal. Coeur-Vaiss. *89,* 1241 (1996).
16. Malinow M. R.: J. Intern. Med. *236,* 603 (1994).
17. Donner M. G., Schwandt P., Richter W. O.: Fortschr. Med. 775, 24 (1997).
18. Soria C, Chadefaux B., Coude M., Gaillard O., Kamoun P.: Clin. Chem. *36,* 2137 (1990).
19. Steegers-Theunissen R. P. M., Boers G. H. J., Blom H. J., Trijbels J. M. F., Eskes T. K. A. B.: Lancet *339,* 1122 (1992).
20. Stejskal D.: Cesk. Gynekol. *59,* 34 (1994).
21. Franken D. G., Boers G. H. J., Blom H. J.: Arterioscler. Thromb. 74,465(1994).
22. Hyánek J., Hoffmann R.: Prakt. Flebol. *6,* 61 (1997).
23. Naruszewicz M., Mirkiewicz E., Olszewski A. J., McCully K. S.: Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. *4,* 70 (1994).
24. Jakubowski H.: J. Biol. Chem. *272,* 1935 (1997).
25. Greer M., Williams C. M.: Anal. Biochem. *19,* 40 (1967).
26. Bond A. M., Thomson S. B., Tucker D. J.: Anal. Chim. Acta *156,* 33 (1984).
27. Heyrovský M., Vavřečka S.: Bioelectrochem. Bioenerg. *48,* 43 (1999)
28. Thomson S. B., Tucker D. J.: J. Chromatogr. *382,* 247 (1986).
29. Ueland P. M., Refsum H., Stabler S. P., Malinow M. R., Andersson A., Allen R. H.: Clin. Chem. *39,* 1764(1993).
30. Andersson A., Brattstrom L., Isaksson A., Israelsson B., Hultberg B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. *49,* 445 (1989).
31. Araki A., Sako Y.: J. Chromatogr. *422,* 43 (1987).
32. Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Lilletvedt B., Ueland P. M.: Clin. Chem. *39,* 263 (1993).
33. Pietzsch J., Ulrich J., Markolf H.: Clin. Chem. *43,* 2001 (1997).
34. Smolin L. A., Benevenga N. J.: J. Nutr. *112,* 1264 (1982).
35. Solomon B. P., Duda C. T.: Curr. Sep. *17,* 3 (1998).
36. Přistoupilová K., Přistoupil T. I.: Chem. Listy *90,* 165 (1996).
37. Přistoupilová K., Přistoupil T. I.: *Role of Folates in Metabolic Pathways.* Academia, Praha 1997.
38. Scriver C, Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease, 11.* McGraw-Hill, London 1996.
39. Montero C, Smolenski R. T., Duley J. A., Simminds H. A.: Biochem. Pharmacol. *40,* 2617 (1990).
40. Niklasson F.: *Dissertation.* Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala 1983.
41. Corbeel L., van den Berghe G., Jacken J., van Tornout J., Eeckels R.: Eur. J. Pediatr. *143,* 284 (1985).
42. Stokstad E. L. R.: *Folic Acid.* National Academy of Sciences, Washington D. C. 1977.
43. Přistoupilová K.: Cas. Lek. Cesk. *124,* 353 (1985).
44. Matthews D. M.: *Vitamin B_{12}. Proc. III. Europ. Symp. on Vit. B_{12} and IF, Zürich, March 1979.*
45. Vitols E., Walker G., Huennekens F. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 377 (1964).
46. Handforth A., Treiman D. M.: Epilepsy Res. *18,* 29 (1994).
47. Läthje J.: Blut *59,* 367 (1989).
48. Rawn J. D.: *Traité de Biochemie.* De Boeck-Wemael, Bruxelles 1990.
49. Miller J. W., Nadeau M. R., Smith I, Smith D., Selhub J.: Biochem. J. *298,* 415 (1994).
50. Schalinske K. L., Steele R. D.: Arch. Biochem. Biophys. 277, 49 (1989).
51. Scharfstein J. S., Keaney J. F. Jr., Slivka A.: J. Clin. Invest. *94,* 1432 (1994).
52. Shaul P. W., North A. J., Wu L. C: J. Clin. Invest. *94,* 2231 (1994).
53. Lumb M., Perry J.: Am. J. Clin. Nutr. *34,* 2418 (1981).
54. Nikolic J., Bjelakovic G., Kocic G.: Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 707, 271 (1993).
55. Desole M. S., Kim W. R., Rabin R. A., Laychock S. G.: Neuropharmacology *33,* 193 (1994).
56. Kirstein M., Rivet-Bastide M., Hatem S., Bénardeau A.: J. Clin. Invest. *95,* 794 (1995).

K. Přistoupilová[a], T. I. Přistoupil", and M. Heyrovský[b] *("Na Hřebenkách 19, Prague 5, [b]J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Homocysteine - a Molecule Attracting Increasing Attention**

In the last 30 years, homocysteine has been the subject of medical and biochemical research as an indicator. Its concentration in body fluids indicates the hereditary disorder, homocystenuria, and arteriosclerosis and cardiovascular diseases in general. On the basis of improved methods of homocysteine determination in blood, different levels of homocysteinemia can now be distinguished indicating different kinds of diseases which require different medical treatment. In the newly outlined metabolic reaction schemes in this paper, homocysteine appears as an intermediate in several vitally important interconnected cycles. Under normal physiological conditions, its plasma concentration remains within standard limits, while its increase signals dysfunction of some of the essential pathways affecting membrane transport, redox and pH equilibria and energy production in the organism. In these concerted metabolic processes *S*-adenosylmethionine, folates and vitamins B_6 and B_{12} as well as NO play important roles.

SYNTETICKÉ VONNÉ ACHUŤOVÉ LÁTKY

LIBOR ČERVENÝ

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: libor.cerveny@vscht.cz

Došlo dne 19.III.1999

Klíčová slova: vonné látky, chuťové látky, parfemace, aromatizace

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizace látek vonných a chuťových
3. Výroba vonných a chuťových látek v České republice
4. Spolupráce Ustavu organické technologie VŠCHT Praha s průmyslem vonných a chuťových látek

1. Úvod

Zatímco v dřívějších dobách byly zdrojem vonných a chuťových látek výhradně přírodní materiály, je dnes rozvoj této oblasti nemyslitelný bez látek vyrobených synteticky. Při aplikacích jde vždy o pestré směsi často několika desítek látek a to ryze přírodního, ryze syntetického nebo kombinovaného původu. Velmi často je požadavek přírodního původu, který je běžný především u chuťových komplexů, pouze komerční záležitostí, neboť kvalita resp. čistota syntetických složek je mnohdy vyšší než složek přírodních. Jisté ovšem je, že bez syntetických látek se moderní průmysl látek vonných a chuťových neobejde. V našich zeměpisných šířkách je tento fakt podtržen ještě tím, že klimatické podmínky nejsou příliš vhodné pro zajišťování kvalitních přírodních surovinových zdrojů v potřebném množství.

Nelze pochybovat o tom, že v moderní lidské společnosti má průmysl látek vonných a chuťových své nezastupitelné místo. Spotřebitelé dostávají vonné látky ve formě parfémů, kolínských a toaletních vod, v kosmetických výrobcích, mýdlech, v pracích a čisticích prostředcích a v dalších, donedávna vůbec neparfémovaných technických výrobcích. Parfém se stal určitým reprezentativním prvkem, který hraje důležitou roli již při prvním setkání parfémovaného výrobku se zákazníkem. Přestože trendem poslední doby je vůbec přípravky přírodní tělové kosmetiky neparfémovat, u převážné většiny kosmetických, pracích a čisticích produktů se parfém významným způsobem podílí na dotvoření celkového příznivého vjemu výrobku. Mnoho kosmetických přípravků musí být parfémováno za účelem maskování nežádoucí vůně detergentů a s tím úzce související záruky jejich příjemnosti. Určitý zápach může být maskován za předpokladu, že překrývající vůně je dostatečně vydatná. Trikem maskování je udělat původní zápach báze součástí konečné vůně výrobku. Příkladem jsou detergenty, ve kterých „vůně" mastných kyselin a jejich derivátů jsou s úspěchem maskovány citrusovými nótami, protože alkoholy a aldehydy obsažené v citrusových silicích mají samy o sobě mastný charakter. Pro parfuméra je důležitým faktorem charakter nežádoucí vůně, kterou má jeho parfém překrýt, neboť podle něho musí vyvíjet kompozici - rychle prchající látky maskovat těkavým složkami, naopak přilnavé složky málo těkavými.

Spotřebitel se setkává se zbožím a vnímá jeho vůni na několika stupních. Například při nákupu pěny do koupele, otestuje zákazník pravděpodobně její vůni již v obchodě, dále při aplikaci v koupelně a nakonec po opláchnutí a osušení pokožky. Z toho je zřejmé, že jednotlivé vonné akordy parfému hrají svou roli v odlišných periodách použití. Například pro čisticí prostředky na nádobí platí, že vůně musí působit během umývání, ale po uschnutí by nádobí mělo zůstat absolutně čisté, bez vůně. Naproti tomu na aviváže je kladen požadavek provonění jak mokrého prádla, tak i prodlení vůně na prádle suchém. Tyto aspekty musí být brány v úvahu v samotném počátku vývoje parfému. Je samozřejmé, že při sestavování vhodné kompozice do určitého výrobku musí být parfumér obeznámen nejen s vonnými charakteristikami jednotlivých látek, ale s celou řadou jejich dalších vlastností.

Dalším specifikem vonných a chuťových látek je to, že je důležité, aby látka působila na smyslové orgány v optimální koncentraci. Existují látky, které jsou příjemné jen ve velmi nízké koncentraci a dokonce odporné v koncentraci vyšší. Existují též látky, jejichž vůňový charakter se s koncentrací významně mění.

Pokud se týká stability parfému ve výrobku, je jasné, že stejný vjemový pocit přesvědčuje zákazníka o stejné kvalitě výrobku. Vonná kompozice nesmí podléhat žádným nežádoucím změnám v charakteru, intenzitě a zabarvení nejen během doby, kdy je výrobek ještě v distribuční síti, ale i po celou dobu spotřební fáze. K určitým změnám může docházet a také dochází jen v tzv. době zrání, trvající asi dva týdny od aplikace vůně do výrobku, poté by se již vůňový vjem konečného produktu neměl měnit.

Kosmetické výrobky mohou být z hlediska funkce vůně rozděleny do dvou kategorií. První skupinu tvoří přípravky, ve kterých je vůně klíčovým faktorem, například deodoranty, pěny do koupele, aviváže nebo osvěžovače vzduchu. Vůně těchto přípravků podléhají neustálé inovaci a v posledních letech jsou odvozovány od typů luxusních parfémových značek. Do druhé skupiny výrobků mohou být zařazeny šampóny, kondicionéry, krémy a prací prášky, tedy výrobky, jejichž vůně není při nakupování považována za rozhodující. U těchto přípravků se používá spíše klasických typů tradičních vůní.

Každá nová vůně, pokud se nestane stálicí jako např. L'Air du Temps od Nina Ricci, ztratí časem na lesku a stane se neatraktivní, podobně jako je tomu ve světě módy. Tyto vůně mívají v době uvedení na trh obrovskou reklamní podporu, prodávají se po určitou dobu, pak následuje pokles jejich popularity a posléze konec výroby. Svět vůní je přizpůsobován zvyklostem té které země, pokud jde o zdůraznění těžších nebo

naopak lehkých akordů. Tak například parfém původně vyvinutý pro španělský trh, může být pro trh francouzský příliš těžký a tedy neatraktivní.

Jako lehčí, svěžejší typy přicházejí na trh bezalkoholové parfémy. Objevily se v létě roku 1997 a během půl roku stačily ovládnout asi 10 % evropského trhu. Vůně s nulovým obsahem alkoholu nabízejí, v době zdůrazňující požadavek zdravotní nezávadnosti a maximálně šetrné péče o pleť, odlišný způsob používání. Předností je, že mohou být aplikovány na celé tělo a mohou být kombinovány též s opalovacími přípravky.

Od vůní, které jsou příjemné a nezávadné, je už jen malý krok k takovým, které při použití vykazují blahodárné účinky. Tyto přípravky obsahují většinou kromě přírodních esencí ještě vitaminy, zvlhčující a zvláčňující činidla a podobně. Společnost Coty ohromila trh kolekcí vůní The Healing Garden s aromaterapeutickými účinky. Kolekce je rozdělena do čtyř skupin: zelená a levandulová pro relaxaci, tangerinová pro osvěžení a jasmínová pro senzualitu.

Obdobné úvahy, jako o parfémech a parfémovaných výrobcích lze vést i o ochucovadlech a ochucených výrobcích, snad jen s tím rozdílem, že v této oblasti bude nejspíše vždy dominovat příbuznost chuťového vjemu chuti známých klasických potravinářských výrobků s podstatně užším prostorem pro fantazii aromatizéra ve srovnání s prostorem parfuméra.

2. Charakterizace látek vonných a chuťových

Objektivizace čichových a chuťových vjemů zůstává vždy trochu problematická, snaha o jejich třídění, popis a predikci na základě znalosti struktury látek na druhou stranu zcela pochopitelná a žádoucí. Přestože je tomuto problému věnována v literatuře značná pozornost[1-8], neexistuje dosud žádná obecně přijímaná norma.

Poněkud jednoznačnější je základní klasifikace tzv. vonných kompozic a chuťových komplexů, neboť v tomto případě se jedná o senzorickou charakterizaci cíleně připravené směsi někdy i několika desítek látek, s cílem vyvolat příjemný vjem. Vzhledem k tomu, že jde o záměr autora kompozice dosáhnout jistého konečného efektu, je přiřazení obvykle jednodušší než popis senzorických vlastností chemického individua.

Vonášek a kol.[8] uvádějí následující hlavní typy vůní: aldehydické, animální, balzamické, bylinné, citrusové, cyklámen, dřevité, fialka, Fougére, gardénie, heliotrop, hloh, hrachor, hyacint, chypre, jasmín, jehličnaté, juchta, karafiát, kassie, konvalinka, kořenité, květinové, levandule, lilie, lípa, magnólie, mimóza, narcis, neroli, orchidej, ovocné, peprnomátové, růže, seno, šeřík, ševrefej, tabák, tuberóza, vůně mořské vody, ylang-ylang, zelené.

Analogické dělení chuťových aromat[8] je odvozeno od názvů různých poživatin, nápojů, koření a pod. Jsou to: ananas, banán, borůvka, brandy, broskev, citrusy, čaj, džin, grenadina, hořká aromata, houby, hruška, chléb a pečivo, jablko, jahoda, kakao a čokoláda, karamel, káva, kola, koření (anýz a badyán, bazalka, bobkový list, estragon, fenykl, hořčice, hřebíček, chmel, jalovec, kardamom, kmín, kopr, koriandr, křen, kurkuma, libeček, majoránka, máty, muškátový květ, muškátový ořech, nové koření, paprika, pepř, cayenský pepř, pískavice, rozmarýna, saturejka, skořice, šafrán, šalvěj, tymián, vanilka, yzop, zázvor), malina, mango, maso a masné výrobky, kouřová aromata, med, meloun, meruňka, mléčné výrobky, nugát, ořechy (burský, kokos, lískový, mandle, pistácie, para, vlašský), passion fruit, rum, rybíz, švestka, tabák, tutti-frutti, vanilka, víno, višně, whisky, zelenina, žitná.

Parfémové kompozice a chuťová aromata jsou vyráběny z kvalitních přírodních materiálů (silic, destilátů, extraktů) a dále z tzv. přírodněidentických látek, tj. látek běžně se vyskytujících v přírodě, vyráběných ale z ekonomických důvodů synteticky. Vedle toho se pak používají i látky, které se v přírodě nevyskytují (a to i do chuťových aromat) a jsou vyrobeny synteticky. Použití těchto látek podléhá samozřejmě přísné schvalovací proceduře.

Syntetické vonné a chuťové látky lze nalézt téměř ve všech hlavních skupinách organických sloučenin, ať jsou to uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty - především estery a laktony, heterocyklické sloučeniny a další. Některé z těchto látek se používají ve velkém počtu různých kompozic a to i v relativně vysokém množství a jejich celosvětová produkce se pohybuje v mnoha tisících tun za rok (v důsledku ovšem širšího využití i mimo oblast látek vonných a chuťových), jiné, především speciality jednotlivých firem, postačují v kilogramových množstvích.

Nejrozsáhlejším souborným přehledem vonných a chuťových látek je zřejmě Arctanderova monografie[9]. Tento profesor z Rutgers State University of New Jersey se svými žáky shromáždil údaje o více než 3 tisících látkách významných pro tuto oblast. Jsou mezi nimi nejrůznější názvy, pod kterými se látka vyskytuje, strukturní vzorec, fyzikálně-chemické konstanty, vůňová a chuťová charakteristika, nejčastější použití příp. norma a bez odkazů na literaturu i nejběžnější výrobní postup. Tento vynikající přehled s dobře udělaným rejstříkem by neměl chybět na žádném pracovišti, zabývajícím se danou problematikou. Z naší literatury nelze neupozornit na knižní publikaci Trepkové, Novotného a Vonáška[8], zajímavá jei historicky laděná kniha našich dřívějších špiček v oblasti parfemace a aromatizace[10].

Senzorická analýza se dnes řídí v zásadě pěti ISO normami, zajišťujícími standardizaci vyhodnocovacích postupů[8-12]. Její role je nezastupitelná, neboť při posuzování kvality výrobku je slovo parfuméra či aromatizéra rozhodující a je nadřazeno veškerým analytickým kontrolám. Této výsady řada firem obratně zneužívá.

Stát se uznávaným parfumérem či aromatizérem není snadné. Základní podmínkou jsou vrozené senzorické schopnosti. Srovnáme-li schopnosti vytvářet nové parfémové kompozice a aromatické komplexy s uměleckou tvorbou, pak zásadní rozdíl je v tom, že zatímco umělecký talent se v průběhu lidského života obvykle vždy projeví, je odhalení tvořivých schopností v senzorické oblasti víceméně náhodné a u většiny populace takto nadané k němu vůbec nedojde. Uvedená základní podmínka není samozřejmě dostačující. Pro dosažení profesionálního mistrovství je zapotřebí dalšího rozvíjení přirozeného nadání tréninkem, vzděláváním, získáváním zkušeností atd.

Běžně využívaných látek pro sestavování vonných kompozic a chuťových komplexů je kolem tisíce. Je logické, že i při sortimentu 100 až 200 používaných látek musí být značná část zajišťována nákupem od jiných firem. Výroba některých šířeji využívaných látek se dostává na velkoprodukční úroveň a je zajišťována velkými průmyslovými koncerny. Většina výrob zůstává ale přesto na úrovni střednětonážní až maloto-

nážní. Objem výroby některých specialit dokonce často nepřevyšuje laboratorní rámec.

3. Výroba vonných a chuťových látek v České republice

Počátky průmyslové výroby vonných a chuťových látek v našich zemích lze hledat na konci minulého století, tedy před více než sto lety. Odehrávala se zpočátku v řadě drobných firem a provozoven, z nichž lze jmenovat např. firmy Oehme--Baier, Odol, Bratři Janouškové, Strnad, Židlický, Pavlata, Kluge-Poritzsch, Steyer-Friedlender, Horowitz-Witrovský a další.

V květnu roku 1898 založila německá firma Schimmel & Co. v Podmoklech (dnešní čtvrť Děčína) svůj pobočný závod na výrobu éterických olejů a chuťových látek. Hlavní náplní tohoto specializovaného závodu byla výroba trestí, aromat, barev a sirupů pro likéry, lihoviny, cukrovinky, limonády a ovocné šťávy. Postupně firma zavedla výrobu jednotlivých chuťových a vonných látek pro voňavkářský, kosmetický a farmaceutický průmysl a stala se ve třicátých letech dominujícím dodavatelem těchto produktů pro příslušná odvětví průmyslu v Československu. Po znárodnění v roce 1946 byly do závodu přemístěny výroby z menších provozoven na severu Čech, současně byly také znárodněny firmy v Praze a Brně, kde byl založen národní podnik Aroma, sdružující tyto znárodněné firmy. Závody se postupně specializují a ředitelství Aromy po odštěpení závodu v Brně v roce 1951 (Fruta), přechází do Prahy, kde působí dodnes. Výroba chuťových látek se koncentruje především v závodě Vysočany (dnešní Aroco s.r.o.) a závod Děčín se specializuje především na výrobu vonných látek a parfémových kompozic. Zde byla vypracována a postupně realizována výroba více než třiceti látek, z nichž nejvýznamnější byla výroba benzyl-acetátu, který byl výhodným vývozním artiklem.

Závod v Děčíně (jeden ze závodů dnešní a. s. Aroma) vyrábí vonné látky, kompozice pro mýdla, detergenty a zubní pasty, kompozice pro veškerou parfemaci kosmetických přípravků a přípravků bytové chemie. Zároveň závod prodává 30 druhů silic, kafr a mentol.

Druhým závodem a. s. Aroma je závod v Židovicích u Roudnice, mající výborné predispozice pro další rozvoj syntetické chemie. Základ tohoto rozvoje byl položen výstavbou univerzální výrobní jednotky, vybavené míchanými reaktory, vysokotlakými hydrogenačními autoklávy, odstředivkou a tlakovým filtrem a rektifikačními kolonami s účinností 15 TP, umožňujícími pracovat za vysokého vakua. K jednotce patří i vodíková stanice, jejíž kapacita byla v loňském roce významně rozšířena a stanice kapalného dusíku. Vybudování této jednotky v polovině minulého desetiletí, na kterém se významně podíleli i pracovníci Ústavu organické technologie VŠCHT v Praze, tak dalo kvalitativně jiný rozměr dosavadní výrobě v závodech Aromy resp. Astridu, s nímž byla Aroma v období let 1979 až do roku 1991 sloučena. K tradiční extrakci koření, výrobě rumového etheru a konzervačního prostředku sorbanu draselného přibyl moderní a náročný výrobní proces na špičkové technické úrovni. V dosavadním průběhu existence výrobní jednotky se vícekrát měnil sortiment zde vyráběných látek, tyto látky ale vždy představovaly nejatraktivnější a nejlukrativnější produkty syntetické chemie v Aromě.

Poté, co se společnost Aroco stala většinovým vlastníkem a. s. Aroma (1996), byla vytvořena výrobní skupina a v rámci ní se určitým způsobem přeskupila výroba. Závod Aroco ve Vysočanech je orientován především na sladká aromata, trestí, tukové a ovocné pasty, sirupy, báze do nealkoholických nápojů a potravinářské barvy, zatímco závod Aroma Židovice vyrábí hlavně slaná aromata, prášková aromata, citropastu a nálevy, vedle syntetických vonných látek. Pokud jde o syntetickou výrobu v Aroco, je s výjimkou kampaňovité výroby citronellyl-seneciátu, amyl-acetátu, triethyl-citrátu, oktaacetylsacharosy a ethyl-butyrátu (máslového etheru) orientována na v podstatě laboratorní výrobu některých složek, zajišťovanou vlastními laboratořemi nebo smluvní spoluprací s ÚOT.

Vývoj se v oblasti látek vonných a chuťových ubírá dvěma směry. Jde především o modernizaci technologií dnes již klasických látek pro parfémové kompozice a chuťové komplexy. Samozřejmou snahou výzkumných pracovišť je ovšem odhalovat senzorické účinky dalších látek, u nichž nebyly dosud popsány například proto, že byly znehodnoceny minoritními příměsemi nečistot, nebo proto, že si jich prostě nikdo nevšiml, stejně jako bádat v oblasti látek dosud neznámých. Pokud se něco takového podaří, je prioritním zájmem uplatnění dané látky ve výrobku, takže k jejímu „odhalení" dochází až se značným zpožděním.

Z výroby vonných a chuťových látek se stalo významné průmyslové odvětví, v němž hraje rozhodující roli několik nadnárodních společností, ovšem i malé firmy, mající mnohaletou tradici, mohou nalézt své místo na slunci, dokáží-li uplatnit svoje specifické výhody.

4. Spolupráce Ústavu organické technologie VŠCHT Praha s průmyslem vonných a chuťových látek

Spolupráce Ústavu (tehdy katedry) organické technologie VŠCHT Praha s podnikem Aroma začala v roce 1970 řešením v tu dobu aktuálních problémů s čistotou benzyl-acetátu. Zpočátku se odehrávala v rovině odborné pomoci, až postupně přerostla v systematickou vědecko-výzkumnou činnost, zaměřenou jak do oblasti základního výzkumu, tak postupně i do oblasti tzv. tvůrčí realizační činnosti, vrcholící zaváděním nových procesů výroby tradičních i zcela nových vonných látek. Vznikaly původní vědecké práce, kterých je dnes více než osm desítek a spolu asi s padesáti autorskými osvědčeními zachycují dosažené výsledky. Průlom do výrobního sortimentu přinesla již zmíněná výstavba hydrogenační jednotky. Tento fakt nebyl náhodný, ale vyplýval z vědeckého zaměření ÚOT a z faktu skutečně velmi široké využitelnosti hydrogenačních procesů[11] v oblasti syntézy vonných a chuťových látek. Jako první látka začal být vyráběn tzv. hydroskořicový alkohol, 3-fenylpropan-1-ol (cit.[12-16]). Brzy našel široké využití v parfémových kompozicích a stal se i výhodným exportním artiklem. Jeho výroba je dvoustupňová *(1, 2)*.

Analogický postup byl zvolen[12,13,15] pro syntézu 4-fenyl--4-methyl-1,3-dioxanu, jehož hydrogenolytickým štěpením byl vyráběn 3-fenylbutan-1-ol *(3, 4)*.

Hydrogenací aromatických jader v obou alkoholech[17] byly vyráběny 3-cyklohexylpropan-1-ol a 3-cyklohexylbutan-1-ol (5,6).

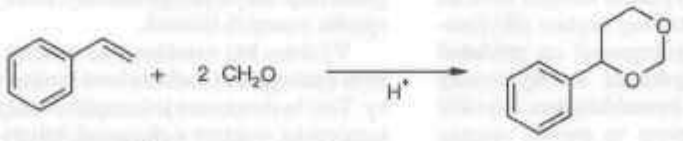
Všechny čtyři alkoholy sloužily k přípravě řady esterů[18-21],

průmyslového využití se ale dostalo pouze esterům 3-fenylpropan-1-olu a 3-fenylbutan-1-olu s kyselinou octovou. V laboratorním měřítku byla propracována rovněž dehydrogenace všech uvedených alkoholů na příslušné vonné aldehydy[22], které byly následně použity pro přípravu zajímavých acetalů[22]. Vonné vlastnosti řady z nich nebyly dříve popsány, stejně jako vonné vlastnosti etherů[15], odvozených od 3-fenylpropan-1-olu.

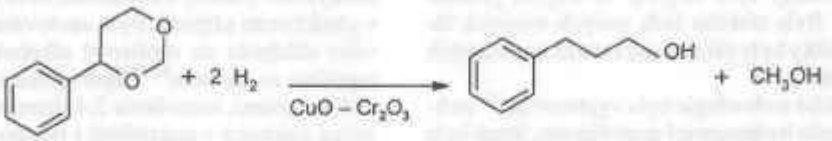
4-Fenyl-1,3-dioxan je látkou, podléhající řadě zajímavých přeměn, vedoucích v některých případech k dříve nepopsaným látkám nebo látkám s nepopsanými vonnými vlastnostmi[15,24]. V provozním měřítku byla ověřena jeho acidolýza na 1-fenylpropan-1,3-diol-diacetát s následující reesterifikací na 1-fenylpropan-1,3-diol, velmi účinný repelent (7, *8*).

Z 1-fenylpropan-1,3-diolu byla připravena řada nových cyklických acetalů se zajímavými vonnými vlastnostmi[15] a samozřejmě výbornou stabilitou v alkalickém prostředí.

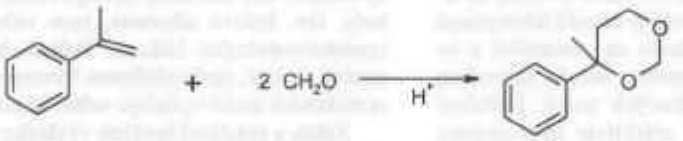
Zajímavé jsou přeměny 4-fenyl-1,3-dioxanu na různých katalyzátorech. Vedle již zmíněného hydrogenolytického štěpení na 3-fenylpropan-1-ol bylo objeveno štěpení na palladiovém katalyzátoru na 1-fenylpropan-1-on (propiofenon)[13,25] a na



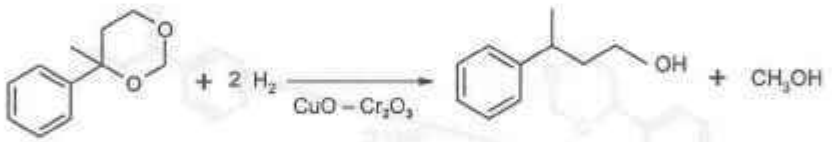
(1)



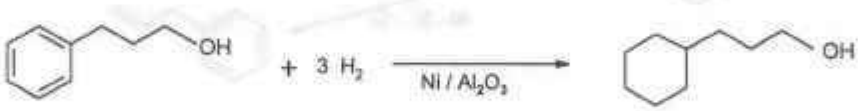
(2)



(3)



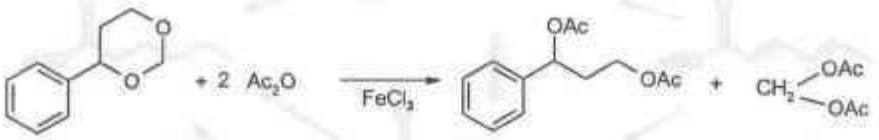
(4)



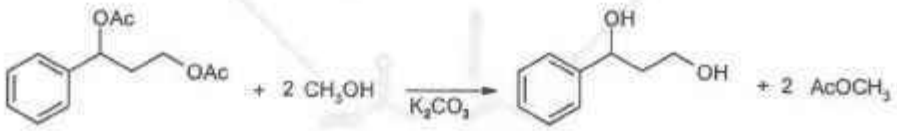
(5)



(6)



(7)



(8)

alumosilikátovém katalyzátoru na allylbenzen[26], obojí s vysokou selektivitou (schéma 1).

Zatímco 3-fenylpropan-1-ol je klasickou vonnou látkou a meziproduktem pro další vonné látky, jsou propiofenon a allylbenzen, látky ne zcela snadno dostupné jinými cestami, poloprodukty s možnostmi uplatnění v syntéze léčiv a herbicidů. Štěpení 4-fenyl-4-methyl-1,3-dioxanu je problematičtější[27] a s výjimkou již uvedené hydrogenolýzy na 3-fenylbutan-1-ol končily všechny pokusy o analogické přeměny nezdarem.

Na výše uvedené práce navázal výzkum nových látek na bázi 4-alkylstyrenů[28-30]. Ty byly získávány acylací alkylbenzenů acetanhydridem, následnou hydrogenací na příslušné sekundární alkoholy a konečně dehydratací. 4-Alkylstyreny byly poté podrobeny Prinsově reakci s formaldehydem a vzniklé substituované 1,3-dioxany byly štěpeny ve smyslu přeměn 4-fenyl-1,3-dioxanu. Byla získána řada nových vonných látek[28,29]. Nové vonné látky byly připraveny rovněž z uvedených sekundárních alkoholů[30].

Na Ústavu organické technologie byla vypracována[31] technologie 1-fenylethanolu hydrogenací acetofenonu, která byla rovněž realizována v závodě Židovice, kratší výrobní kampaní prošla i selektivní hydrogenace 2-ethylhex-2-enalu na 2-ethylhexanal. Realizovány naopak nebyly rovněž laboratorně vyřešené selektivní hydrogenace citralu na citronellol a na směs citronellalu, citronellolu, geraniolu a nerolu. Důvodem byly především posuny cen na světových trzích. Podobný osud mají zatím rovněž dořešené[32] selektivní hydrogenace dehydrolinaloolu a dehydrolinalyl-acetátu na linalool a linalyl-acetát. K provozně vyzkoušeným postupům patří také cyklizace citronellalu na isopulegol a následná hydrogenace na menthol.

Dalším z výzkumně úspěšně vyřešených problémů je chemoselektivní hydrogenace C=C vazby vedle vazby C=O. Jde především o benzylidenovou dvojnou vazbu v produktech kondenzace benzaldehydu a substituovaných benzaldehydů s acetonem a dvojnou vazbu v produktech kondenzace cyklopentanonu s alifatickými aldehydy. Získávají se vesměs klasické vonné a chuťové látky typu Jasmarol, Frambinon a Zingeron resp. alkylcyklopentanony, které jsou meziprodukty pro výrobu vonných laktonů.

Výzkum byl zaměřen i na opačný problém, chemoselektivní hydrogenaci karbonylové funkce vedle dvojné C=C vazby. Tato hydrogenace je komplikovanější, vyžaduje specifické katalytické systémy a chemoselektivity jsou obvykle nižší než v předchozím případě. Byla studována hydrogenace skořicového aldehydu na skořicový alkohol[33] a ve větší šíři bylo započato se studiem[34,35] hydrogenace methylesteru kyseliny sorbové *(trans, trans*-hexa-2,4-dienové). Tato hydrogenace je velice zajímavá v souvislosti s tvorbou methylesterů *cis*-hex-3-enové a *trans*-hex-2-enové kyseliny. Ty mohou být chemicky redukovány ($LiAlH_4$) na odpovídající alkoholy. Tyto alkoholy, tzv. listové alkoholy, jsou velmi drahými a obtížně syntetizovatelnými látkami. Průběh hydrogenace je ovšem značně složitý, zjednodušenou formou je schéma 2. Zpracování reakčních směsí vyžaduje velmi účinnou rektifikaci.

Zatím s poněkud horšími výsledky, je alternativně studována[36] hydrogenace *trans, trans*-hexa-2,4-dien-1-olu na odpo-

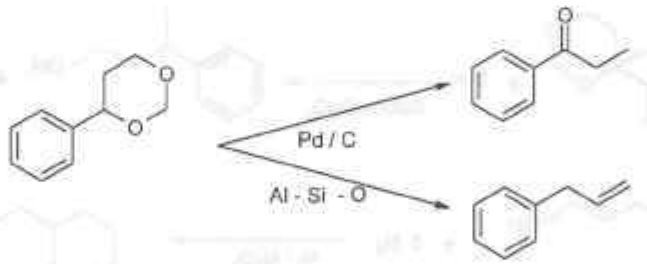


Schéma 1

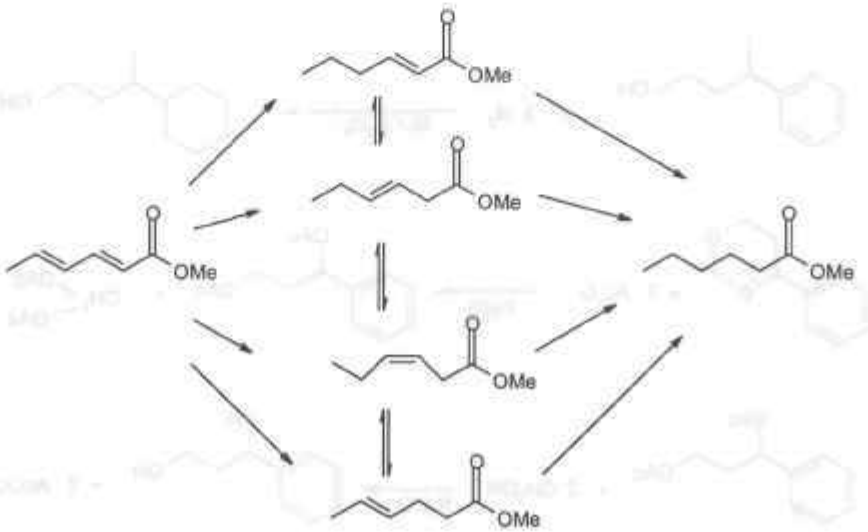


Schéma 2

vídající hexenoly. Výchozí dienol se připravuje opět redukcí methy testeru kyseliny sorbové $LiAlH_4$.

Množství vedlejších látek je v tomto případě vyšší než při hydrogenaci methy lesteru kyseliny sorbové, neboť dochází k izomeraci nenasycených alkoholů na aldehydy a k hydrogenolýze alkoholu nebo k jeho dehydrataci a následné hydrogenaci dvojné vazby.

Značná pozornost byla v minulosti věnována moderním způsobům zavádění aldehydové skupiny do aromatického jádra[37,38], především v souvislosti s výrobou ethylvanilinu, ale i heliotropinu a 4-hydroxybenzaldehydu (*9–11*).

Technologie ethylvanilinu byla řešena ve spolupráci s VÚTP Rakovník a výrobním závodem v Zásmukách (dnes Arovanillon s.r.o.) a byla vypracována až do stadia provozních zkoušek. Arovanillon vznikl z bývalého závodu Aromy resp. Astridu jako producent jediného výrobku a v současné době nemá valné vyhlídky do budoucna. Problém spočívá především v zastaralé a ekologicky nevhodné technologii, přičemž vzhledem k situaci na trhu nemají dnes již žádné inovace asi smysl.

V osmdesátých letech byl na ÚOT vypracován originální postup syntézy 2-ethoxyfenolu[39-44], meziproduktu pro ethylvanilin, jehož prvé dva stupně byly i poloprovozně odzkoušeny (*12–14*).

Posléze bylo rozhodnuto řešit problém dovozem 2-ethoxyfenolu, takže další zkoušky byly ukončeny. Laboratorně bylo vyřešeno též další využití 2-ethoxyfenolu pro syntézu vonného allyletheru (75).

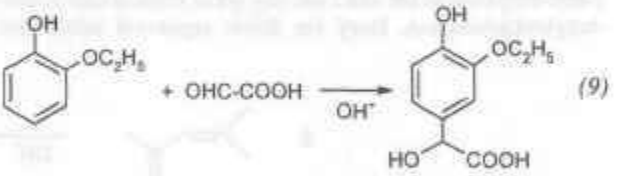
V období systematického vyhledávání možností využívání tuzemských surovinových zdrojů, resp. odpadních produktů pro výrobu vonných látek byly na ÚOT vypracovány a po určitou dobu i průmyslově provozovány tři technologické postupy:

a) methyl-benzoát, odpadní produkt z výroby dimethyl-tereftalátu, byl reesterifikován některými alkoholy na vyšší estery pro technickou parfemaci,

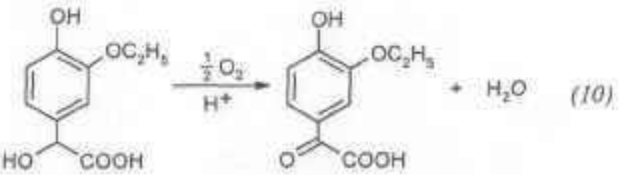
b) 4-methylpent-3-en-2-on (mesityloxid), odpadní produkt z výroby vitaminu C, byl alkalickou kondenzací zpracován na směs isoxylithonů, látek s vonnými vlastnostmi (76),

c) 2-fenylprop-1-en, odpadní produkt z výroby kumenového fenolu, byl reakcí s formaldehydem v prostředí acetanhydridu a kyseliny octové převáděn na směs[45] vonných fenylbutenyl-acetátů (77).

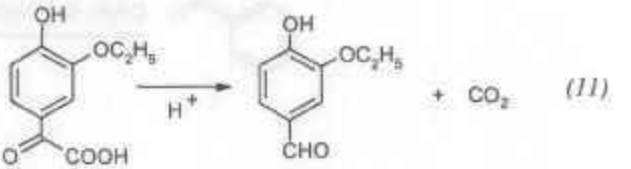
V současné době jsou nejdůležitějšími syntetickými produkty a.s. Aroma výrobky komerčně nazývané Arol a Arocet, což jsou směsi stereoisomerů 2-*terc*-butylcyklohexanolu resp. jeho acetátu. Vyrábějí se katalytickou hydrogenaci *2-terc*-butylfenolu, která byla vypracována na Ústavu organické technologie. Z komerčního hlediska má zásadní význam poměr *cis/trans* isomerů, který lze sice ovlivnit rektifikací, nic-



(9)



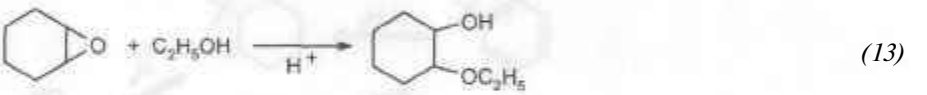
(10)



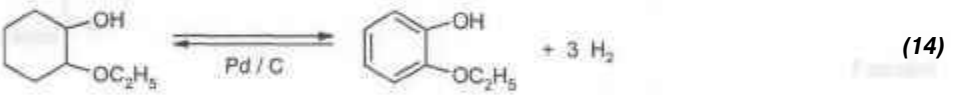
(11)



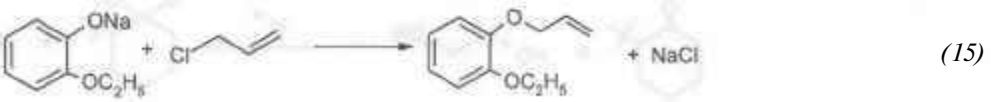
(12)



(13)



(14)



(15)

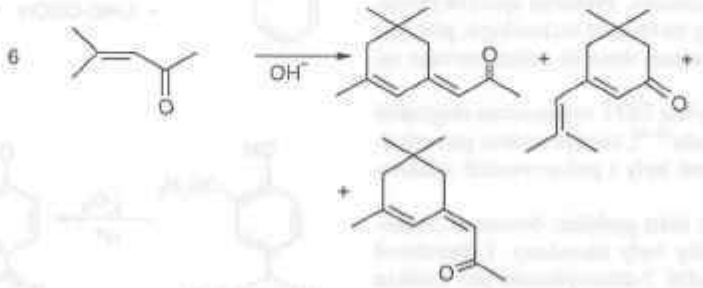
méně ekonomicky nejvýhodnější je vedení hydrogenace tak, aby bylo přímo dosaženo požadovaného zastoupení. Důvodem je odlišná vůňová charakteristika obou isomerů, z níž se odvíjejí požadavky na jejich obsah v produktu (schéma 3). Objevení možnosti určitého „nastavení" zmíněného poměru tvoří důležité know-how celé technologie. Výrobek je z hlediska podniku exportním artiklem zásadní důležitosti a výroba má neustále rostoucí trend. V současné době se vyrábí několik set tun ročně.

I když je jasné, že dominujícím výrobkem bude nadále směs stereoisomerů 2-*terc*-butylcyklohexyl-acetátu, jsou hledány další možnosti využití 2-*terc*-butylcyklohexanolu. Zajímavé jsou např. od něho odvozené karbonáty[46]. Hydrogenaci 2-*terc*-butylfenolu lze vést i tak, aby při ní vznikal také *2-terc*-butylcyklohexanon, který lze dobře separovat rektifikací. Keton může být samozřejmě i hlavním produktem hydrogenace. Zajímavá možnost jeho využití spočívá v přípravě[46] cyklických ketalů *(18).*

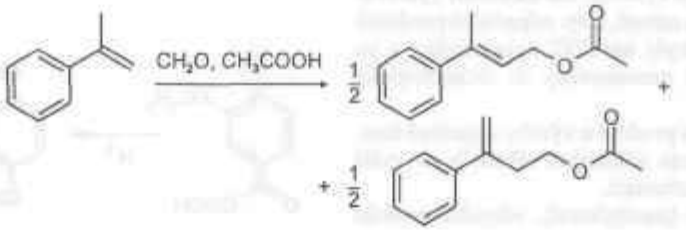
Provozními zkouškami prochází v současné době další výzkumně dořešená technologie, a to allyl-3-cyklohexylpropanoátu. Ananasové aroma této látky ji činí velmi atraktivní, přičemž relativně jednoduchý postup, vypracovaný na ÚOT, nebyl v literatuře nalezen. Vychází se z methylesteru kyseliny skořicové, v němž se v jednom stupni hydrogenuje C=C vazba i aromatické jádro. Reesterifikací allylalkoholem se pak získává allyl-3-cyklohexylpropanoát *(19, 20).*

V loňském roce byla v a.s. Aroma zahájena kampaňovitá výroba esterů kyseliny anthranilové reakcí anhydridu kyseliny isatoové s alkoholy C_1–C_4 *(21).*

Pří slušné estery jsou rovněž dobrým vývozním artiklem.



(16)



(17)

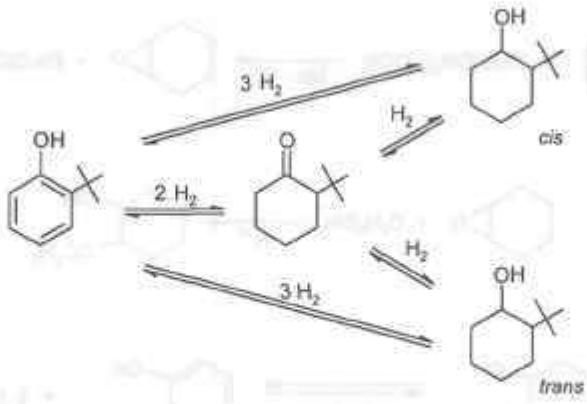
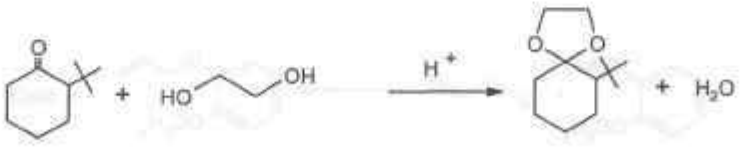
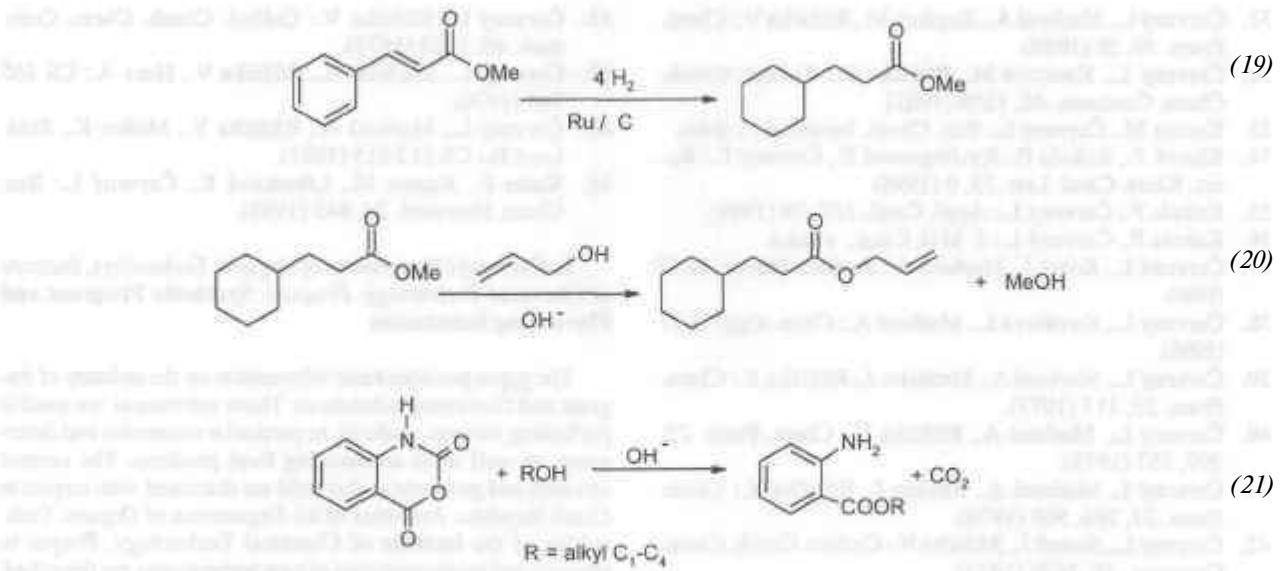


Schéma 3



(18)



Spolupráce Ústavu organické technologie VŠCHT v Praze s podniky Aroma a Aroco je příkladem oboustranně výhodné dlouhodobé systematické spolupráce akademického pracoviště s průmyslovými podniky. Řada laboratorních výsledků nalezla uplatnění v průmyslové praxi především proto, že výzkum byl takto cíleně orientován. Vedle toho byl vždy hledán a nacházen též prostor pro badatelskou činnost. Do výzkumu byly bohatou měrou zapojeni studenti oboru Technologie organických látek, z nichž mnozí zůstali věrni nejen vystudovanému oboru, ale našli své uplatnění přímo ve výzkumu, vývoji nebo výrobě syntetických vonných a chuťových látek.

LITERATURA

1. Harper R., Bate-Smith E., C. Land D. G., Griffiths N.M.: Parfum. Essent. Oil *59,* 22 (1968).
2. Dravnieks A., Bock F. C, Powers J. J., Tibbetts M., Ford M.: Chem. Senses Flavour *3,* 191 (1978).
3. Amoore J. E., Pelosi P., Forrester L. J.: Chem. Senses Flavour *2,* 401(1977).
4. Pelosi P., Pisanelli A. M.: Chem. Senses Flavour *6,* 87 (1981).
5. Harper R., Bate-Smith E. C., Land D. G.: *Odour Description and Odour Classification.* American Elsevier Pub., New York 1968.
6. Ohloff G., Winter B., Fehr F., v knize: *Perfumes: Art, Science and Technology* (Muller P.M., Lamparsky D., eds.), kap. 9. Elsevier, New York 1991.
7. Thiboud M., v knize: *Perfumes: Art, Science and Technology* (Muller P. M., Lamparsky D., eds.), kap. 8. Elsevier, London 1991.
8. Vonášek F., Trepková E., Novotný L.: *Látky vonné a chuťové.* SNTL, Praha a Alfa, Bratislava 1987.
9. Arctander S.: *Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals).* Autorská publ., Montclaire 1969.
10. Trepková E., Vonášek F.: *Vůně a parfémy. Tajemství přitažlivosti.* Maxdorf, Praha 1997.
11. Červený L., Růžička V.: Fette, Seifen, Anstrichmittel *85,* 362 (1983).
12. Červený L., Marhoul A., Růžička V., Dolník J., Srna V.: CS 189 945(1978).
13. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: J. Prakt. Chem. *319,* 601 (1977).
14. Červený L., Wurzlová A., Marhoul A., Růžička V.: J. Chem. Technol. Biotechnol. *34 A,* 311 (1984).
15. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: Perfum. Flavor. *11,* 9(1986/87).
16. Červený L., Marhoul A., Růžička V., Srna V.: CS 224 183(1983).
17. Červený L., Marhoul A., Srna V.: CS 277 281 (1992).
18. Červený L., Marhoul A., Kovářová L., Havlíček V.: Cosmet. Aerosols Toilet. Austral. 5, 21 (1990).
19. Červený L., Marhoul A., Winklerová P.: Perfum. Flavor. *16,* 37 (1991).
20. Červený L., Duben B., Marhoul A., Růžička V.: Chem. Prum. *28,* 582 (1978).
21. Červený L., Kačer P., Kalinová L., Valentová M., Pokorný J.: Seifen, Oele, Fette, Wachse *122,* 612 (1996).
22. Červený L., Marhoul A., Hrdličková L.: Perfum. Flavor. 76,41(1991).
23. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: Chem.–Ztg. *105,* 251 (1981).
24. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: Chem. Prum. *30,* 127(1980).
25. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: CS 182544(1977).
26. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: CS 239 665 (1985).
27. Červený L., Marhoul A., Železný M., Růžička V.: Chem. Prum. *26,* 519(1976).
28. Červený L., Křivská M., Hromas J.: Seifen, Oele, Fette, Wachse *119,* 560(1993).
29. Červený L., Křivská M., Marhoul A.: Chem. Listy *87,* 110(1993).
30. Červený L., Křivská M., Marhoul A., Pokorný J., Kalinová J.: Perfum. Flavor. *18,* 41 (1993).

31. Červený L., Marhoul A., Zugárek M., Růžička V.: Chem. Prum. *30,* 28 (1980).
32. Červený L., Kuncová M., Růžička V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *46,* 1258 (1981).
33. Kuzma M., Červený L.: Res. Chem. Intermed., v tisku.
34. Klusoň P., Kukula P., Kyslingerová E., Červený L.: React. Kinet. Catal. Lett. *59,* 9 (1996).
35. Kukula P., Červený L.: Appl. Catal. *177,* 79 (1999).
36. Kukula P., Červený L.: J. Mol. Catal., v tisku.
37. Červený L., Kozel J., Marhoul A.: Perfum. Flavor. *14,* 13 (1989).
38. Červený L., Kovářová L., Marhoul A.: Chim. Oggi. *5,* 37 (1996).
39. Červený L., Marhoul A., Strohalm J., Růžička V.: Chem. Prum. *23,* 117 (1973).
40. Červený L., Marhoul A., Růžička V.: Chem. Prum. *23,* 299, 357 (1973).
41. Červený L. Marhoul A., Florián J., Růžička V.: Chem. Prum. *24,* 296,503(1974).
42. Červený L., Bartoň J., Růžička V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *39,* 2470 (1974).
43. Červený L., Růžička V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *40,* 2622 (1975).
44. Červený L., Marhoul A., Růžička V., Hora A.: CS 165 744 (1976).
45. Červený L., Marhoul A., Růžička V., Muller K., Sládková D.: CS 212 915 (1981).
46. Kačer P., Kuzma M., Liberková K., Červený L.: Res. Chem. Intermed. *24,* 643 (1998).

L. **Červený** *(Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague):* **Synthetic Fragrant and Flavouring Substances**

The paper provides basic information on the industry of fragrant and flavouring substances. These substances are used in perfuming various products, in particular cosmetics and detergents, as well as in aromatizing food products. The current situation and problems in this field are discussed with respect to Czech Republic. Activities of the Department of Organic Technology of the Institute of Chemical Technology, Prague in research and implementation of new technologies are described.

OBSAHOVÉ LÁTKY ROSTLIN ČELEDI *CELASTRACEAE*

JIŘÍ PATOČKA[a] a LUDĚK JAHODÁŘ[b]

[a]Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, 500 01 Hradec Králové, [b]Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 500 05 Hradec Králové

Došlo dne 22.X. 1998

Klíčová slova: *Celastraceae,* alkaloid, terpen, biologický efekt

Obsah

1. Úvod
2. Chemie obsahových látek
   2.1. Pentacyklické chinoidní triterpeny
   2.2. Tricyklické seskviterpeny
      2.2.1. Seskviterpenické laktony
      2.2.2. Dihydro-P-agarofuranové seskviterpeny
3. Alkaloidy
   3.1. Ansa-makrolidové alkaloidy
   3.2. Maytansinoidy
   3.3. Triazacyklotridekanové alkaloidy
4. Biologické účinky
5 Závěr

1. Úvod

Čeleď *Celastraceae* (jesencovitých) zahrnuje kolem 430 druhů rostlin, rozdělených do mnoha rodů, z nichž fytochemicky byly studovány zejména rody *Euonymus, Catha, Maytenus, Tripterygium, Celastrus, Rzedowskia, Pleurostylia, Putterlickia, Orthosphenia, Hippocratea, Cassine* a *Bhesa.* Rostliny této čeledi jsou rozšířeny v teplejších oblastech celého světa, zejména však v latinsko-americké oblasti. V Evropě je tato čeleď zastoupena jen dvěma rody, *Maytenus* a *Euonymus* (brslen). Brslen evropský *{Euonymus europeaus* L.) roste i v našich lesích, zejména na jejich okrajích a křovinatých úsecích. Je rozšířen po celé Evropě. Na Iberském poloostrově roste *Maytenus senegalensis* Lank známý též jako *Catha europea*[1]. Nejznámnějším zástupcem rodu *Catha* je *Catha edulis,* jejíž listy z mladých výhonků poskytují drogu známou pod názvem khat, oblíbenou zejména v arabských zemích. Tento stromovitý keř je původem z Etiopie, ale rostlina se pěstuje uměle v řadě afrických států (Keňa, Somálsko, Tanzanie) i jinde[2]. Droga se žvýká v čerstvém stavu, kdy je nejúčinnější, nebo se z ní připravuje nálev, tzv. somálský čaj. Khat potlačuje spánek a únavu, mírní bolest, zahání hlad a zlepšuje náladu[3]. Endemický druh *Maytenus canariensis (Catha cassinoides)* roste na Kanárských ostrovech[4] a druh *Maytenus dryaudii* na ostrově Madeira[5].

V Evropě bylo dříve dřevo brslenu ceněno jako surovina pro výrobu ševcovských floků či pro drobné řezbářské práce, rostlina však nikdy nehrála úlohu v lidovém léčitelství jako droga. Naproti tomu v oblasti Střední Ameriky patřily vždy rostliny čeledi *Celastraceae* mezi významné drogy původního indiánského obyvatelstva. V současné době se staly předmětem zájmu mnoha specialistů, byla z nich izolována řada zajímavých látek a prozkoumány některé jejich biologické účinky. Informace o obsahových látkách jsou však často publikovány rozptýleně v obtížně přístupných zdrojích a souhrnná práce, pokud je nám známo, nebyla dosud publikována. Smyslem této práce je pokusit se alespoň o stručnou sumarizaci dosavadních znalostí.

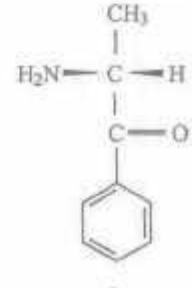
2. Chemie obsahových látek

Vzhledem k počtu druhů čeledi *Celastraceae* byla až dosud fytochemicky studována jen jejich nepatrná část. Přesto množství nalezených látek je překvapivě veliké a jejich strukturní variabilita značná. Po dlouhou dobu byly naše znalosti omezeny na obsahové látky izolované z *Catha edulis,* které jsou i účinnými látkami stejnojmenné drogy. Tyto látky jsou deriváty fenylethylaminu a hlavním farmakologicky účinným alkaloidem je kathinon (*I*). Ten je ve vysoké koncentraci obsažen jen v čerstvé droze, při sušení se jeho obsah rychle snižuje, neboť je rychle transformován na efedrin a pseudoefedrin. Tyto alkaloidy se svým farmakologickým profilem poněkud liší od kathinonu a jsou i méně účinné[6].

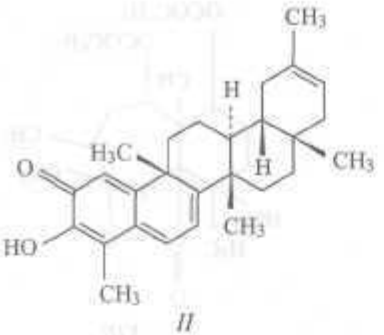
Poněkud zjednodušeně je možno říci, že hlavními obsahovými látkami všech dosud studovaných druhů rostlin čeledi *Celastraceae* jsou terpeny a alkaloidy. Terpeny jsou zastoupeny zejména pentacyklickými triterpeny, tricyklickými seskviterpenickými laktony a seskviterpeny se skeletem dihydro-|3--agarofuranu. Alkaloidy jsou zastoupeny dvěma hlavními skupinami látek, které je možno charakterizovat jako ansa-makrolidy. Některé nalezené látky jsou však do tohoto schématu jen obtížně zařaditelné.

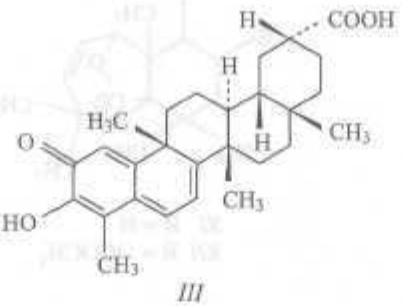
2.1. Pentacyklické chinoidní triterpeny

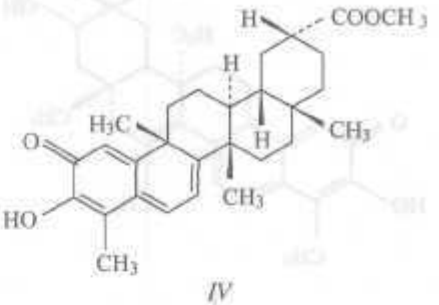
Typickými představiteli těchto terpenů jsou např. iguesterin (*II*), celastrol (*III*), pristimerin (*IV*) či tingenon (*V*)

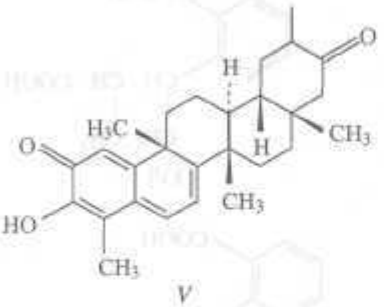


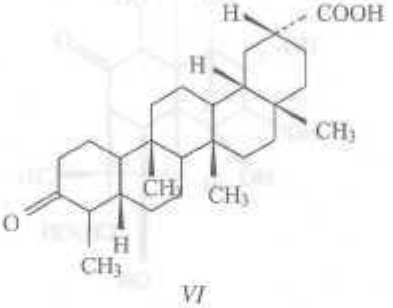
I

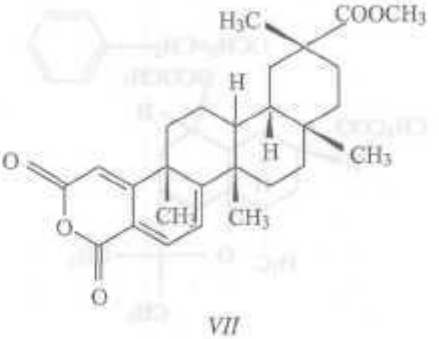

II


III

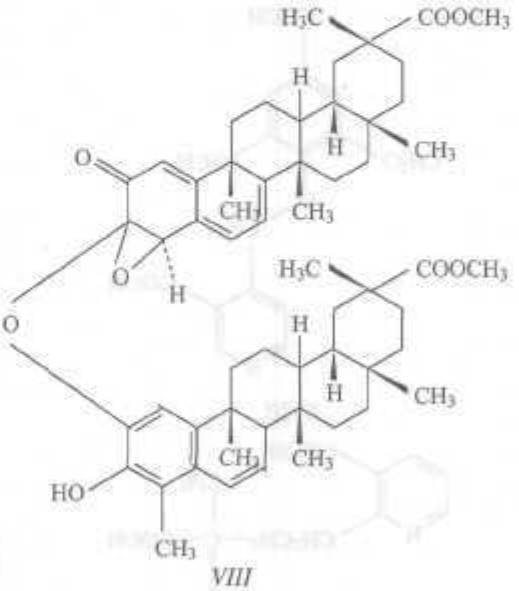

IV


V


VI


VII

z *Maytenus canariensis*"'. Svým skeletem připomínají např. taraxerol, taraxasterol či taraxeron z *Taraxacum officinale*. Díky své semichinoidní struktuře jsou však tyto látky barevné, převážně žluté. Pristimerin *(IV)* byl nalezen také v *Zinowiewia integerrimina*, další rostlině čeledi *Celastraceae*[8,9] známé pod domorodým názvem „Palo blanco". V této rostlině byly nalezeny dále triterpeny s friedelanovým skeletem[10]. Látky s touto strukturou byly nalezeny i v *Maytenus canariensis* a to 29-hydroxy-friedelan-3-on a 30-hydroxy-friedelan-3-on, jejichž matečnou látkou je kyselina 3-oxo-friedelan-29-karboxylová[9] *(VI)*. Triterpeny se skeletem lupenu, tj. lupen-29-ol-3-on a lupen-3,29-diol byly izolovány z rostliny *Schafferia cuneifolia*[9,10]. Do této skupiny látek je možno zařadit také celastanhydrid *(VII)* izolovaný z *Kokoona zeylanica,* nalezený i v dalších druzích čeledi *Celastraceae*[1 1,12], či magellanin *(VIII)* sestávající ze dvou molekul triterpenu spojených eterickým můstkem, nalezený v *Maytenus magellanica* [13]. Dalšími látkami tohoto typu jsou např. netzahuacoyon *(IX)* a netzahualcoynol *(X)* z *Orthospenia mexicana*[14,15].

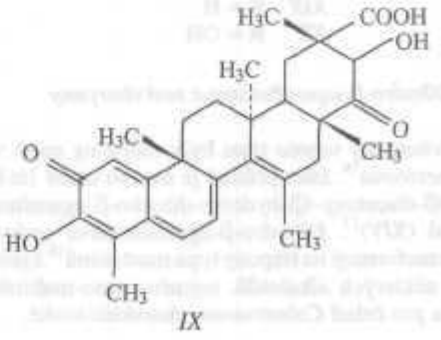

VIII

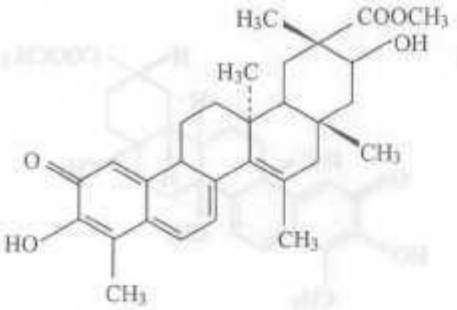
2.2. Tricyklické seskviterpeny

Tricyklické seskviterpeny čeledi *Celastraceae* lze po chemické stránce rozdělit na dva typy. Na seskviterpenické tricyklické laktony a na tricyklické dihydro-β-agarofurany.

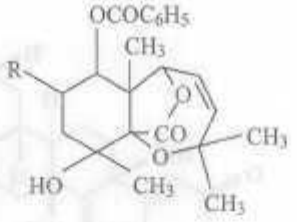
2.2.1. Seskviterpenické laktony

Typickými představiteli těchto látek jsou laktony označované jako mortoniny A *(XI),* B *(XII)* a D *(XIII),* nalezené v rostlině *Mortonia gregii*[15,16]. Byly izolovány též z *Mortonia palmieri* a *M. hidalguensis*[5] a jsou pravděpodobně metabolity seskviterpenů se skeletem dihydro-β-agarofuranu.

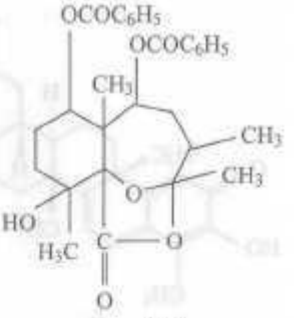

IX



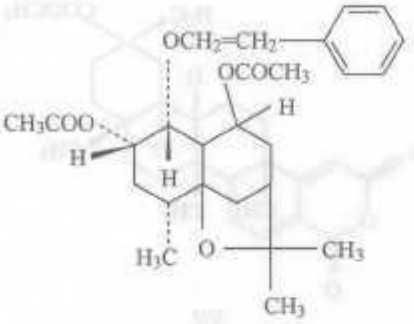
X



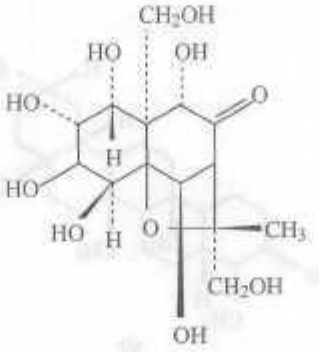
XI R = H
XII R = $OCOCH_3$



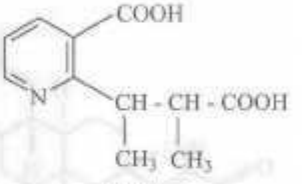
XIII



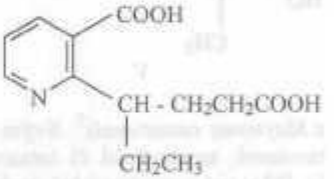
XIV



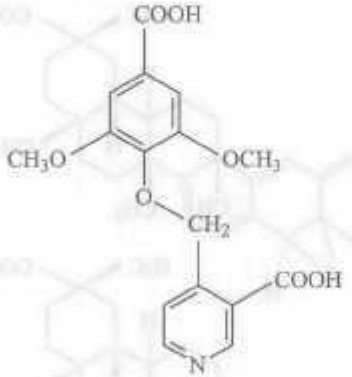
XV



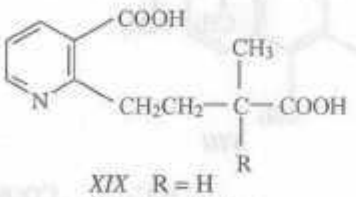
XVI



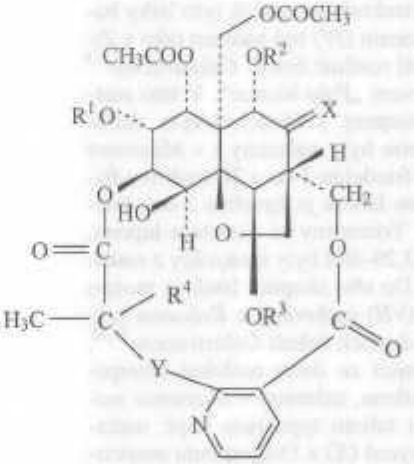
XVII



XVIII



XIX R = H
XX R = OH



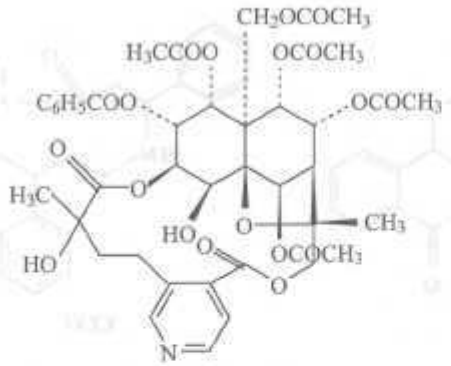
XXI R^1 = Bz, R^2 = Ac, R^3 = Ac, R^4 = OH, X = OAc,H, Y = CH_2CH_2
XXII R^1 = Ac, R^2 = Ac, R^3 = Ac, R^4 = OH , X = OAc,H, Y = CH_2CH_2
XXIII R^1 = Bz, R^2 = Ac, R^3 = H, R^4 = OH, X = O, Y = CH_2CH_2
XXIV R^1 = Ac, R^2 = Bz, R^3 = Ac, R^4 = H, X = OAc,H, Y = $CHCH_2$

2.2.2. Dihydro-β-agarofuranové seskviterpeny

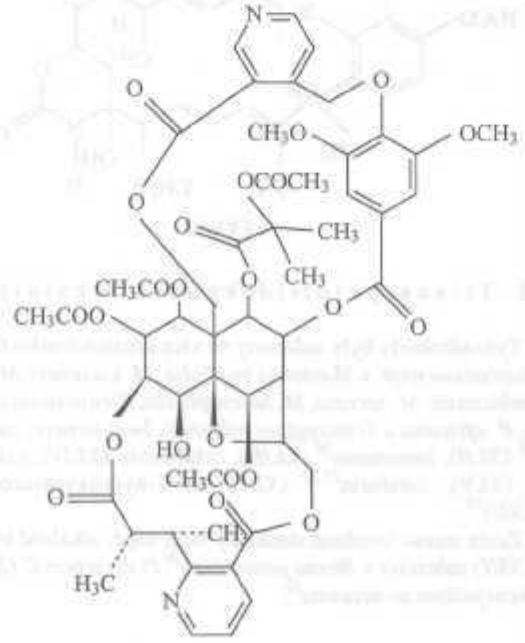
Seskviterpeny tohoto typu byly nalezeny např. v *Orthospenia mexicana*[16]. Jako příklad je možno uvést 1α-benzoyloxy-6p,9P-diacetoxy-4p-hydroxy-dihydro-P-agarofuran či isocelorbicol (*XIV*)[17]. Dihydro-P-agarofuranové seskviterpeny snadno transformují na terpeny typu mortoninů[16] a jsou rovněž součástí některých alkaloidů, zejména ansa-makrolidových, které jsou pro čeleď *Celastraceae* charakteristické.

3. Alkaloidy

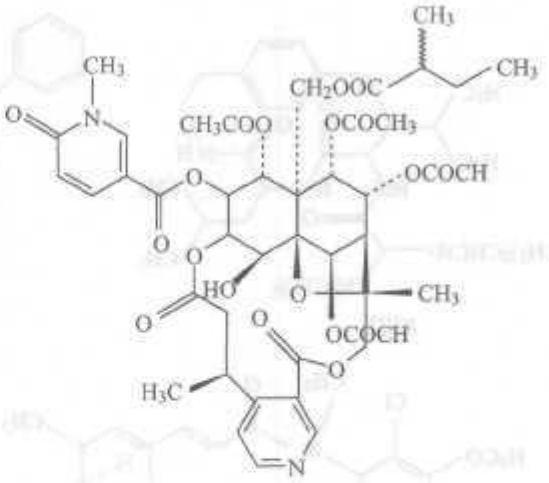
Alkaloidy čeledi *Celastraceae* je možno podle jejich chemické struktury rozdělit do tří skupin. První je tvořena makrocyklickými diestery typu ansa-makrolidů s pyridinovým jádrem v molekule, druhá, označovaná jako maytansinoidy, má také strukturu ansa-makrolidů, v jejich molekule je však zabudován skelet 1,3-oxazinu a obsahují také atom chloru, vázaný na benzenové jádro[5]. Třetí skupina alkaloidů má ve své struktuře zabudován skelet 1,5,9-triazacyklotridekanu[18].



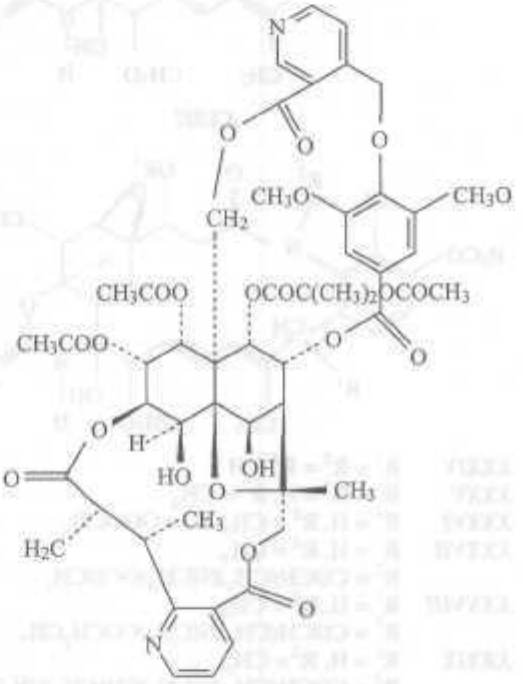
XXV



XXVII



XXVI



XXVIII

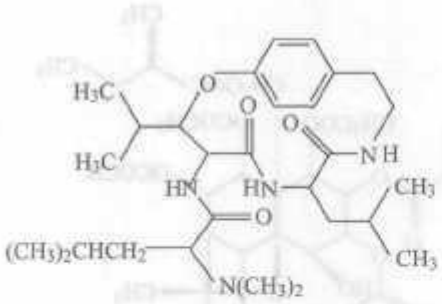
3.1. Ansa-makrolidové alkaloidy

Tato skupina alkaloidů má jednu část molekuly tvořenou seskviterpenem se skeletem P-agarofuranu, nejčastěji evoninolu *(XV)*, a druhou část molekuly tvoří některá z dikarboxylových kyselin odvozených od pyridinu - kyseliny evonová *(XVI)*, cassinová *(XVII)*, cathová *(XVIII)*, wilfordová *(XIX)* nebo hydroxywilfordová *(XX)*. Molekula evoninolu *(XV)* je v těchto alkaloidech napojena esterickou vazbou na některou z výše uvedených pyridin-dikarboxylových kyselin do struktury cyklického esteru a část hydroxylových skupin evoninové části molekuly je acetylována či benzoylována [5]. Základními alkaloidy této skupiny jsou wilfordin *(XXI)*, alatamin *(XXII)*, neoalatamin *(XXIII)* a horridin *(XXIV)*, nalezené ve značném počtu druhů[5]. V dalších rostlinách čeledi *Celastraceae* jsou však stále nalézány nové látky tohoto typu, např. isowilfordin *(XXV)* v *Tripterygiumwilfordii*[19], hippocratein III *(XXVI)* z *Hippocratea excelsa*[20] či catheduliny E3 *(XXVII)* a E4 *(XXVIII)* z *Catha edulis*[21].

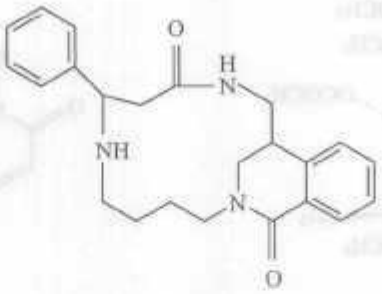
Dalšími typy ansa-makrolidových alkaloidů jsou např. franganin *(XXIX)* (daechuin S4) z *Melochia corchorifolia*[22] či cyclocelabenzen *(XXX)* nebo isocyclocelabenzen *(XXXI)* z *Maytenus mossambicensis* [23,24].

3.2. Maytansinoidy

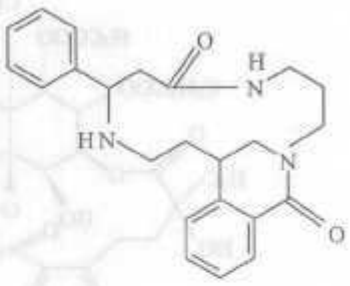
Až dosud bylo popsáno deset alkaloidů této skupiny: maysenin *(XXXII)*, maysin *(XXXIII)*, normaysin *(XXXIV)*, maytansinol *(XXXV)*, maytanacin *(XXXVI)*, maytansin *(XXXVII)*, maytanprin *(XXXVIII)*, maytabutin *(XXXIX)* maytanbutacin *(XL)* a maytanvalin *(XLI)*. Všechny byly izolovány z *Maytenus canariensis* [5].



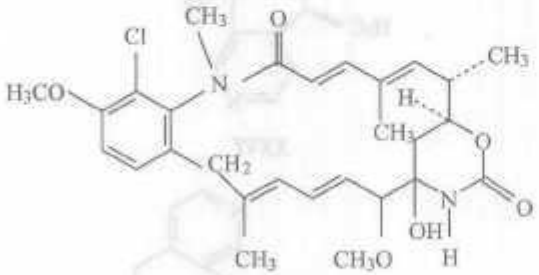
XXIX



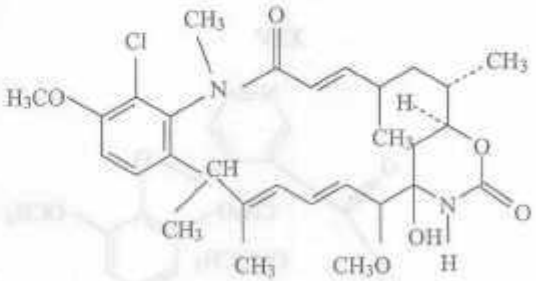
XXX



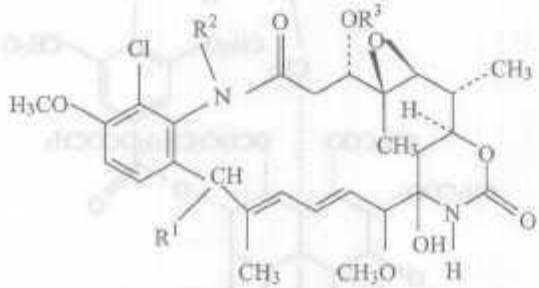
XXXI



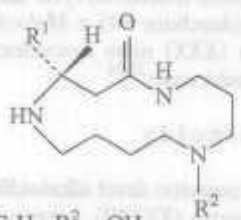
XXXII



XXXIII



XXXIV $R^1 = R^2 = R^3 = H$
XXXV $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = CH_3$
XXXVI $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = OCOCH_3$
XXXVII $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = COCH(CH_3)N(CH_3)OCOCH_3$
XXXVIII $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = COCH(CH_3)N(CH_3)COCH_2CH_3$
XXXIX $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = COCH(CH_3)N(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$
XL $R^1 = COOCH_3$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = COCH(CH_3)_2$
XLI $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = COCH(CH_3)N(CH_3)COCH_2CH(CH_3)_2$



XLII $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = OH$
XLIII $R^1 = CH{=}CH{-}CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$, $R^2 = COCH_3$
XLIV $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = COC_6H_5$
XLV $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = COCH{=}CHC_6H_5$
XLVI $R^1 = C_6H_5$, $R^2 = CO$-(2-furyl)

3.3. Triazacyklotridekanové alkaloidy

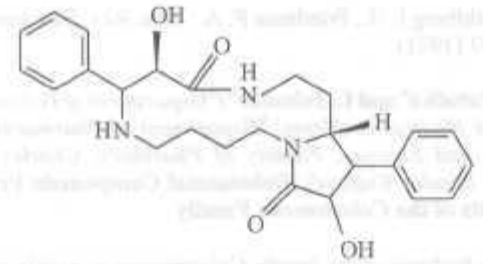
Tyto alkaloidy byly nalezeny ve více druzích rostlin čeledi *Celastraceae* např. v *Maytenus buxifolia, M. loeseneri, M. mossambicensis, M. serrata, M. heterophylla, Pleurostylia opposita, P. africana* a *Triptrygiumwilfordii.* Jsou to např. mayfolin[25] (*XLII*), loesenerin[26] (*XLIII*), celabenzin (*XLIV*), celacinnin (*XLV*), celafurin[27,28] (*XLVI*) či 7-hydroxypleurocorin (*XLVII*)[29].

Zcela mimo uvedené struktury stojí např. alkaloid bhesin *(XLVIII)* nalezený v *Bhesa paniculata*[30] či dicarprin C (*XLIX*) z *Dicarpellum pronyensis*[31].

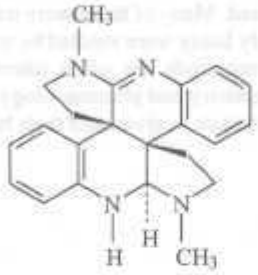
4. Biologické účinky

Obsahové látky čeledi *Celastraceae* vykazují zejména baktericidní a cytostatické účinky[5]. Pentacyklické chinoidní triterpeny vykazují antibaktericidní účinek na gram-pozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*), nikoliv však na gram-negativní *(Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa).* Účinné jsou zejména tingenon *(V),* netzahualcoyon *(IX),* ale i některé další, vykazující antibaktericidní účinek již v koncentracích 10 $\mu g.ml^{-1}$. Látky mají také cytostatický účinek, srovnatelný s účinkem 6-merkaptopurinu. Při testování jejich účinku na růst buněčných kultur HeLa 229 buněk byly nalezeny hodnoty ID_{50}, (tab. I).

U alkaloidů čeledi *Celastraceae* byla zjištěna cytotoxická, antileukemická a antitumorová aktivita[3,32,33]. Např. *XXXVII* vykazoval antileukemickou aktivitu na myší leukemii P-388 v dávkách 50 až 100 $\mu g.kg^{-1}$ a *in vitro* inhiboval růst maligních buněk v koncentracích od 10 $mg.ml^{-1}$ (cit.[5]). Srovnatelnou biologickou aktivitu vykazovaly rovněž látky *XXXII, XXXVIII, XL* a další. Dihydro-(3-agarofuranové ansa-makrolidové alkaloidy nebyly dosud testovány na biologickou účinnost v širším



XLVII



XLVIII



XLIX

Tabulka I
Cytostatické účinky některých terpenů čeledi rostlin *Celastraceae* testovaných na buněčných kulturách HeLa buněk

Látka	ID_{50} [mg.ml^{-1}]
Diacetyl-dihydropristimerin	0,3
Diacetyl-dihydrotingenon	0,4
Diacetyl-dihydroiguesterin	0,4
Igvesterin	0,6
Pristimerin	0,6
Tingenon	0,3

měřítku, mají však zřejmě obdobné účinky jako maytensinoidy. Biologická účinnost těchto alkaloidů je zřejmě založena na stejném principu jako u makrolidových antibiotik typu ansamycinu (rifampicin, rifamycin B, rifamycin SV, streptovarin), tzn. že inhibují bakteriální DNA-dependentní RNA-polymerasu[28].

5. Závěr

Obsahové látky rostlin čeledi *Celastraceae* jsou až dosud málo prozkoumanou kapitolou farmakoetnografie, fytochemie a rostlinné biochemie, neboť většina zástupců této čeledi roste mimo Evropu, zejména v oblasti Latinské Ameriky. Studium chemie, biochemie, farmakologie a toxikologie těchto látek může přinést nejen zajímavé, ale také užitečné poznatky. Řada těchto rostlin hrála důležitou úlohu v lidovém léčitelství původního obyvatelstva středoamerických kultur a může být zajímavou inspirací i pro současnou společnost.

Autoři děkují profesoru A. G. Gonzálesovi a profesorce E. M. Peña-Méndez Z univerzity v La Laguna, Tenerife, za poskytnutí materiálů, které nám umožnily sepsat tento článek. Jeho smyslem není podat vyčerpávající přehled zpracované tematiky, ale poskytnout některé zajímavé a jinak jen obtížně dostupné informace širšímu okruhu chemiků.

LITERATURA

1. Heywood V. H., Burges N. A., Woor D. M., Valentine D. H., Walter S. M., Webb D. A.: *Flora Europea.* Cambridge 1972.
2. Smith T. A.: Phytochemistry *16,* 9 (1977).
3. Lasagna L.: *Phenylpropanolamine: A Review.* Wiley, New York 1988.
4. Gonzáles A. G., Francisco C. G., Freire R., Hernández R., Salazar J. A., Suárez E.: Anal. Chem. *70,* 376 (1975).
5. Gonzáles A. G., Ravilo A. G., Ferro E. B., Gonzáles C. M., Luis J. G., Bazzochi I. L., Darta R. L.: *Plantas iberoamericanas. Fuentes de moleculas bioactivas. I. Celastraceas.* Santa Cruz de Tenerife 1987.
6. Kalix P.: Alcohol Alcohol. *19,* 319 (1984).
7. Gonzáles A. G., Francisco C. G., Freire R., Hernández R., Salazar J. A., Suárez F.: Phytochemistry *14,* 1067 (1975).
8. Brunning R., Wagner H.: Phytochemistry *17,* 1821 (1978).
9. Domínguez X. A., Franco R., García S., Avendano S., Ramírez G., Ortega D. A.: Rev. Latinoamer. Quím. *14,* 146(1984).
10. Betancor C, Freire R., González A. G., Salazar J. A., Pacard C, Prange T.: Phytochemistry *19,* 1989 (1980).
11. Gamlath C. B., Gunatilaka A. A. C, Tezuka Y., Kikuchi T.: Tetrahedron Lett. *29,* 109 (1988).
12. Gamlath C. B., Gunatilaka A. A. C, Tezuka Y., Kikuchi T., Balasubramaniam S.: Phytochemistry *29,* 3189 (1990).
13. Gonzáles A. G., Ravelo A. G., Martínez M. A., Gonzáles C. M.: Nat. Prod. Lett. *4,* 165 (1994).
14. Gonzáles A. G., Fraga B. M., González C. M., Ravelo A. G., Ferro E., Dominguez X. A., Martínez M. A., Fayos J., Perales A., Rodríguez M. L.: Tetrahedron Lett. *24,* 3033 (1983).
15. Kutney K. P., Boada M. H., Salisbury P. J., Stuart K. L„ Worth B. R., Towsley P. M., Chalners W. T., Wilson K., Jacobi G. G.: Phytochemistry *20,* 653 (1981).
16. Rzedowsky J.: Ciencia (México) *16,* 139 (1957).
17. Smith C. R., Miller R. W., Jr.,Weisleder D., Rohwedder W. K., Eickman N., Clardi J.: J. Org. Chem. *41,* 3264 (1976).
18. Ripperger H., Schreiber K., Budzikiewicz H.: Phytochemistry *19,* 161 (1980).
19. Ya L.: Phytochemistry *30,* 719 (1991).
20. Calzada F., Mata R., Lopez R., Linares E., Bye R., Barreto V. M., del Rio F: Phytochemistry *40,* 583 (1995).

21. Baxter R. L., Dawes I. W.: J.C.S. Perkin *1,* 2965 a 2982 (1997).
22. Tschesche R., Last F.: Tetrahedron Lett. *25,* 2993 (1968).
23. Wagner H., Burghart J.: Helv. Chim. Acta *65,* 739 (1982).
24. Wagner H., Burghart J.: Tetrahedron Lett. *1978,* 3893.
25. Diaz M., Ripperger H.: Phytochemistry *21,* 255 (1982).
26. Gamlath C. B., Gunatilaka A. A. C: Phytochemistry *27,* 589(1988).
27. Kupchan S. M., Smith R. M.: J. Org. Chem. *42,* 3660 (1977).
28. Wagner H., Burghart J.: Helv. Chim. Acta *64,* 283 (1981).
29. Seguineau C, Richomme P., Brunaton J. Meadows P.: Heterocycles *38,* 181 (1994).
30. Balayer A., Dalwitz N. J.: Nat. Prod. Lett. *2,* 61 (1993).
31. Adeoti B., Pais P.: Phytochemistry *17,* 831 (1978).
32. Gonzáles A. G., Darias V., Boada J., Alonso G.: Planta Med. *43,* 282(1977).
33. Sneden A. T.: J. Nat. Prod. *44,* 503 (1981).
34. Goldberg I. H., Friedman P. A.: Ann. Rev. Biochem. *40,* 797(1971).

J. Patočka[a] and L. Jahodář[b] *("Department of Toxicology, Military Medical Academy, [b]Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové):* **Substantial Compounds Present in Plants of the *Celastraceae* Family**

The herbage of the family *Celastraceae* is widely spread mainly in subtropical areas all over the world. The compounds contained in these plants (about 430 species) have been as yet insufficiently explored. Many of them were traditional ancient Indian drugs and only lately were studied by modern chemical methods. These compounds are often interesting from the point of view of chemistry and pharmacology. A sbort survey of their chemical structure is gi ven and their biological effects are discussed.

NOVĚJŠÍ POZNATKY O SANGUINARINU A PŘÍBUZNÝCH ALKALOIDECH*

JIŘÍ DOSTÁL a JIŘÍ SLAVÍK

Biochemicky ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nam 2, 662 43 Brno
e-mail jrdostal@med muni cz

Došlo dne 28 I 1999

Klíčová slova sanguinarin, alkaloidy

Obsah

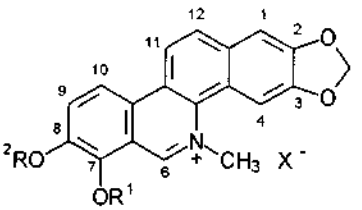
1 Úvod
2 Výskyt
3 Objev alkaloidů
4 Izolace
5 Chemické přeměny
6. Struktura volných bazí
7 Biologická aktivita

1. Úvod

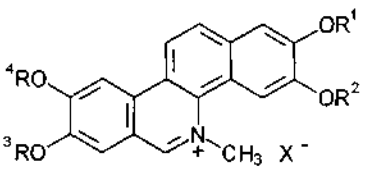
Kvartérní benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy (KBA) jsou poměrně malou skupinou přírodních látek, které jsou na první pohled napadné svým výraznym zbarvením Dosud je jich známo 15 kromě artefaktů a syntetických derivatů Na základním tetracyklickem skeletu se nalézají různé kombinace methoxylovc, methylendioxidové nebo hydroxylové skupiny Podle typu substituce rozlišujeme čtyři podskupiny KBA *1)* 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy jsou sanguinarin *(I),* chelerythrin *(II),* fagaridin *(III)* a isofagaridin *(IV), 2)* 2,3,8,9--tetrasubstituovane nitidin (V), avicin *(VI)* a fagaronin *(VII); 3)* pentasubstituované sanguilutin *(VIII),* sanguirubin *(IX),* chelirubin *(X),* chelilutin *(XI),* 10-hydroxysanguinarin *(XII)* a 10-hydroxychelerythrin *(XIII), 4)* hexasubstituované makarpin *(XIV)* a 12-hydroxychelirubin (*XV*).

2. Výskyt

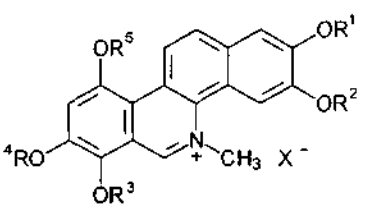
Kvarterní benzofenathridinové alkaloidy se vyskytují v řadě rostlinnych druhů čeledi makovitych *(Papaveraceae),* zemědýmovitých *(Fumanaceae)* a routovitých (*Rutaceae*)[1,2] Jejich zastoupení v rostlinach kolísá od dominantnich alkaloidů až po minoritní. Pravděpodobně nejbohatším zdrojem sanguinarinu *(I)* je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* L Při poranění roní intenzivně červený latex a proto je lidově nazývana krvavý kořen (bloodroot). Obsah KBA v oddencích dosahuje až 6 % sušiny[3,4] Jediným našim (a evropským) druhem produkujícím sanguinarin ve větším množ-



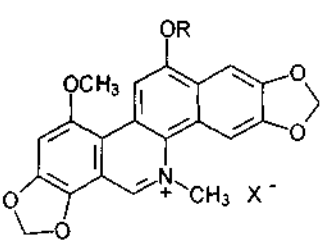
I $R^1 + R^2 = CH_2$
II $R^1 = R^2 = CH_3$
III $R^1 = H, R^2 = CH_3$
IV. $R^1 = CH_3, R^2 = H$



V· $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = CH_3$
VI $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2$
VII $R^1 = H, R^2 = R^3 = R^4 = CH_3$



VIII. $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$
IX. $R^1 = R^2 = R^5 = CH_3, R^3 + R^4 = CH_2$
X $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2, R^5 = CH_3$
XI $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$
XII $R^1 + R^2 = R^3 + R^4 = CH_2, R^5 = H$
XIII $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = CH_3, R^5 = H$



XIV $R = CH_3$
XV. $R = H$

* Předneseno na konferenci Pokroky v organické, biorganické a farmaceutické chemii, Liblice (16 -18 11 1998)

ství je známá bylina vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.)[5,6]. Celá rostlina je bohatě prostoupena mléčnicemi a při poranění roní hustý oranžový latex. Barva latexu je výsledkem kompozice červeného sanguinarinu, žluteho chelerythnnu a dvou protoberbennových alkaloidů, oranžového koptisinu a žlutého berberinu. Obsah KBA v kořeni vlaštovičníku je kolem 0,6 % sušiny[7,8], v latexu je až 10× vyšší[9] Dalším významným zdrojem KBA je himalájská bylina *Dicranostigma lactucoides* Hook f et Thoms obsahující až 4 % KBA v suchém kořeni[10-12], oba druhy rodu *Macleaya,* tj *M. microcarpa* (Maxim.) Fedde a *M cordata* (Willd.) R Br rostoucí na Dálném Východě[13,14] a u nás často pěstované jako dekorativní rostliny, a některe druhy rodu *Bocconia*ze Střední a Jižní Ameriky. Obecně platí, že obsah KBA v kořenech je podstatně vyšší (až o několik řádů) než v nadzemních částech rostliny Alkaloidy typu nitidinu (*V–VII*) se nalézají pouze v čeledi *Rutaceae*[1].

3. Objev alkaloidů

Sanguinarin (*I*) a chelerythnn *{II),* jediné dva komerčně dostupné KBA, byly objeveny v minulém století (tabulka I). Sangumann poprvé popsal James Dana roku 1827 jako hlavní barevnou složku 5. *canadensis*[16] Čistý sanguinarin připravil poprvé Gadamer[17]. Strukturu obou alkaloidů objasnili v roce 1931 rakouští chemici Ernst Spath a Fritz Kuffner na základě chemické degradace[18,19]. V letech 1954-1960 izolovali Slavík a Slavíková několik minoritních KBA: chelirubin *(X)* a chelilutin (*XI*) z *Chehdomum majus*[20] a ze *Sanguinana canadensis*[3] a kromě nich sanguilutin (*VIII*) a sanguirubin *(IX)* ze *S. canadensis*[3] První polovina názvu odkazuje na rostlinný druh, druhá polovina je odvozena z latinského výrazu pro příslušnou barvu (*luteus* žlutý, *ruber* červený) Tři nové hydroxylované derivaty *XII, XIII* a *XV* získali Tanahashi a Zenk z buněčných kultur *Eschscholtzia californica* po aplikaci kvasinkoveho elicitoru[21], patogenního faktoru, který vyvolává obrannou reakci rostlinných buněk spojenou se zvýšenou biosyntézou KBA Zcela nedávno zjistili Nakanishi a Suzuki[22] na základě důkladných studií UV a NMR, že fagaridin[23] *(III)* má ve skutečnosti strukturu isofagaridinu[24] *(IV).* Latka *III* není považována za přírodní produkt.

Tabulka I
Chronologický přehled objevů KBA[a]

Alkaloid	Objev	Rostlinny druh
Sanguinarin	1827 Dana	*Sanguinaria canadensis*
Chelerythnn	1839 Probst	*Chehdomum majus*
Chelirubin	1954 Slavík	*Chehdomum majus*
Chelilutin	1954 Slavík	*Chehdomum majus*
Makarpm	1955 Slavík	*Macleaya microcarpa*
Avicin	1959 Arthur	*Zanthoxylum avicennae*
Nitidin	1959 Arthur	*Zanthoxylum nitidum*
Sanguirubin	1960 Slavík	*Sanguinana canadensis*
Sanguilutm	1960 Slavík	*Sanguinana canadensis*
Fagaromn	1972 Messmer et al	*Fagara zanthoxyloides*
Fagaridin	1973 Torto et al	*Fagara zanthoxyloides*
10(12)-Hydroxy-sanguinarin chelerythnn chelirubin	1990 Tanahashi, Zenk[21]	*Eschscholtzia californica*
Isofagaridin	1993 Fang et al[24]	*Zanthoxylum nitidum*

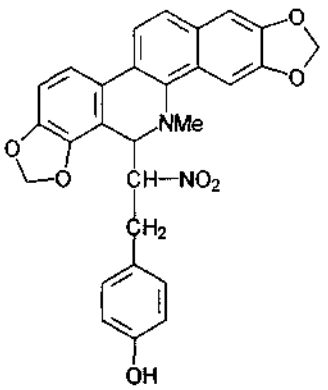
[a] Původní literatura do roku 1989 je uvedena v práci[15]

4. Izolace

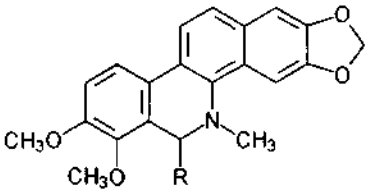
Obecný izolační postup k získání frakce KBA může být popsan následujícím způsobem Je typicky platný pro druhy s dominantním zastoupenim KBA (např *D lactucoides, S. canadensis).* Rostlinny materiál je extrahován methanolem za horka, surový extrakt je po zahuštění rozpuštěn ve zředěné sírové kyselině. Kyselý filtrát je alkalizován roztokem Na_2CO_3. Nelze použít NaOH, protože by došlo ke kontaminaci podílu bázemi kvartérních protoberberinů Vzniklá sraženina volných bází alkaloidů je extrahována etherem Organicka fáze je oddělena, odpařena a krystalována ze zředěné HC1. Chloridy KBA jsou v kyselem prostředí méně rozpustne než hydrochloridy ostatních, hlavně protopmových alkaloidů. Oddělená směs kvartérních chloridů je dále dělena kolonovou chromatografií na kyselém Al_2O_3 bud jako směs acetátů[3] nebo chloridů[11] Alternativním způsobem dělení KBA je preparativní chromatografie s nepolárním sorbentem a vodnou mobilní fází[21]. Tento postup nelze použít tam, kde jsou ve značné převaze alkaloidy tvořící téměř nerozpustný hydrochlond, např chelidonin v *Ch majus* Tam, i všude jinde kde jsou KBA v malém množství, je nezbytné k jejich oddělení použít např selektivní vysrážení kyanidovým aniontem[3,17]

5. Chemické přeměny

Základním chemickým rysem KBA je citlivost k nukleofilnímu ataku na iminiovou vazbu C=N$^+$ (schéma 1, Nu = nukleofil). Tento proces je spojen s řadou nápadných změn. Kvartérní kation alkaloidu je barevný a ve vodě rozpustný, vzniklý adukt s trojvazným atomem dusíku je bezbarvý a ve vodě nerozpustný V případě derivátů s charakterem aminoacetalů a aminalů (schéma 1, Nu = OR, NHR) je reakce v zásadě reverzibilní, tzn působenim kyseliny na adukt vznika opět barevná kvartérní sůl Jiné deriváty, např. 6-kyandihydrobenzofenanthridiny (schéma 1, Nu = CN), jsou naopak značně odolné vůči kyselinám. V literatuře je řada informací o těchto derivátech a okolnostech jejich vzniku, zejména o přeměnách s C-nukleofily (CN^-, Gngnardova činidla, nitromethan, aceton, butanon, acetaldehyd)[15]. Naproti tomu jsou minimální údaje o reakcích s kyslíkatými, sirnými a dusíkatými nukleofily Některé C-adukty byly izolovány z rostlin a představují zajímavé přírodní produkty Alkaloid nitrotyrasanguinarin *(XVI)* izolovaný z *Hypecoum imberbe* je jednou z mala přírodních mtrosloučemn[25] Předpokládá se, že vzniká oxygenací tyraminu a následnou adicí α-nitrokarbaniontu na iminiovou vazbu sanguinarinu (*I*) Z druhů *Zanthoxylum* bylo izolováno několik neobvyklých derivátů chelerythnnu s různou uhlíkatou funkcí v poloze 6 Alkaloidy 6-methyldihydrochelerythrin *(XVII)* a simulanochinolin

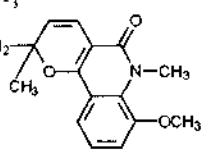


XVI



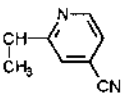
XVII R = CH_3

XVIII R =



XIX R = $CH_2CO(CH_2)_{10}CH_3$

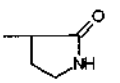
XX R =



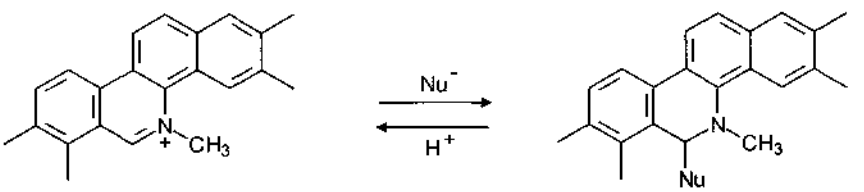
XXI R = CH_2COOH

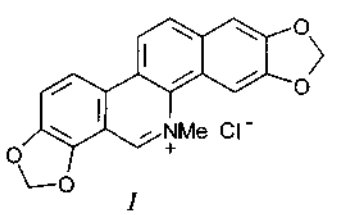
XXII R = $CH_2COCH_2CH(CH_3)_2$

XXIII R =

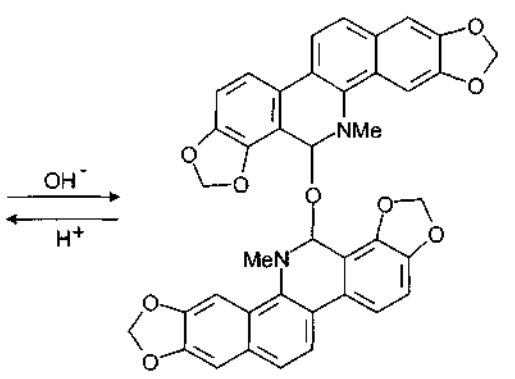


Schema 1





I



XXIV

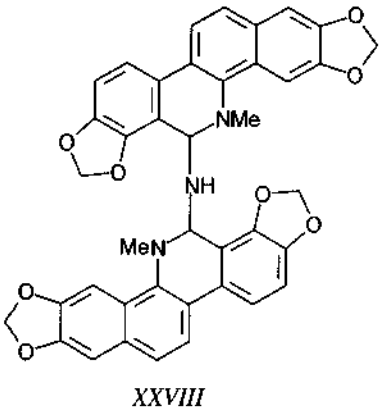
Schema 2

(XVIII) obsahujıcı 2-chmohnon byly nalezeny v Z *sımu lans*[26,27] Trıdekanonchelerythrın *(XIX)* byl ızolovanze Z *ınte grıfolium*[28] Aılanthoıdın *(XX)* ze Z *aılanthoides* obsahuje 4- -kyanpyrıdın[29] Zpracovanım kůry Z *spınosum* byly objeveny 6-karboxymethyldıhydrochelerythrın *(XXI),* 6-(4 methyl-2- -oxopentyl)dıhydrochelerythrın (*XXII*) a chelelaktam *(XXIII)* s navazanym 2-pyrrohdonem[30] Kromě toho byl zıskan dımer m alkaloid kajmandımerın, v němž jsou dve jednotky dı hydrochelerythrınu spojeny formylmethylenovou skupinou[30]

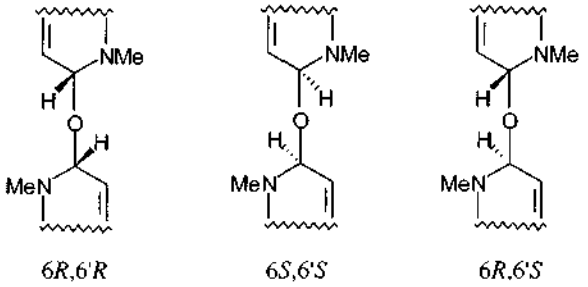
6. Struktura volných bází

Specifickou kapitolou v chemii KBA je tvorba volnych bazı Pojem volna baze (free base) je v chemii alkaloidů unıverzalně použıvan na označeni produktu bazickeho cha rakteru, ktery vznikl alkalızacı solı alkaloidu a v kyselem prostředı poskytuje opět sůl Citlivost na mıru alkalızace je dana hodnotou pK_A amonıove solı a zavısı na chemicke pova ze alkaloıdnı struktury Volne baze alkaloidů se nemohou vyskytovat v rostlınnych tkanıch pro jejich vice či meně kyselou reakci a proto je můžeme považovat za sveho druhu artefakty

Existuji dva způsoby jak pripravıt volne baze KBA *1)* Sůl KBA je rozpuštěna ve vodě a roztok je zalkalızovan Na_2CO_3 Bıla srazenına baze je oddělena, promyta vodou a sušena Tato metoda zaručuje velmi dobry vytěžek s mınımalnımı ztratamı, poskytuje však amorfnı produkt Předpokladem je vysoce čısta kvarternı sůl alkaloidu 2) Elegantnějšı alternativou je extrakce sraženıny baze do nepolarnıho rozpouštědla Používalı jsme přednostně dıethylether, možno použıt 1 benzen cı jına uhlovodıkova rozpouštědla Nevhodny je chloroform (zbytky kyselin rozkladajı bazı) či vyššı alkoholy (riziko chemickych přemen) Organicka faze je oddělena a zahuštěna ke krystalızacı V tomto případě jsou baze KBA zıskany jako bezbarvé krystaly s vyššı a ostřejšı teplotou tanı, ale vytěžekje zpravidla nıžšı než v prvnı metodě V některych případech jsme pozo rovalı vznik vedlejšıch produktů dosud nezjıštěne konstituce



XXVIII



6R,6'R *6S,6'S* *6R,6'S*

Schéma 3

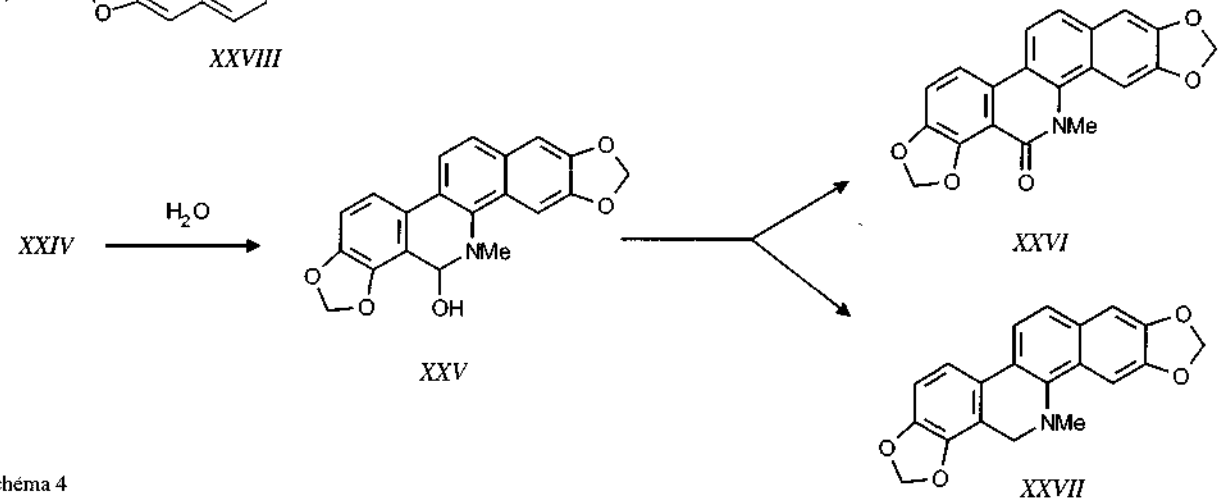


Schéma 4

Předpokládalo se, že volné báze KBA mají hydroxylovou skupinu kovalentně vázanou na atom 6 (schéma 1, Nu = OH), přestože experimentálně její přítomnost nebyla prokázána. Jde o cyklický semiaminoacetal, často nazývaný historickým termínem pseudobáze. Zjistili jsme, že báze sanguinarinu má konstituci bis(dihydrosanguinarinyl)etheru *(XXIV)* (schéma 2)[31]. V alkalickém prostředí dochází ke kondenzaci dvou molekul pseudobáze za uvolnění molekuly vody. Konstituce báze byla určena na základě hmotnostních spekter, elementární analýzy a NMR spektroskopie. NMR spektrum báze sanguinarinu ale poskytlo mnohem komplexnější obraz, neboť ve spektru bylo identifikováno 5 sloučenin: 7) majoritní stereoizomer dimerní báze *XXIV,* pravděpodobně racemát *6R,6'R* + *6S,6'S,* který je podle výpočtů AM1 termodynamicky preferován[32] a 2) minoritní izomer báze *XXIV, meso*-forma *6R,6'S* vzhledem k symetrické struktuře identická s 6*S*,6'*R*-izomerem (schéma 3). Další tři deriváty byly vedlejší produkty vzniklé v roztoku $CDCl_3$: *3)* 6-hydroxydihydrosanguinarin *(XXV)* jako důsledek hydrolýzy dimerního aminoacetalu *XXIV* vlivem zbytkové vody v $CDCl_3$. *4)* Oxosanguinarin *(XXVI)* a 5) dihydrosanguinarin *(XXVII)* byly produkty částečné disproporcionace pseudobáze *XXV* (schéma 4). Tvorba oxosanguinarinu a dihydrosanguinarinu byla prokázána v nezávislém experimentu[31], při kterém bylo složení alkalické reakční směsi monitorováno pomocí HPLC. Protože deriváty *XXVI* (laktam) a *XXVII* (substituovaný naftylamin) jsou nebazické alkaloidy, jsou snadno detegovatelné v silně kyselé mobilní fázi[31]. Disproporcionace heterocyklických pseudobází je jev obecně známý, popsaný i u jiných systémů[33,34]

6-Hydroxydihydrosanguinarin *(XXV)* byl nedávno popsán jako nový alkaloid z *Dactylicapnos torulosa*[35]. Autoři látku popisují jako amorfní prášek žluté barvy a uvádějí spektrální charakteristiky. Srovnání ^1H a ^{13}C NMR spekter s našimi údaji[31,36] ukazuje zřetelnou diskrepanci. Navíc se zdá nepravděpodobné, že by semiaminoacetal *XXV* mohl být izolován v intaktním stavu, když byla při izolaci použita 5 % HCl (cit.[35,37]).

Podobná konstituce volné báze jako u sanguinarinu byla zjištěna také u chelerythrinu[38], chelirubinu a chelilutinu[39]. V případě sanguilutinu *(VIII),* pentamethoxysubstituovaného alkaloidu, byla jako báze prokázána skutečná heterocyklická pseudobáze. Hydroxylová skupina byla potvrzena v IČ a ^1H NMR spektru[40]. Krystalizací této pseudobáze z benzenu byl získán monokrystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu. Po provedené analýze bylo zjištěno, že krystal byl racemický bis(dihydrosanguilutinyl)ether[40]. Nepolární prostředí tedy podporuje vznik méně polárního derivátu.

Studovali jsme také reakci sanguinarinu s koncentrovaným vodným amoniakem[31]. Vzniklá sraženina obsahuje směs dimerní báze *XXIV* a jejího dusíkatého analogu, bis(dihydrosanguinarinyl)aminu *(XXVIII)* v poměru cca 1:3 jako výsledek kompetice obou nukleofilů přítomných ve vodném NH_3. Krystalizace reakční směsi z etheru poskytla dimerní amin *XXVIII.* Elementární analýza potvrdila přítomnost tří atomů dusíku a skupina NH vykazovala diagnostický pás při 3372 cm^{-1} v IČ spektru[31]. Podobně reagovaly s vodným NH_3 i další studované KBA. Dimerní aminy (aminaly), stejně jako dimerní báze (aminoacetaly), poskytují se zředěnými

kyselinami okamžitě barevnou kvarterni sůl ve smyslu schematu 2

7. Biologická aktivita

Biologicka aktivita KBA je velmi různoroda Je třeba rozlišit skupinu sanguinarinu a skupinu nitidinu Sanguinarin (7) a chelerythnn (77) vykazuji zretelny antimikrobialni, antimykoticky, antiplakovy a protizanetlivy ucinek[41-43] Kombinace těchto aktivit je vyhodna zejmena pro stomatologicke aplikace v lecbe a prevenci zaněthvych onemocneni parodontu[44,45] Originalni cesky vyrobek SANTOIN (zubnipasta, ustni voda) obsahuje směs sanguinarinu a chelerythrinu z *Macleaya cordata* a je patentove chraneny[46] V Rusku je podobna směs pod nazvem SANGUIRITRIN užívana zevne jako antimikrobialni pripravek a vnitrne pn myopatiich a nasledcich obrny (inhibice acetylcholinesterasy)[47] Vhodnost peroralm aplikace těchto alkaloidů je problematicka vzhledem k prokazane hepatotoxicitě sanguinarinu[48] Podrobny přehled o interakcich sangumannu s enzymy a různymi typy bunek publikovaly Vavreckova a Ulnchova[49] Chelerythrin je v současne době studovan jako selektivni inhibitor protein kmasy C (cit [50-52]) Alkaloidy nitidin (V) a fagaromn *(VII)* vykazuji naproti tomu určite antileukemicke aktivity a nemaji účinky sanguinarinu[41,53,54]

LITERATURA

1 Krane B D , Fagbule M O , Shamma M , Gozler B J Nat Prod *47,* 1 (1984)
2 Simanek V , v knize *The Alkaloids* (Brossi A , ed), sv 26, str 185 Academic Press, New York 1985
3 Slavík J , Slavíkova L Collect Czech Chem Commun *25,* 1667 (1960)
4 Thorne E M , Boulware R T , Harkrader R J , Southard G L J Soc Cosmet Chem *37,* 279 (1986)
5 Taborska E , Bochořakova H , Paulova H , Dostal J Planta Med 60,380(1994)
6 Taborska E , Bochorakova H , Dostal J , Paulova H Cesk Farm *44,* 71(1995)
7 Slavík J Cesk Farm *4,* 15 (1955)
8 Bugatti C , Colombo M L , Tome F J Chromatogr *393,* 312(1987)
9 Tome F , Colombo M L Phytochemistry *40,* 37 (1995)
10 Slavík J , Slavíkova L Collect Czech Chem Commun *26,* 1839(1961)
11 Dostal J , Taborska E , Slavík J Fitoterapia *63, 61* (1992)
12 Bochorakova H , Paulova H , Dostal J , Musil P , Taborska E Poster na *46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research Viden 31 srpen - 4 zari 1998*
13 Slavík J , Slavíkova L Chem Listy *49,* 106 (1955)
14 Slavík J , Slavíkova L , Appelt J Collect Czech Chem Commun *30,* 887 (1965)
15 Dostal J , Potaček M Collect Czech Chem Commun *55,* 2840 (1990)
16 Dana J F NY Med Phys J 6,218(1827)
17 Gadamer J , Stichel A Arch Pharm *262,* 488 (1924)
18 Spath E , Kuffner F Ber Dtsch Chem Ges *64,* 370 (1931)
19 Spath E , Kuffner F Ber Dtsch Chem Ges *64,* 1123 (1931)
20 Slavík J , Slavíkova L Chem Listy *48,* 1382 (1954)
21 Tanahashi T , Zenk M H J Nat Prod *53,* 579 (1990)
22 Nakanishi T , Suzuki M J Nat Prod *61,* 1263 (1998)
23 Torto F G , Mensah I A , Baxter I Phytochemistry *12,* 2315(1973)
24 Fang S D , Wang L K , Hecht S M J Org Chem *58,* 5025 (1993)
25 Pabuççuoğlu V Arar G , Gozler T Freyer A J , Shamma M J Nat Prod 52,716(1989)
26 Chen I S , Wu S J , Tsai I L , Wu T S , Pezzuto J M , Lu M C , Chai H , Suh N , Teng C M J Nat Prod *57,* 1206(1994)
27 Wu S J , Chen I S Phytochemistry *34,* 1659 (1993)
28 Jen C M , Tsai I L , Horng D J , Chen I S J Nat Prod *56,* 2019 (1993)
29 Ishii H , Ishikawa T , Takeda S , Mihara M , Koyama K , Ogata K , Harayama T Chem Pharm Bull *39,* 1340 (1991)
30 Ng K M , Gray A I , Waterman P G Phytochemistry 26,3251 (1987)
31 Dostal J , Bochořakova H , Taborska E , Slavík J , Potaček M , Budešmsky M , de Hoffmann E J Nat Prod *59,* 599 (1996)
32 Marek R , Tousek J , Kralík L , Dostal J , Sklenar V Chem Lett 7997, 369
33 Bunting J W Adv Heterocycl Chem *25,* 1 (1979)
34 Dostal J , Potaček M , Nechvatal M Collect Czech Chem Commun *58,* 395 (1993)
35 Zhang G L , Rucker G , Breitmaier E , Nieger M , Mayer R , Steinbeck Ch Phytochemistry *40,* 299 (1995)
36 Dostal J , Marek R , Slavík J , Taborska E , Potaček M , Sklenař V Magn Reson Chem *36,* 869 (1998)
37 Rucker G , Breitmaier E , Zhang G L , Mayer R Phytochemistry *36,* 519 (1994)
38 Dostal J , Taborska E , Slavík J , Potaček M , de Hoffmann E J Nat Prod *58,* 723 (1995)
39 Dostal J , Slavík J , Potaček M , Marek R , Humpa O , Sklenar V , Tousek J , de Hoffmann E , Rozenberg R Collect Czech Chem Commun *63,* 1045 (1998)
40 Dostal J , Slavík J , Potaček M , Marek R , Sklenar V , de Hoffmann E , Rozenberg R , Tinant B , Declercq J P Phytochemistry *47,* 879 (1998)
41 Simeon S, Rios J L, Villar A Pharmazie *44,* 593 (1989)
42 Lenfeld J , Kroutil M , Maršalek E , Slavík J , Preininger V , Šimanek V Planta Med *43,* 161 (1981)
43 Sanguinaria Research New Perspectives (Symposium Report)J Can Dent Assoc 56(7), 1990, Supplement
44 Černa H , Vičar J , Eber M , Šimanek V LKS Cas Ces Stom Kom č 3, 24 (1994)
45 Walterova D , Ulnchova J , Valka I , Vičar J , Vavrečkova C , Taborska E , Harkrader R J , Meyer D L , Černa H , Šimanek V Acta Univ Palacki Olomuc , Fac Med 759,7(1995)
46 Šimanek V , Černa H , Vičar J , Jezdinsky J , Valka I CZ 279327

47. Maškovskij M. D., v knize: *Lekarstvennyje sredstva,* sv. 2, str. 420. Medicína, Moskva 1988.
48. Ulrichová J., Walterová D., Vavrečková C, Kamarád V., Šimánek V.: Phytother. Res. *10,* 220 (1996).
49. Vavrečková C., Ulrichová J.: Chem. Listy *88,* 238(1994).
50. Reshef A., Sperling O., Zorefshani E.: Neurosci. Lett. 238,37(1997).
51. Lasley R. D., Noble M. A., Mentzer R. M.: J. Mol. Cell. Cardiol. *29,* 3345 (1997).
52. Qiu Y. M., Ping P. P., Tang X. L., Manchikalapudi S., Rizvi A., Zhang J., Takano H., Wu W. J., Teschner S., Bolli R.: J. Clin. Invest. *101,* 2182 (1998).
53. Barret Y., Sauvaire Y.: Phytother. Res. *6,* 59 (1992).
54. Olugbade T. A., Waigh R. D.: Pharm. Sci. 2, 259 (1996).

J. Dostál and J. Slavík *(Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno):* **Recent Knowledge on Sanguinarine and Related Alkaloids**

Sanguinarine is a red quaternary benzo[*c*]phenanthridine alkaloid. The review covers basic information and recent facts on occurrence, isolation, chemical transformations, free base formation, and biological activities of sanguinarine and related alkaloids.

ANTIFUNGÁNE METABOLITY PRODUKOVANÉ MIKROMYCÉTAMI

KATARÍNA LEŠOVÁ a MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 16.II.1999

Kľúčové slová: antifungálne metabolity, antibiotiká, mikromycéty

Obsah

1. Úvod
2. Glykozidové antibiotiká
3. Peptidy a netypické aminokyseliny
4. Heterocyklické antibiotiká
5. Alicyklické antibiotiká
6. Aromatické antibiotiká
7. Alifatické antibiotiká
8. Záver

1. Úvod

Hľadanie a výskum nových antifungálnych terapeutík pokračuje rýchlym tempom vzhľadom na výrazné a rastúce potreby humánnej a veterinárnej medicíny. I keď systematické mykózy sú menej významné ako bakteriálne infekcie, počet fungálnych ochorení ohrozujúcich život v poslednom desaťročí ostro vzrástol vzhľadom na stúpajúci počet pacientov s oslabeným imunitným systémom. Fungálne infekcie sa stávajú čoraz viac bežnými v dôsledku rozšírenia AIDS, transplantácie orgánov a chemoterapie pacientov postihnutých rakovinovými ochoreniami[1]. Stúpol počet infekcií spôsobených druhmi *Candida sp., Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus sp.* Tiež dimorfické huby ako *Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis* a *Sporothrix schenckii* spôsobujú ochorenia ohrozujúce život.

Modifikácia existujúcich, objavenie a syntéza nových antifungálnych zlúčenín v pokusoch o produkciu účinných látok na liečbu množstva ľudských mykóz viedla k podstatnému nárastu v počte patentových aplikácií v poslednom období. Zahŕňajú výber procesov a aplikácií pre prírodné aj semisyntetické deriváty[2]. Ako uvádza Moehle[3], predpokladá sa, že v nasledujúcich štyroch rokoch bude výskum a aplikácia antifungálnych látok najrýchlejšie sa rozvíjajúcim odvetvím farmaceutického priemyslu.

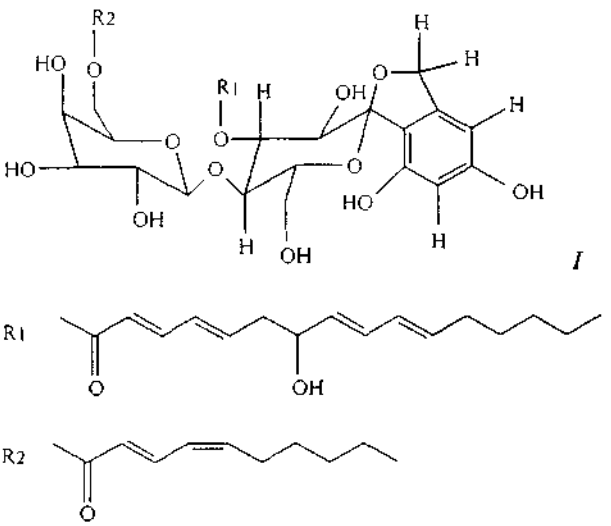
Mikroorganizmy sa osvedčili ako vynikajúci zdroj terapeuticky využiteľných látok pri rôznych humánnych a živočíšnych ochoreniach. Produkujú metabolity rozmanitých štruktúr a účinkov. Mnohé mikroorganizmy tvoria sekundárne metabolity v relatívne vysokom nadbytku, čo sa využíva na ich priemyselnú prípravu biotechnologickými postupmi.

Práca tvorí prehľad fungicídov izolovaných z mikromycét od roku 1994. Metabolity sú usporiadané podľa Bérdyho systému chemickej klasifikácie antibiotík.

2. Glykozidové antibiotiká

Vyskytujú sa ako čisté sacharidy, alebo ako pseudodi-, resp. trisacharidy, u ktorých sa uplatňujú kombinácie streptamínu, deoxystreptamínu a ich derivátov prírodných aminohexóz. Modifikácie základnej štruktúry sacharidov majú za následok zmenu antibiotických účinkov.

BE-29602 (*I*) produkovaný kmeňom F29602, patriacim do rodu *Fusarium* je členom triedy papulakandínov. BE-29602 vykazuje inhibičnú aktivitu voči niekoľkým kvasinkám ako *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* (MIC 1,56 resp. 0,39 $\mu g.ml^{-1}$). Tiež čiastočne inhibuje rast *Staphylococcus aureus* a *Trichophyton mentagrophytes* v koncentrácii 12,5 $\mu g\ ml^{-1}$. Účinok BE-29602, tak ako aj ostatných papulakandínov, je založený na inhibícii syntézy P-1,3-glukánu[4].



Corynecandín, antifungálny glykolipid kultúry *Coryneum modonium* sa zaraďuje sa do triedy papulakandínov. Ma podobnú antifungálnu aktivitu ako ostatné metabolity tejto triedy. Jeho účinok je tiež založený na mhibícn syntézy bunkovej steny. Obsahuje esterový reťazec v polohe C3, ktorý sa u iných glykolipidov nenachádza. Je to najmenší známy člen triedy papulakandínov s antifungálnou aktitvitou, ktorý inhibuje aktivitu glukánsyntázy[5].

Furanocandín, antifungálne antibiotikum z triedy papulakandínov bolo izolované z kmeňa *Trichotheciumsp.* Jeho MIC hodnoty pre *Candida albicans* (0,2 $\mu g\ ml^{-1}$) sú nižšie ako MIC hodnoty amfotericínu B (0,78 $\mu g.ml^{-1}$) (cit.[6]).

Fuskandín A a B sú antifungálne látky tiedy papulakandínov produkované kmeňom *Fusarium sambucinum*. Fuskandíny inhibujú rast *Candida albicans* prostredníc-

tvom inhibicie *beta*-1,3-glukan syntazy Fuskandin A je omnoho aktivnejši ako fuskandin B (MIC 3,12 μg ml ^{1}), je však menej aktivny ako amphotericin B a papulakandin B Nevykazuje vyznamnu antibakterialnu aktivitu[7] Fuskandin A je na dvoch miestach esterifikovany dlhym retazcom nenasytenych mastnych kyselin, na rozdiel od fuskandmu B, ktory obsahuje len jedno taketo miesto[8]

3. Peptidy a netypické aminokyseliny

Antibiotika tejto skupiny metabolitov su produkovane bakteriami, aktinomycetami a hubami Peptidove antibiotika reprezentuju velku skupinu metabolitov produkovanych najma streptomycetami Su všeobecne menšie ako proteiny a casto sa v nich vyskytuju aminokyseliny, ktore nenachadzame v proteinoch

Acicultin A-C su tri príbuzne peptidy produkovane hubou *Acicuhtesorientalis* Su tvorene bicyklickym peptidom, ktory obsahuje nezvyčajny histidin tyrozinovy mostík Lišia sa len v dlžke alkyloveho retazca dihydroxydienovej kyseliny Acicultiny su prve glykopeptidolipidy ziskane z morskeho zdroja Inhibuju rast *C albicans* a pôsobia cytotoxicky na ludske nadorove bunky HCT-116 Pre ich biologicku aktivitu je dôležity histidinovy zvyšok[9]

AFP je antifungalny protein zloženy z 51 aminokyselinovych zvyškov, produkovany hubou *Aspergillus giganteus* Pre jeho aktivitu je dôležity tyrozinovy zvyšok Je účinny na vlaknite huby, avšak nevykazuje žiadnu aktivitu na bakterie a kvasinky Minimalne inhibične koncentracie sa pohybuju v rozmedzi 6 až 25 μg ml ^{1} (cit [10])

Aureobazidiny su skupinou antifungalnych antibiotík produkovanych čiernou kvasinkou *Aureobasidium pullulans* Okrem hlavneho produktu, aureobazidinu A, ju tvori viac ako 20 štrukturne príbuznych latok a ich štruktura je charakterizovana ako cyklicky depsipeptid, tvoreny ôsmimi aminokyselinami, z ktorych su tri, alebo štyri metylovane a jedna je hydroxykyselina Bolo objavenych šest novych kongenerov, označenych ako AbT1-4, AbU1 a AbU2 Hodnoty MIC pre *C albicans* sa pohybuju v rozmedzi 0,0125 až 0,39 μg ml ^{1} Metabolity su tiež účinne voči *C glabrata, C kefyr, Cryptococcus neoformans* a *Saccharomyces cerevisiae*[11]

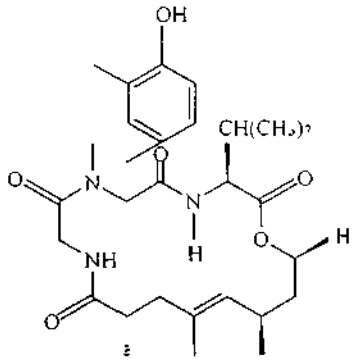
Bergofungin je produkovany kulturou *Emencellopsis donezkii* HKI 0059 Okrem neho kultura produkuje aj male množstvo jeho homologov lišiacich sa v zložení aminokyselin Je to linearny peptid obsahujuci 15 aminokyselin Antimikrobialna aktivita bola stanovena voči niektorym bakteriam a hubam platňovou difuznou metodou (priemer inhibičnej zony [mm] *Bacillussubtilis* 18, *Sporobolomycessalmonicolor* 23, *Penicillium notatum* 13)[12]

Gigantin je 17-kDa nbonukleaza produkovana kulturou *Aspergillus giganteus* IFO 5818 Je zložena z deviatich aminokyselin, podobne ako a sarcin, ribozom inaktivujuci protein izolovany z *A giganteus* MDH 18894 (cit [13])

Helioferin A a B su aminolipopeptidove antibiotika produkovane kulturou *Mycogone rosea* DSM 8822 Su to mediatory prenosu heliantatovych (metyloranz) aniónov z vodnej do organickej fazy Zmes helioferinov A a B 7 3 ma silnu antibaktenalnu a antifungalnu aktivitu Inhibuje rast *Candida albicans* (MIC 5 μg ml ^{1}), *Fusanum culmorum* (MIC 6,25 μg ml^{1}), *Penicilliumnotatum* (MIC 1,56 μg ml ^{1}) a *Rhodotorula rubra* (MIC 0,78 μg ml ^{1}) Antibakterialne pôsobi hlavne na G+ bakterie a mykobakterie Podobne ako u leucinostatinov, je ich účinok zalozeny na porušeni bunkoveho prenosu iónov a energetickeho metabolizmu[14]

Leucinostatin A je peptid produkovany kulturou *Acremonium sp ,* izolovanou ako endofyticka huba *Taxus baccata* Leucinostatin ma antifungalne, fytotoxicke a protinadorove vlastnosti Metabolit vyvolava rôzne nekroticke symptomy u nehostitelskych organizmov, avšak na *T baccata* nepôsobi To je spôsobene jeho glykozylaciou na leucinostatin A di-O-glukozid, ktory ma vyrazne nižšiu bioaktivitu ako pôvodny metabolit Z vysledkov vyplyva, že glykozylacia môže hrat vyznamnu rolu v obrane rastlin, najma pri ochoreniach spôsobenych toxinmi[15]

Neosiphoniamolid A *(II),* cyklodepsipeptid s antifungalnou aktivitou bol izolovany z morskej huby *Neosiphonia superstes* Obsahuje 12 uhlikatu hydroxykyselinu, glycin, valin a halogenovany tyrozinovy zvyšok v 18-člennom kruhu Je strukturne príbuzny s jaspamidom a geodiamolidmi Inhibuje rast *Pyricularia oryzae* a *Helminthosporiumgramineum*[16]

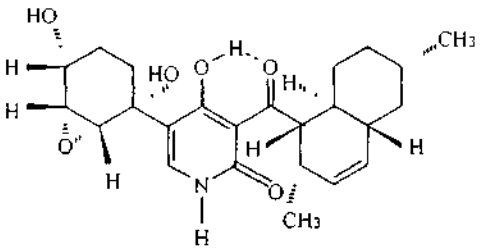


WF11899A, B a C su antifungalne lipopeptidove antibiotika izolovane z kultivačneho media *Coleophoma empetri* F-11899 Metabohty patria do skupiny echmokandmov Zluceniny su aktivne voči *Candida albicans* (IC_{50} 0,0004-0,03 μg ml ^{1}) Tiež mierne inhibuju rast *Aspergillus fumigatus* a *A niger* 1,3 *beta* glukansyntaza je inhibovana tymito metabolitmi s IC_{50} 0,7-1 8 (Xg ml ^{1} (cit [17])

4. Heterocyklické antibiotiká

Metabohty patriace k tejto skupine antibiotík tvoria pomerne heterogenne spektrum zlučenin obsahujucich dusík, alebo kyslik Ide najma o sekundarne metabohty hub a aktinomycet Najznamejšie spomedzi nich su nukleozidove antibiotika

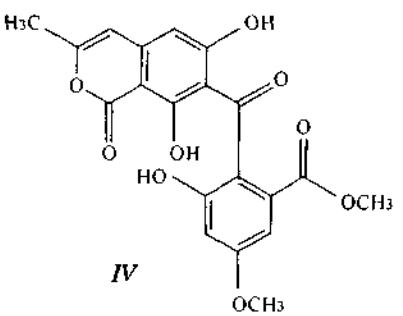
Apiosporamid *(III)* je antifungalny metabolit koprofilnej huby *Apiospora montagnei* izolovany spolu so znamy m dihydroxykumarinom *cis (3R, 4R)*-4-hydroxymelleinom Ma antifungalnu aktivitu voči koprofilnej hube *Ascobolus furfuraceus,* vykazujuc 58 % inhibiciu rastu v množstve 200 μg/disk Tvori tiež mhibične zony pri *Bacúlus subtihs* (32 mm) a *Staphylococcus aureus* (21 mm) v koncentracii 200 μg/disk Apiosporamid sa podoba na tenellin, metabolit patogénnej huby *Beauvena tenalla*[18]



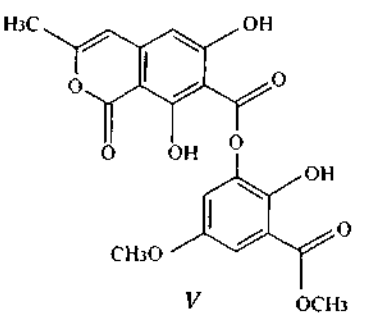
III

Benesudon - prvy sekundárny metabolit izolovaný z kultúry *Mollisia benesuada* má antibakteriálnu, antifungálnu, cytotoxickú a fytotoxickú aktivitu Citlivé sú ako G+, tak i G-bakténe (MIC v rozsahu 2,5-10 μg ml^{-1}) Najvyššia antifungálna aktivita bola zistena proti *Peacilomyces variotii* (MIC 1 μg ml^{-1}) Metabolit pôsobi inhibične aj na rast *Mucor miehei, Penicillium notatum, Rhodotorula glutinis* a *Nematospora coryli* (MIC 2,5-10 μg ml^{-1}) Štruktúra obsahuje reaktívnu α-metylénketónovú štruktúru, ktorá je pravdepodobne zodpovedná za jeho biologickú aktivitu[19]

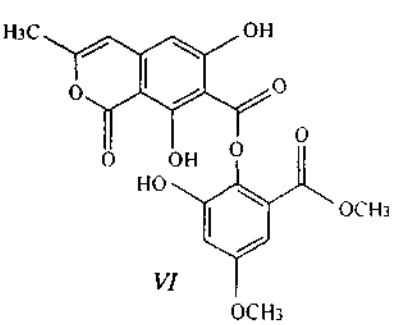
Cercophorin A-C *(IV, V, VI)* - tri izokumarínové deriváty s antifungálnou a cytotoxickou aktivitou boli izolované z koprofilnej huby *Cercophora areolata* UAMH 7495,



IV



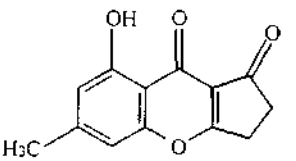
V



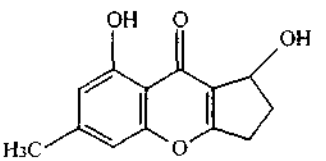
VI

tvoriacej kolónie na dikobrazom hnoji Z tohto kmeňa boli izolovane aj dalšie dva nové izokumariny, dekarboxycitrinon a 4-acetyl-8-hydroxy-6-metoxy-5-metylizokumarín, a známy mykotoxín roridin E Cercophoríny A-C inhibujú rast *Sordaria fumicola* a *Ascobolus furfuraceus* v koncentráciách 200 μg/disk (cit[20]).

Coniochaeton A a B *(VII, VIII)* sú dva cyklopentabenzopyrán-4-óny boli izolované z koprofilnej huby *Conwchaeta saccardoi* JS 223 Sú to prvé prírodné zlúčeniny s touto štruktúrou a tiež prvé sekundárne metabolity z kmeňov rodu *Coniochaeta.* Coniochaeton A tvorí 27 mm inhibičnú zónu rastu *Candida albicans* v koncentrácii 200 μg/disk (coniochaeton B 13 mm) Tiež 100 % redukuje rast koprofilných húb *Sordaria fimicola* a *Ascobolus furfuraceus* v koncentrácii 200 μg/disk (cit[21])

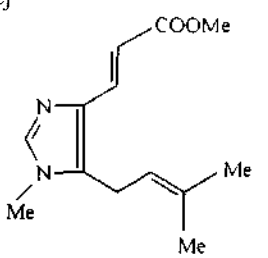


VII



VIII

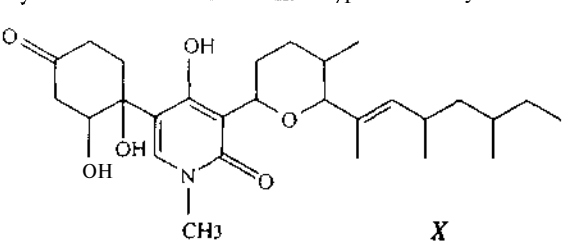
Fungerin *(IX)* je nový antifungálny alkaloid produkovany kmeňom *Fusarium sp* , ktorý bol získaný z pňa *Miscanthus sacchariflorus* Fungerin vykazuje antifungálnu, ale nie antibakteriálnu aktivitu MIC hodnoty pre *Penicillium chrysogenum, Colletotrichum langenarium, Alternana mali* a *Pyncularia oryzae* sú 12, 5, 25, 50, respektíve 50 μg ml^{-1} Na zaklade meraní bolo zistené, že ide o novy alkaloid 3-[1-metyl-5-(3-metyl-2-butenyl)-1*H*-imidazol-4/yl]2-metylester kyseliny propánovej[22]



IX

GR135402 - metabolit kultúry *Graphium putrendis*, ktorý inhibuje proteosyntézu u *Candida albicans* (IC_{50} 0,028 μg ml^{-1}) Spektrum aktivity zahŕňa okrem *Candida albicans* (MIC 0,008-0,03 μg ml^{-1}) aj *Cryptococcus neoformans* (MIC 1 μg.ml^{-1}), avšak žiadne iné druhy rodu *Candida* ani *Aspergillus*[23]

Oxysporidinon (*X*), nový 3,5-disubstituovaný N-metyl-4-hydroxy-2-pyndón bol izolovaný z kultivačného média *Fusarium oxysporum* Štruktúrne je príbuzný s antifungálnym metabolitom funikulozínom, produkovaným kultúrou



X

Penicillium funiculosum Patria do skupiny fungalnych sekundárnych metabolitov, obsahujúcich 4-hydroxy-2-pyridónovy chromofór Do tejto skupiny patria tennelin a bassianin z *Beauveria tenella* a *B bassiana*, ilicicolin H z *Cylindrocladium ilicicola*, harzianopyridon z *Trichodermaharzianum*, leponn A z *Aspergillusleporis*, fischerin z *Neosartorya fischeria* apiosporamid z *Apiospora montagnei* Oxysporidinon inhibuje rast fytopatogénnych húb *Aspergillusniger*, *Botrytis cinerea*, *Alternariaalternata* a *Ventuna inequalis* (MIC 10, 1, 50 resp 10 μg ml^{-1}) V koncentrácii 1 mg.ml^{-1} bol neúčinný proti kvasinkam a baktériam[24]

P r e n i s a t i n - metabolit izolovany zo submerznej kultivacie kultúry *Chaetomiumglobosum* Štruktúra bola určená ako 5-(3-metyl-2-butenyl)-indol-2,3-dión. Prenistatín v *in vitro* podmienkach inhibuje rast *Botrytis cinerea*[25]

P t e r u l o n je spolu s kyselinou pterulónovou produkovany kultúrou *Pterula sp* 82168 Obidve zlúčeniny majú vyraznú antifungálnu a slabú, resp žiadnu cytotoxicku aktivitu Kyselina pterulonová je asi 10 krát aktívnejšia ako pterulon Jej hodnoty MIC sa pohybuju v rozmedzí 25-100 μg ml^{-1} pre *Fusarium oxysporum*, *Mucor miehei*, *Peacilomyces variotii*, *Penicillium notatum*, *Rhodotorula glutinis* a *Nadsonia fulvescens* Ich účinok je založeny na inhibicii NADH ubiquinon oxidoreduktázy[26]

S q u a l e s t a t i n y sú tri štrukturalne príbuzné selektívne inhibítory squalénsyntazy produkované kulturou *Phoma sp* C2932 Metabohty inhibuju ako fungálnu, tak aj cicavčiu squalénsyntázu Majú široké spektrum antifungálnej aktivity[27] Ide o 4,6,7-trihydroxy-2,8-dioxybicyklo-oktan-3,4,5-trikarboxylové kyseliny[28] Štúdie ukazujú, že zaklad molekuly je vytvorený z dvoch polyketidovych reťazcov, zložených z acetátových jednotiek[29].

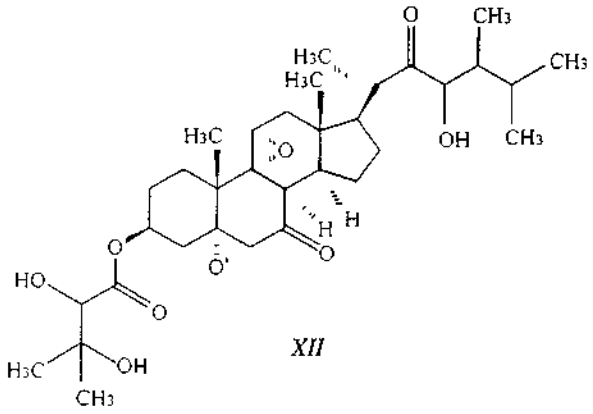
5. **Alicyklické** antibiotiká

Najznámejšou skupinou cykloalkanových derivátov sú glutarimidové antibiotiká Charakteristickou črtou tychto metabohtov je glutárimidový kruh Sú produkované hlavne streptomycetami. Ich mechanizmus účinku je zvyčajne založeny na inhibícii proteosyntézy.

A s c o s t e r o s i d *(XI)* - nová antifungálna zlučenina izolovaná z kultivačného media *Ascotricha amphitricha* Inhibuje rast kvasiniek a vláknitých húb *(Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *C tropicalis*, *C glabrata, Trichophyton mentagrophytes* MIC 14-21 μg ml^{-1}), avšak nema vplyv na rast baktérii Na cicavčie bunky nepôsobí cytotoxicky do koncentrácie 150 μmol l^{-1} (cit [30]) Študie štruktury ukázali, že ide o glykozylovaný C_{30} tetracyklický triterpén s lanostanovým jadrom Metylester ascosterosidu mal omnoho nižšiu antifungálnu aktivitu oproti pôvodnému metabolitu, z čoho možno usudzovat, že pre antibiotickú aktivitu je dôležitá karboxylová skupina[31]

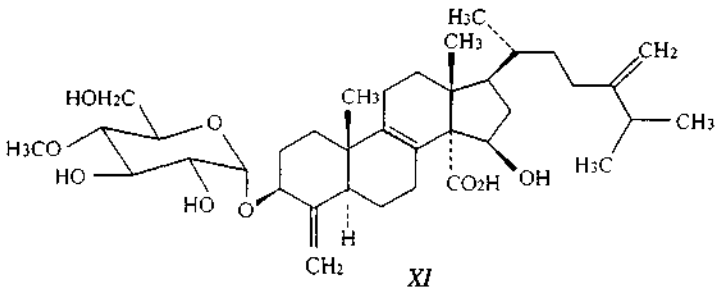
A u s t r a l i f u n g i n – metaboht s antifungálnou aktivitou bol izolovany z kultivačného média kultury *Sporomiella australis* spolu s príbuzným derivátom s nižšou aktivitou Štruktúra obsahuje nezvyčajnú kombináciu α-diketónovej a β-ketoaldehydickej funkčnej skupiny Latka má široké spektrum antifungalnej aktivity Pôsobi proti viacerým patogénnym hubam ako *Candida spp , Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus spp* (MIC 0,015-1 μg ml^{-1}) Predpokladaný spôsob účinku je interferencia s fungálnym metabolizmom lipidov, konkrétne inhibícia premeny sfinganínu na ceramid v syntéze sfingolipidu[32]

F a v o l o n *(XII)* je nový antifungálny triterpenoid izolovaný z etiópskej huby *Favolaschiasp* Táto je tiež producentom už skôr izolovaných metabohtov s antifungalnou aktivitou, a to oudemansmu, strobilurinu A a B a ich derivátov Favolon bol detegovany len v mycéliu Vykazuje inhibičnú aktivitu voči askomycétam, bazidiomycétam, oomycétam a zygomycetam, avšak nebola detegovana žiadna antibakteriálna ani cytotoxická aktivita[33]

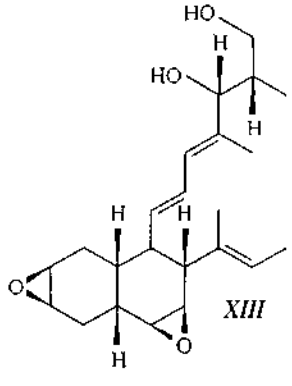


XII

F u s a r i e l i n A *(XIII)* spolu s troma príbuznymi zlúčeninami fusarielinom B, C a D bol získaný z kmeňa *Fusarium sp* Biogeneticky je to pentametylovaný dekaketid Vykazuje antifungálnu aktivitu voči *Aspergillus fumigatus, Alternana kikuchiana, Colletotrichumlindemuthianum, Fusanum nivale* a *Pynculana oryzae* s MIC hodnotami v rozmedzí 3,1 až 50 μg ml^{-1} Učinok týchto látok je založený na interferencii s funkciou mikrotubulov[34]

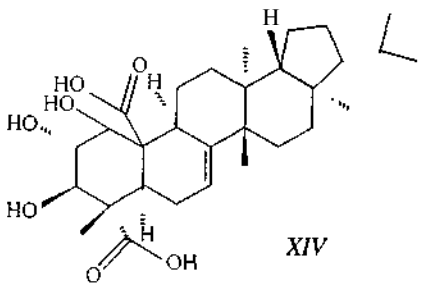


XI



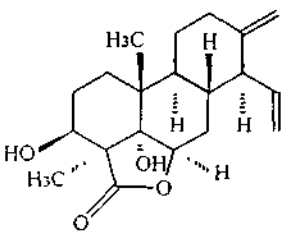
XIII

P o l y t o l y p i n *(XIV)* - pentacyklicky triterpenoid vykazujúci antifungálnu a antibiotickú aktivitu bol izolovaný z kultúry *Polytolypa hystricis,* huby rastucej na dikobrazom truse Metaboht vykazuje antifungálnu aktivitu voči koprofilnej hube *Ascobolus furfuraceus* Je tiež aktívny voči *Candida albicans* Štruktúra je velmi podobna kyseline retigerovej, metabolitu izolovanemu z *Lobariaretigera*[35]

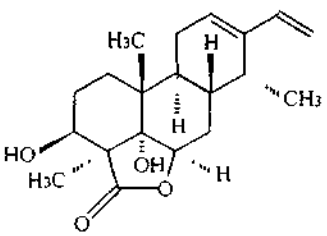


XIV

S o n o m o l i d A a B *(XV, XVI)* - nové širokospektrálne antifungálne metabolity neidentifikovanej koprofilnej huby Obe zlúčeniny sú aktívne proti viacerým fungalnym patogénom ako *Candida albicans* (MIC 8 μg ml ^{1}), *Cryptococcus neoformans* (MIC 0,25 μg ml ^{1}) a *Aspergillusfumigatus* (MIC 8 resp 4 μg ml ^{1}) Ani jeden z metabolitov nemá antibakteriálnu aktivitu Sonomolidy sú prvé známe diterpény s antifungálnou aktivitou[36]



XV



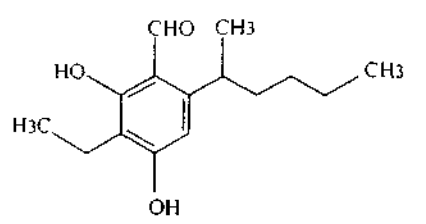
XVI

6. Aromatické antibiotiká

Aromatické sekundarne metabohty tvoria skupinu látok s veľmi pestrou štruktúrou Patria sem monocyklické deriváty benzénu, alebo kondenzované aromatické zlučeniny s postrannými reťazcami, prevažne alifatickými.

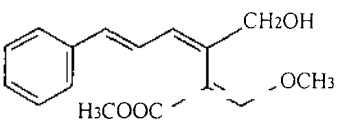
A n g u i l l o s p o r a l *(XVII),* antifungalny a antibakteriálny metaboht bol izolovaný zo sladkovodnej huby *Anguíllospora longissima* Je to 2,4-dihydroxy-3-etyl-6-(1-metylpentyl)-benzaldehyd polyketidoveho pôvodu Hodnoty MIC sú 4 μg ml"^{1} pre *S aureus* a 58 μg ml ^{1} pre *C albicans?*[1]

A n t a f u m i c í n A a B – dva antimikrobiálne metabolity kultúry *Aspergúlus niger, trans-* resp *cis*-4-(3-acetyl--2,6-dihydroxyfenyl)-2-metoxy-4-butanolid Zmes antafumicínov A a B v pomere 1 1 pridaná do kultivačného média v koncentrácii 100 ppm úplne inhibuje germináciu spór *Colletotrichum lagenarium, Pyricularia oryzae, Fusarium oxysporum* a *Botrytis cinerea* V koncentrácii 50 p.p.m zmes inhibuje na 50 % tiež rast *Bacillussubtilis, Escherichia coli* a *Aeromonas liquefaciens*[38]



XVII

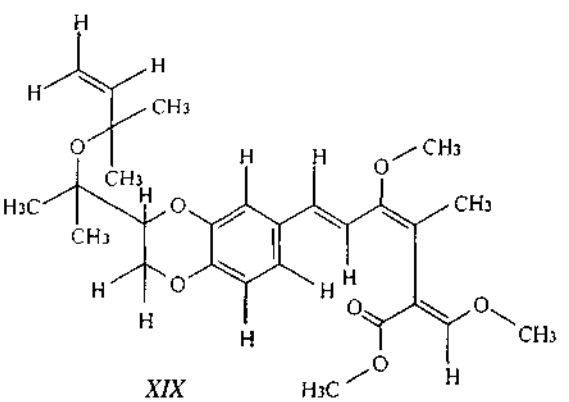
H y d r o x y s t r o b i l u r i n A *(XVIII),* antifungálny E--β-methoxyakrylátbol izolovaný z kultúry *Pterula sp* Ten istý kmeň produkuje aj strobilurin A a oudemansin A V porovnaní so strobilurinom A vykazuje hydroxystrobilurin A nižšiu antifungalnu aktivitu Hydroxystrobilurin A inhibuje väčšinu vlaknitých húb a kvasiniek v množstve 1 až 10 μg/disk Nekompletné inhibične zóny boli pozorované pri *Saccharomycescerevisiae* a mych hubach Zatiaľ čo povrchovy aeróbny rast bol kompletne inhibovaný, slabší anaeróbny rast bol stále možny Hydroxystrobilurin A nevykazuje žiadnu antibakteriálnu aktivitu[39]



XVIII

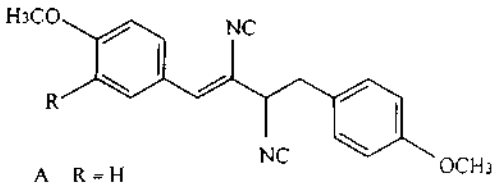
K l a d o s p o r í n b i s e p o x i d jenový metaboht kultúry, charakterizovanej na základe tvorby piknídií ako coelomycéta Vykazuje selektívnu antibiotickú aktivitu proti viacerým baktériám *(Bacúlus subtilis, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Pseudomonasaeruginosa),* hubám *(Mucor miehei, Pynculana oryzae, Botrytis cinerea, Candida albicans)* a inhibuje germináciu *Lepidium sativum* vo veľmi nizkych koncentráciách[40]

9 - M e t o x y s t r o b i l u r i n L *(XIX),* nový derivat metoxystrobilurinu bol izolovaný spolu s ďalším derivatom 9--metoxystrobilurinom E a derivatom oudemansmu z kultivačného media huby *Favolaschiapustulosa* X27732 Pôsobí cytotoxicky na ludské B lymfoblastoidy (IC_{50} 1,8 nmol.l ^{1}) Má tiež antibakteriálnu *(Bacúlus subtúis* MIC 0,9 μmol l^{1}) a antifungálnu aktivitu *(Candida albicans* MIC 6 μmol.l ')[41]



XIX

N K 3 7 2 1 3 5 A , B A C *(XX)* nové antifungálne metabohty produkovane kmeňom *Neosartorya fischeri* var *glabrata* Pre vysoku aktivitu voči rodu *Candida* je nutná hydrogénovaná štruktura na vazbe C2-C3. Metabohty



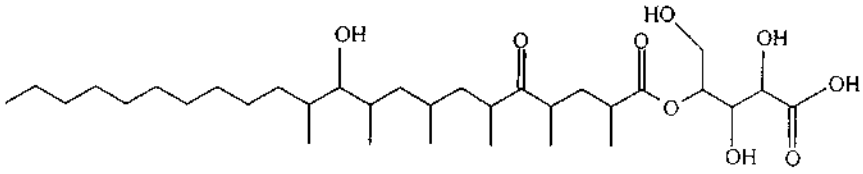
XX

NK372135B a C majú pre *C. albicans* nižšie hodnoty IC_{50} ako nystatín. Sú tiež účinné voči niektorým hubám, ako *Cryptococcus neoformans*[42].

7. Alifatické antibiotiká

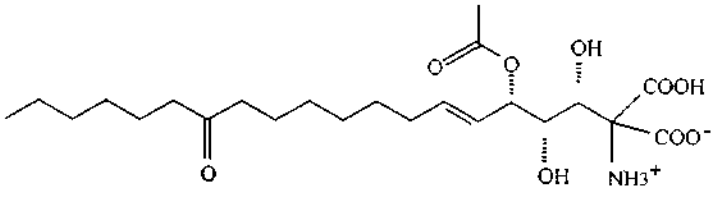
Medzi alifatické antibiotiká sa zaraďujú polyíny, ktoré tvoria ucelenú skupinu derivátov alkánov. Zaraďujeme sem tiež deriváty alifatických karboxylových kyselín a niektoré antibiotiká izolované z vyšších rastlín.

Khafrefungín *(XXI)* je nový inhibítor syntézy sfingolipidu izolovaný z neidentifikovanej endofytickej huby. Metabolit inhibuje rast mnohých kvasiniek a vláknitých húb (*Candida albicans, Cryptococcus neoformans* a *Saccharomyces cerevisiae* MIC 2,2 a 15,6 μg ml^{-1}). Rast *Aspergillus fumigatus* nebol ovplyvnený do koncentrácie 250 μg ml^{-1}. Khafrefungin inhibuje špecificky inkorporáciu inozitolu do sfingolipidov u húb a kvasiniek a neovplyvňuje biosyntézu sfingolipidov cicavčími bunkami. V *in vitro* podmienkach inhibuje inozitolfosfoceramidsyntázu s IC_{50} 0,6 nmol.l^{-1} (cit.[43]).



XXI

Malonofungín (*XXII*) je antifungálny metabolit kultúry *Phaeoramularia fusimaculans* CBS 616.87. Na základe štruktúry sa zaraďuje do skupiny prírodne sa vyskytujúcich aminomalónových kyselín. Inhibuje rast *Botrytis cinerea* a iných fytopatogénov patriacich do rodov *Botrytis, Pyricularia, Fusarium a Penicillium*[44].



XXII

Viridofungíny sú skupinou aminoacyl-alkyl citrátových zlúčenín produkovaných kultúrou *Trichodermaviride*. Metabolity majú široké spektrum antifungálnej aktivity *(Aspergillus flavus, A. fumigatus, Cryptococcus neoformans, Candida tropicalis, C. albicans* a C. parapsilosis MIC 2–32 μg.ml^{-1}), avšak nízku antibakteriálnu aktivitu[45]. Sú účinnými inhibítormi squalénsyntetázy, avšak ich antifungálny účinok nie je založený na inhibícii syntézy ergosterolu[46].

8. Záver

Značný nárast počtu pacientov s ochorením AIDS a inými formami oslabenia imunitného systému viedol v mnohých oblastiach k rozšíreniu húb ako predommantných patogénov.

S rozšírením používania antifungálnych látok na potlačenie týchto infekcii, objavil sa i fenomén rezistencie patogénnych kmeňov na dané antibiotiká. A tak i keď k liečbe fungálnych ochorení je k dispozícii množstvo látok, neustale narastá počet infekcií a kmeňov rezistentných na používané liečivá. Stále neexistuje látka, ktorá by vyhovovala potrebám širokého spektra účinku a bola súčasne bezpečna a efektívna pri orálnom, resp. parenterálnom užití. Z tychto dôvodov je výskum a hľadanie nových antifungálnych látok stale sa prudko rozvíjajúcou oblasťou. Pozornosť sa sústreduje na prírodné látky, ktoré môžu byť následne modifikované chemickou cestou a tým zvýšená ich účinnosť a stabilita. Okrem mikrobiálnych metabolitov, tiež prírodne produkty s antifungálnymi vlastnosťami izolované z iných zdrojov, ako sú napr. rastliny a morské organizmy, sa môžu stať významnými v boji s fungálnymi ochoreniami.

LITERATÚRA

1. Balkovec J. M.: Exp. Opin. Invest. Drugs *3,* 65 (1994).
2. Hector R. F.: Exp. Opin. Ther. Patents 5, 157 (1995).
3. Moehle Ch. M. Exp. Opin. Ther. Patents *6,* 129 (1996).
4. Okada H., Nagashima M., Suzuki H., Nakajima S., Kijiri K., Suda H.: J. Antibiot. *49,* 103 (1996).
5. Guanawardana G., Rasmussen R. R., Scherr M., Frost D., Brandt K. D., Choi W., Jackson M., Karwowski J. P., Sunga G., Malmberg L-H., West P., Chen R. H., Kadam S., Clement J. J., Mcalpine J. B.: J. Antibiot. 50, 884 (1997).
6. Magome E., Hanmaya K., Gomi S., Koyama M., Chiba N., Ota K., Mikawa T. J. Antibiot. *49,* 599 (1996).
7. Jackson M., Frost D. J., Karwowski J. P., Humphrey P.

E , Dahod S K , Choi W S , Brandt K , Malmberg L H , Rasmussen R R , Scherr M H J Antibiot *48*, 608 (1995)
8 Hochlowski J E , Whittern D N , Buko A Alder L , Mcalpine J B J Antibiot *48*, 614 (1995)
9 Bewley C A , He H , Williams D H , Faulkner D J J Am Chem Soc *118*, 4314 (1996)
10 Lacadena J , Martinez Del Pozo A , Gasset M , Patino B , Campos-Olivas R , Vazquez C , Martinez-Ruiz A , Man cheno J M , Onaderra M , Gavilanes J G Arch Biochem Biophys *324*, 273 (1995)
11 Awazu N , Ikai K , Yamamoto J , Nishimura K , Mizutani S , Takesako K , Kato I J Antibiot *48*, 525 (1995)
12 Berg A , Rityau M , Ihn W , Schlegel B , Fleck W F , Heinze S , Grafe U J Antibiot *49*, 817 (1996)
13 Wirth J , Martinez Del Pozo A , Mancheno J M , Martinez-Ruiz A , Lacadena J , Onaderra M , Gavilanes J G Arch Biochem Biophys *343*, 188 (1997)
14 Grafe U , Ihn W , Ritzau M , Schade W , Stengel C , Schlegel B , Fleck W F , Kunkel W , Haiti A , Gutsche W J Antibiot *49*, 126 (1995)
15 Strobel G A , Hess W M Chem Biol *4*, 529 (1997)
16 D'Auria M V , Paloma L G , Minale L , Zampella A J Nat Prod *58*, 121 (1995)
17 Iwamoto T , Uji e A , Nitta K , Hashimoto S , Okuhara M , Kohsaka M J Antibiot *47*, 1092 (1994)
18 Alfatafta A A , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J Nat Prod *57*, 1696(1994)
19 Thines E , Arendholz W R , Anke H , Sterner O J Antibiot *50*, 13 (1997)
20 Whyte A C , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J Nat Prod *59*, 765 (1996)
21 Wang H J , Gloer J B , Scott J A , Malloch D Tetra hedronLett *36*, 5847 (1995)
22 Kato Y , Koshino H , Uzawa J , Anzai K Biosci Biotech Biochem *60*, 2081 (1996)
23 Kinsman O S , Chalk P A , Jackson H C , Middleton R F , Shuttleworth A , Rudd B A , Jones C A , Noble H M , Wildman H G , Dawson M J , Stylli C , Sidebottom P J , Lamont B , Lynn S , Hayes M V J Antibiot 57, 41 (1998)
24 Breinhold J , Ludvigsen S , Rassing B R , Rosendahl C N , Nielsen S E , Olsen C E J Nat Prod *60*, 33 (1997)
25 Breinholt J , Demuth H , Heide M , Jensen G W , Moller I L , Nielsen R I , Olsen C E , Rosendahl C N Acta Chem Scand *50*, 443 (1996)
26 Engler M , Anke T , Sterner O , Brandt U J Antibiot *50*, 325 (1997)
27 Dawson M J , Farthing J E , Marshal P S , Middleton R F , O'Neill M J , Shuttleworth A , Stylh C , Tait R M , Taylor P M , Wildman H G J Antibiot *45*, 639 (1992)
28 Siddebottom P J , Highcock R M , Lane S J , Procopiou P A , Watson N S J Antibiot *45*, 648 (1992)
29 Jones C A , Sidebottom P J , Cannel R J P , Noble D , Rudd B A M J Antibiot *45*, 1492(1992)
30 Gorman J A , Chang L P , Clark J , Gustavson D R , Lam K S , Mamber S W , Pirnik D , Ricca C , Fernendes P B , O'Sullivan J J Antibiot *49*, 547 (1996)
31 Leet J E , Huang S , Klohr S E , Mcbnen K D J Antibiot *49*, 553 (1996)
32 Mandala S M , Thornton R A , Frommer B R , Curotto J E , Rozdilsky W , Kurtz M B , Giacobbe R A , Bills G F , Cabello M A , Martin I J Antibiot *48*, 349 (1995)
33 Anke T , Werle A , Zapf S J Antibiot *48*, 725 (1995)
34 Kobayashi H , Sunaga R , Funhata K , Morisaki N , Iwasaki S J Antibiot *48*, 42 (1995)
35 Gamble W R , Gloer J B , Scott J A , Malloch D J Nat Prod *58*, 1983 (1995)
36 Morns S A , Curroto J E , Zink D L , Dreinkorn S , Jenkins R , Bills G F , Thompson J R , Vicente F , Basilio A , Liesch J M , Schwrtz R E Tetrahedron Lett *36*, 9101 (1995)
37 Harngan G G , Armentrout B L , Gloer J B , Shearer C A J Nat Prod *58*, 1467 (1995)
38 Fujimoto Y , Miygawa H , Tsurushima T , Irie H , Okamura K , Ueno T Biosci Biotechnol Biochem *57*, 1222 (1993)
39 Engler M , Anke T J Antibiot *48*, 884 (1995)
40 Petersen F , Moerker T , Vanzanella F , Peter H H J Antibiot *47*, 1098 (1994)
41 Wood K A , Kau D A , Wngley S K , Beneyto R , Renno D V , Ainsworth A M , Penn J , Hill D , Killacky J , Depledge P J Nat Prod *59*, 646 (1996)
42 Monno T , Nishimoto M , Itou N , Nishikiori T J Antibiot *47*, 1546 (1994)
43 Mandala S M , Thornton R A , Rosenbach M , Milligan J , Garcia-Calvo M , Bull H G , Kurtz M B J Biol Chem 272,32709(1997)
44 Berova N , Breinholt J , Jensen G W , Kjaer A , Lo L Ch , Nakanishi K , Nielsen R I , Olsen C E , Pedersen Ch , Stidsen C E Acta Chem Scand *48*, 240 (1994)
45 Onishi J C , Milhgan J A , Basiho A , Bergstrom J , Curroto J , Huang L , Meinz M , Nallin-Omstead M , Pelaez F , Rew, D , Salvatore M , Thompson J , Vicente F, Kurtz M B J Antibiot 50,334(1997)
46 Mandala S M , Thornton R A , Frommer B R , Dreikon S , Kurtz M B J Antibiot 50, 339 (1997)

K. Lešová and M. Šturdíková *(Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic)* **Antifungal Metabolites Produced by Micromycetes**

The number of new antifungal compounds is steadily growing due to the increase in the number of diseases associated with the impairment of the immunity system and the resulting spreading of fungi as predominant pathogens The paper surveys fungicides isolated from micromycetes since 1994 The metabolites are arranged according to the Berdy system of chemical classification of antibiotics The metabolites described are representatives of glycoside antibiotics, peptides and non-typical amino acids as well as heterocyclic, alicyclic, aromatic and aliphatic antibiotics The classes of peptides, non-typical amino acids and heterocychc antibiotics are most frequent The substances in classes are briefly characterized from the viewpoint of their structure, antifungal properties and production microorganisms Total 38 micromycetes metabolites with fungicide properties are described Search and research of new antifungal therapeutics rapidly continues satisfying the pronounced and growing needs of human and veterinary medicine The paper provides a brief survey of these substances with their basic characteristics

MIKROBIÁLNA PRODUKCIA FAREBNÝCH AZAFILÓNOVÝCH METABOLITOV

MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ, DUŠAN SLUGEŇ, KATARÍNA LEŠOVÁ a MICHAL ROSENBERG

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: sturdiko@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 14.XII.1998

Kľúčové slová: huby, metabolity, pigmenty, azafilóny

Obsah

1. Úvod
2. Azafilóny
   2.1. Monaskové pigmenty
   2.2. Mitorubrín, mitorubrinol, kyselina mitorubrínová
   2.3. Falkonenzíny
   2.4. Chaetoviridíny
   2.5. Kyselina lunatová
   2.6. Wortmin
   2.7. Austdiol
   2.8. Rubrorotirín
   2.9. Luteusíny
   2.10. Izochromofilóny
3. Záver

1. Úvod

Fungálne sekundárne metabolity s pyráno-chinónovou štruktúrou sa nazývajú azafilóny. Pomenovanie získali podľa ich citlivej reakcie s amoniakom za vzniku γ-pyridónových derivátov. Metabolity v médiu ochotne reagujú s látkami, ktoré obsahujú amino skupiny ako sú proteíny, aminokyseliny a nukleové kyseliny za tvorby vo vode rozpustných farebných produktov. Najviac sa cení ich prírodný pôvod, žlto-červené spektrum a termostabilita.

Známych je viac než 20 farebných metabolitov. Boli identifikované z rôznych vláknitých húb, takže mikroorganizmy by mohli byť užitočným zdrojom novej skupiny potravinársky použiteľných pigmentov prírodného pôvodu. Spomedzi testovaných mikroorganizmov len rody *Monascus*, *Penicillium* a *Chaetomium* sú známe ako dobrí producenti pigmentov s azafilónovým skeletom. Niektoré štruktúry sa identifikovali tiež u *Aspergillus ustus*, *Cochliobolus lunata*, *Talaromyces sp.* a *Emericella falconensis*. Prírodný pôvod azafilónových pigmentov a ľahko uskutočniteľná derivatizácia spolu so zvýšenou termostabilitou v porovnaní s inými prírodnými farbivami červenej oblasti spektra otvárajú nové možnosti ich aplikácií v potravinárstve a kozmetike.

2. Azafilóny

Azafilóny, nie veľmi známe pomenovanie veľkej skupiny pyráno-chinónových štruktúr s vysokou tenziou akceptorov elektrónov podmieňujúcich citlivosť kyslíka v primárnom kruhu za tvorby stabilných γ-pyridónov (obr. 1), majú chromofórové vlastnosti v O i N-R^3 forme. Farba azafilónových pigmentov závisí od štruktúr.

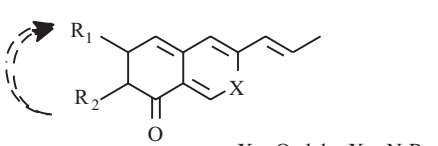
Pre väčšinu z nich sú absorpčné maximá v oblasti viditeľného spektra (400 nm pre žlté a asi 500 nm pre červené pigmenty). Vo všeobecnosti však platí, že žlté štruktúry sú viac hydrogenované než oranžové a červené, aminoformy majú zvyčajne maximá pri väčších vlnových dĺžkach absorpčného spektra.

Vláknité huby sú schopné za vhodných kultivačných podmienok syntetizovať pomerne širokú paletu azafilónov. Stručný prehľad štruktúr azafilónov izolovaných z mycélia a kultivačného média je na obr. 2.

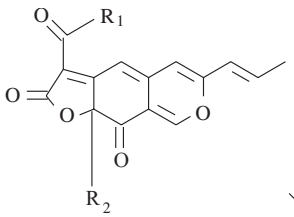
Niektoré z týchto fungálnych metabolitov sa používali ako farbiace aditíva do potravín a alkoholických kvasných nápojov v Ázii a Amerike. Záznamy o používaní monaskových pigmentov v potravinách a prírodnej medicíne sú od prehistorického obdobia. Je snaha nahradiť syntetické pigmenty v potravinách i v krajinách Európskej únie. Známe sú patenty zamerané na použitie monaskových pigmentov pre potraviny v Japonsku, USA, Francúzsku a Nemecku[1,2].

Rýchlo sa rozširuje ich aplikácia do potravín, ako prifarbovanie mäsových výrobkov (salámy a šunka), morských produktov (rybia pasta) a rajčinového kečupu[1]. Farebné metabolity *Monascus* nie sú známe ako azafilóny, ale ako monaskové pigmenty alebo častejšie pod názvom červená ryža.

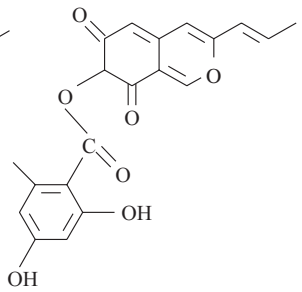
Problematike biologickej aktivity azafilónových metabolitov je doposiaľ venovaných málo prác. Poznatky o účinnosti monaskových pigmentov sú zhrnuté v práci Jůzlová a spol.[3] a Martínková a spol.[4] V prehľadnom článku o sekundárnych metabolitoch húb *Monascus*[3] autori citujú pôvodné práce, podľa ktorých extrakty z červenej ryže neprejavili akútne toxické účinky na myši. Farebné zložky červenej ryže sú pravdepodobne komplexy pigmenty – aminokyseliny a nejavia toxické účinky. Oranžové monaskové pigmenty zo submerzných kultivácií sa vyznačovali rozmanitou biologickou aktivitou s pozitívnymi i menej žiadúcimi účinkami. Azafilónový skelet je esenciálny pre niektoré biologické účinky a rozdiely v aktivite metabolitov sa môžu pripisovať ich odlišnej reaktivite s amínmi[6].Výsledky testov toxikologických štúdií ďalších mikrobiálnych metabolitov s azafilónovou štruktúrou sa vo vedeckej literatúre nachádzajú len sporadicky. Napríklad o toxicite azafilónových metabolitov sa zmieňuje Buchi



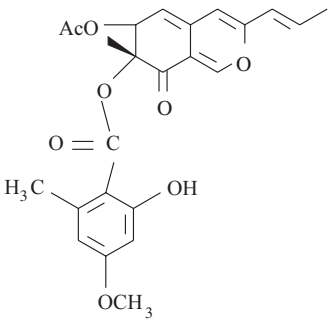
Obr. 1. **Štruktúra farebných azafilónov**



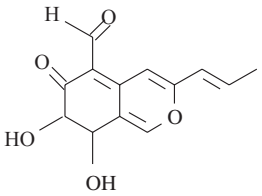
Monaskové pigmenty



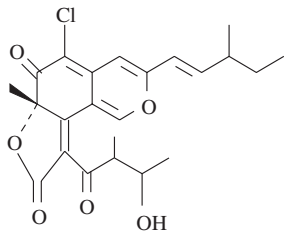
Mitorubrín



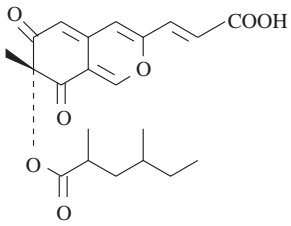
Wortmin



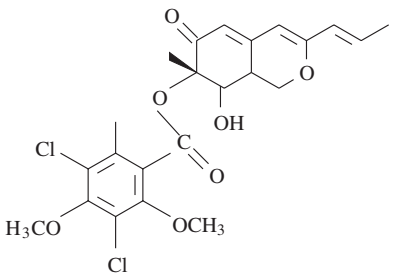
Austdiol



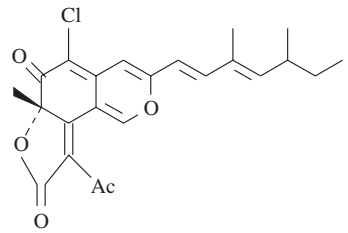
Chaetoviridín A



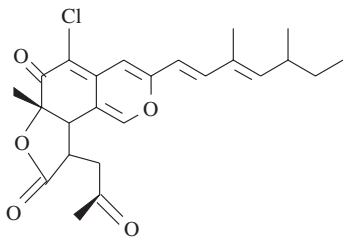
Kyselina lunatová



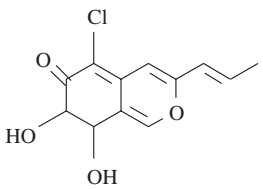
Falkonenzín A



Rubrorotiorín



Izochromofilón I



Luteusín A

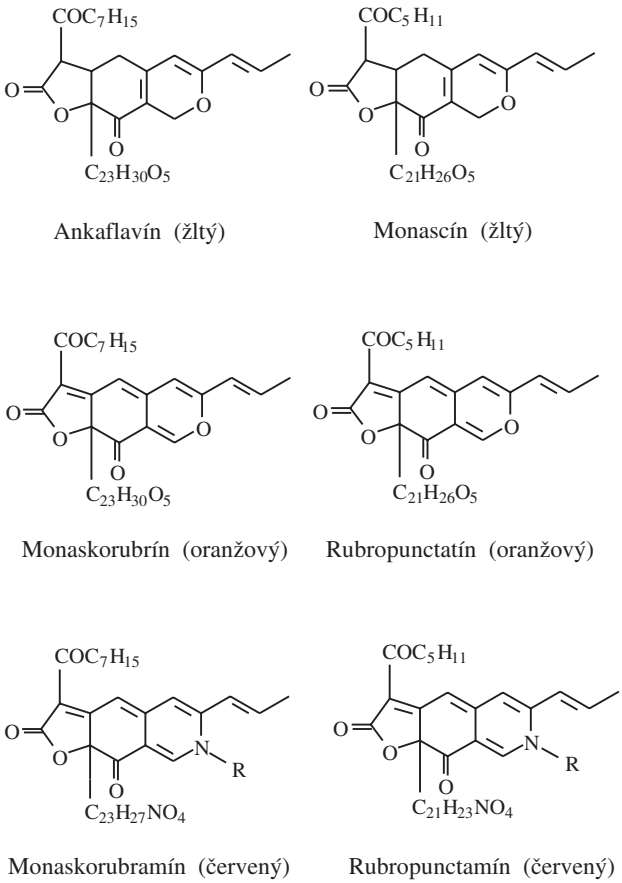
Obr. 2. **Hlavné skupiny azafilónových metabolitov**

a spol.[5], ktorí zistili, že spomedzi metabolitov produkovaných hubou *Penicillium rubrum*, azafilónové látky mitorubrín a mitorubrinol neprejavujú toxické účinky.

2.1. Monaskové pigmenty

Vláknité huby rodu *Monascus* sú zdrojom skupiny pigmentov produkovaných prevažne v mycéliu. Ide o žltý ankaflavín a monascín, oranžový monaskorubrín a rubropunktatín, červený monaskorubramín, rubropunktamín, či ich N-glutaryl alebo histidyl deriváty: N-glutarylmonaskorubramín, N-glutarylrubropunktamín (obr. 3)[7-10]. Najnovší stav poznania v oblasti monaskových pigmentov je popísaný v prácach[3,11].

Monascín po prvý raz izolovali ako produkt huby *Monascus purpureus* Went, mikrorganizmu zodpovedného za farebnosť červenej ryže[8]. Neskôr bol izolovaný tiež z *Monascus rubiginosus* Sato a *Monascus rubropunctatus*. Monascín a rubropunctatín ako aj monascín a monascorubrín sa vyskytujú spoločne ako metabolity rôznych húb. Rubropunktatín je metabolit *Monascus rubropunctatus*, monaskorubrín je metabolit *Monascus purpureus.* Ukázalo sa, že štruktúra monaskorubrínu sa líši od štruktúry rubropunktatínu len v dĺžke nasýteného postranného reťazca, rovnako ako aj ankaflavínu od monascínu a monaskorubramínu od rubropunktamínu. Neskôr sa viaceré produkčné kmene s rôznymi exotickými názvami reklasifikovali ako *Monascus purpureus* alebo *ruber*. Zo štruktúr metabolitov *Monascus* môžeme pozorovať, že sa tu vyskytuje lineárny typ spojenia α,β-ketolaktónového kruhu týchto látok s azafilónovým skeletom, pričom laktónový kruh žltých monaskových pigmentov je nasýtený a oranžových nenasýtený. Žlté pigmenty monascín, resp. ankaflavín sú tetrahydroderiváty oranžových pigmentov, rubropunktatínu, resp. monaskorubrínu. Zvýšená acidita metabolitov monascínu a ankaflavínu súvisí s terciárne naviazaným vodíkom na α-uhlík β-ketolak-



Obr. 3. **Základné štruktúry monaskových pigmentov a ich sfarbenie**

tónového systému. Chen a spol. uvádzajú vo svojej práci[9] relatívnu stereochémiu azafilónov. Monascín a rubropunktatín sa vyznačujú rovnakou stereochémiou v pozícii C-7. Monascín, rubropunktatín a monaskorubrín patria do tej istej stereochemickej série (–)–sklerotiorínu.

Fungálne metabolity, monaskorubrín, monaskoflavín, monascín, rubropunktatín ako aj chaetoviridíny, sklerotiorín a rotiorín, tvoria biogénne príbuznú skupinu látok. Biosyntetické štúdie týchto sekundárnych metabolitov objasňujú polyketidový pôvod azafilónov[10].

Aktuálnosť problematiky monaskových farbív potvrdilo špecializované sympózium, ktoré sa konalo v júli 1998 o monaskových pigmentoch v Toulouse, Francúzsko. My sme prezentovali prípravu monaskových pigmentov na polosuchých prírodných substrátoch pomocou *Monascus purpureus* CCM8112 (cit.[12,13]) a dosiahli sme výsledky 0,21 g pigmentu/g suchej váhy kultivačného substrátu. Výsledky sa stretli s pozitívnym ohlasom.

2.2. Mitorubrín, mitorubrinol, kyselina mitorubrínová

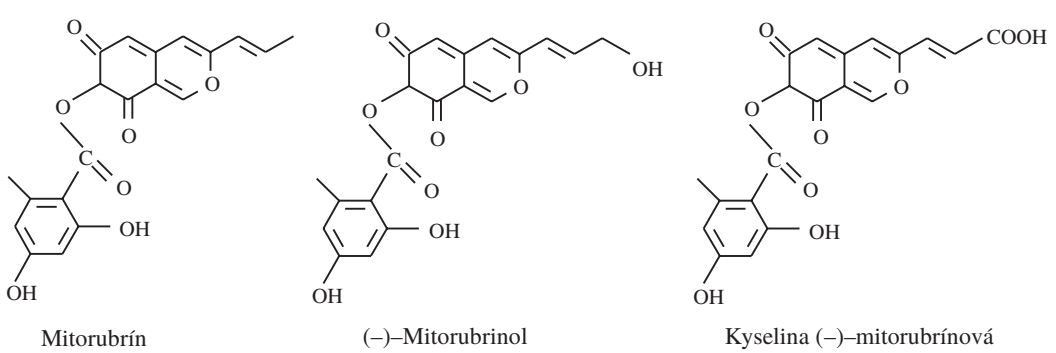
Skupina príbuzných fungálnych metabolitov obsahuje dve štruktúrne zložky, azafilónový skelet a zvyšok kyseliny orzelínovej, spojené esterovou väzbou (obr. 4). Obidve štruktúrne jednotky pochádzajú z acetátu. Mitorubrín bol produkovaný hubou *Penicillium rubrum* a získal sa ako žlto-oranžové prizmy[5]. Žltý pigment mitorubrinol je metabolitom mikroorganizmov *Penicillium rubrum*, *Penicillium wortmannii* Klocker a *Penicillium vermiculatum*[14-16]. Veľmi podobný fungálny metabolit, kyselina (–)–mitorubrínová bola izolovaná z *Penicillium funiculosum* a *Penicillium vermiculatum* zo submerznej 7-dňovej kultivácie[6,17].

Analýza hmotnostného spektra umožnila navrhnúť sumárny vzorec mitorubrínu $C_{21}H_{18}O_7$, mitorubrinolu $C_{21}H_{18}O_8$ a kyseliny mitorubrínovej $C_{22}H_{18}O_9$. Mitorubrinol, mitorubrín a kyselina mitorubrínová patria do rovnakej stereochemickej série ako (–)–sklerotiorín.

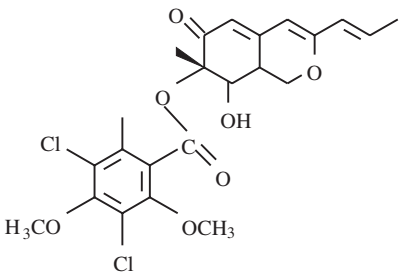
V našich experimentoch sme zistili farebné metabolity tejto skupiny látok s azafilónovou štruktúrou v extraktoch kultúry *Penicillium funiculosum* CCM F-8080, *Penicillium vermiculatum* CCM F-276 a *Talaromyces wortmannii* (Klocker) C. R. Benjamin[18].

2.3. Falkonenzíny

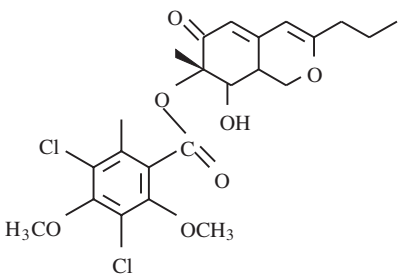
Falkonenzíny A, B, a C sa izolovali z dichlórmetánových extraktov mycélia askomycétnej huby *Emericella falconensis*[19]. Neskôr, Itabashi a spol.[20] izolovali z tejto kultúry falkonenzín H spolu s falkonenzínmi A, B, C, a D. Ich štruktúry sú znázornené na obr. 5. Sumárne vzorce falkonenzínov A, B, C, D a H boli určené elementárnou analýzou a hmotnostnou spektrometriou ako $C_{23}H_{24}Cl_2O_7$, $C_{23}H_{26}Cl_2O_7$, $C_{25}H_{26}Cl_2O_8$, $C_{25}H_{28}Cl_2O_8$ a $C_{22}H_{18}Cl_2O_7$. Metabolity sú hydrogenované azafilóny s dichlórorzelinovou štruktúrnou jednotkou. Štruktúra falkonenzínu A bola určená ako 7-(3,5-dichloro-2,4-dimetoxy-6-metylbenzoyl)-8-hydroxy-7-metyl-3-(1-propenyl)-1,



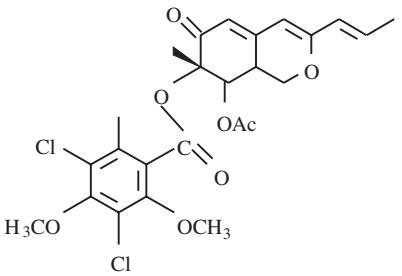
Obr. 4. **Štruktúry mitorubrínových derivátov**



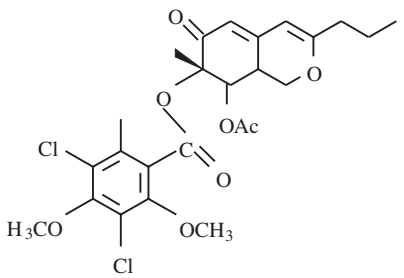
Falkonenzín A



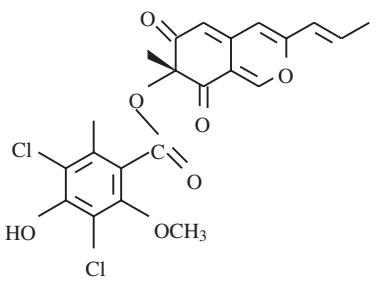
Falkonenzín B



Falkonenzín C

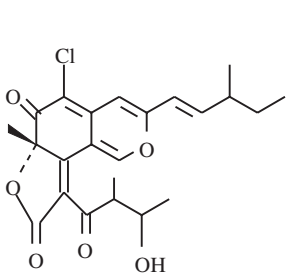


Falkonenzín D

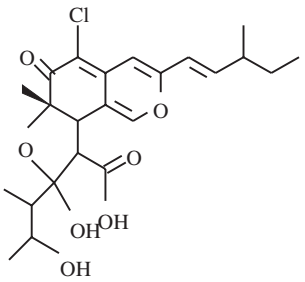


Falkonenzín H

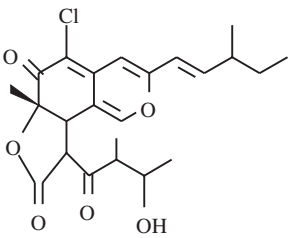
Obr. 5. **Štruktúry falkonenzínov**



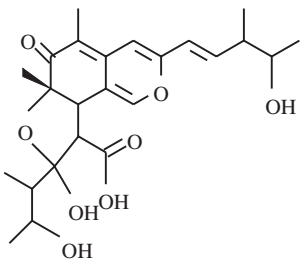
Chaetoviridín A



Chaetoviridín B



Chaetoviridín C



Chaetoviridín D

Obr. 6. **Štruktúry chaetoviridínov**

7,8,8*a*-tetrahydro-6*H*-2-benzopyrán-6-on. Výsledky ^{1}H-NMR a UV spektroskopických štúdií indikujú postranný reťazec falkonenzínov A, C a H ako zvyšok 2-propenylu a postranný reťazec falkonenzínu B a D ako propylový zvyšok. Azafilónové metabolity huby *Emericella falconensis* boli izolované z kultivačnej pôdy ako žlté ihličky (falkonenzín A), bezfarebné prizmy (falkonenzín B), žltý kryštalický prášok (falkonenzín C, D).

2.4. Chaetoviridíny

Chaetoviridíny A, B, C a D, začlenené do skupiny azafilónov, možno izolovať z huby *Chaetomium globosum* var. *flavo-viride*[21]. Molekulové vzorce chaetoviridínov sú $C_{23}H_{27}ClO_6$ (A), $C_{23}H_{29}ClO_7$ (B), $C_{23}H_{29}ClO_6$ (C) $C_{23}H_{29}ClO_8$ (D). Spektrálne údaje indikujú chlór – obsahujúci azafilón s konjugovaným γ-laktónom spojeným angulárne s azafilónovou zložkou. Štruktúra chaetoviridínu A bola určená ako 5-chloro-9-[(2*S*,3*R*)-3--hydroxy-3-metyl-1-oxobutyl]-6*a*-(*S*)-metyl-3-[(*S*)-3-metyl-1--pentenyl)]-6*H*-furo[2,3-*h*]-2-benzopyrán-6,8-(6*aH*)-dion. Červený pigment chaetoviridín A má nenasýtený γ-laktónový kruh, zatiaľ čo chaetoviridíny B, C a D (žlté pigmenty) majú nasýtený γ-laktónový kruh, ako to vidno zo štruktúr na obr. 6. Porovnaním fyzikálnych vlastností je zrejmé, že chaetoviridín C je *cis*-8,2-dihydro derivát chaetoviridínu A, chaetoviridín B vykazuje vyššiu polaritu ako A a chaetoviridín D je 12-hydroxychaetoviridín B. Azafilónové metabolity *Chaetomium globosum* var. *flavo-viride* boli izolované zo stacionárnej kultúry rastúcej na pšenici, ako červené ihličky (chaetoviridín A) a žltý prášok (chaetoviridín B, C a D). Chaetoviridín A prejavoval inhibičnú aktivitu na monoaminoxidázu a inhibíciu rastu *P. oryzae* (2,5 μg.ml^{-1}).

2.5. Kyselina lunatová

Kyselina lunatová (obr. 2) je metabolit produkovaný fytopatogénnou hubou *Cochliobolus lunata* kultivovanou na sladinovo-dextrózovom médiu[22]. Počas izolačného a purifikač-

ného postupu bola konvertovaná diazometánom na metylester kyseliny lunatovej. Jeho UV spektrum indikuje prítomnosť amfipyrónového chromoforu, čo sa potvrdilo charakteristickou reakciou metylesteru kyseliny lunatovej s amóniovým iónom. Tento žltý pigment s antifungálnou aktivitou sumárneho vzorca $C_{22}H_{26}O_7$ bol izolovaný z fermentačnej pôdy po 72 h submerznej kultivácii.

2.6. Wortmin

Wortmin je člen sklerotiorínovej skupiny metabolitov produkovaných hubou *Penicillium wortmannii* Klocker[14]. Sumárny vzorec wortminu bol určený ako $C_{24}H_{28}O_8$. Časť štruktúry látky podľa IR, UV a NMR spektra tvorí zložka typu kyseliny orzelínovej. Druhá štruktúrna jednotka, azafilónový skelet 6-acetoxy-7-hydroxy-7-metyl-3-propenyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrán-8-on je s ňou spojený esterovou väzbou (obr. 2). Wormin bol izolovaný vo forme žltého prášku. Okrem tejto substancie sa z kultivačného média *P. wortmannii* izoloval tiež mitorubrinol.

2.7. Austdiol

Vlegaar a spol.[23] izolovali opticky aktívny mikrobiálny metabolit austdiol z kultúry *Aspergillus ustus* (Bainier) Thom rastúcej na kukuričnej múke. Hmotnostná spektrometria a elementárna analýza definovali molekulový vzorec ako $C_{12}H_{12}O_5$. Tento metabolit so štruktúrou veľmi podobnou azafilónom bol identifikovaný ako (7*R*,8*S*)-7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-3,7-dimetyl-6-oxo-6*H*-2-benzopyrán-5-karbaldehyd. Molekulu môžeme považovať za priamy reťazec pentaketidu formálne alkylovaný na dvoch metylénových pozíciách za vzniku aldehydovej skupiny na C-5 a metylovej skupiny na C-7 (obr. 2).

2.8. Rubrorotiorín

Niektoré ďalšie členy azafilónovej skupiny metabolitov sa zistili v extraktoch mycélia *Penicillium hirayamae* Udagawa, spolu s iným hlavným pigmentom (–)–sklerotiorínom[24]. Molekulový vzorec červeného pigmentu rubrorotiorínu je $C_{23}H_{23}ClO_5$. Tento ekvivalent monochlórderivátu rotiorínu, je prvý angulárny azafilón izolovaný z prírodných zdrojov (obr. 2). Po separácii majoritného pigmentu (–)–sklerotiorínu z extraktu fermentačnej pôdy sa rubrorotiorín získal vo forme červených ihličiek. Metabolit reaguje rýchlo s amóniovými iónmi za vzniku rubrorotioramínu, $C_{23}H_{24}ClNO_4$.

2.9. Luteusíny

Tri nové azafilóny (C, D a E) sa izolovali z askomycétnej huby *Talaromyces luteus* (anamorf *Penicillium vonarxii)* súčasne s luteusínmi A a B známymi predtým ako inhibítory monoaminoxydázy[25] (MAO). Štruktúra luteusínu A (obr. 2) je veľmi blízka 7-episklerotiorínu, ktorý MAO neinhiboval. MAO inhibičný potenciál sa stráca konverziou hydroxylovej skupiny v pozícii C-8 na oxo-skupinu a hydrogenáciou dvojitých väzieb postranného reťazca. Nové azafilóny, luteusín C, D a E neinhibovali monoamínoxidázu. Monoacetylderivát luteusínu A je účinnejší inhibítor MAO, než pôvodný metabolit. Luteusín A sa získal po 21-dňovej statickej kultivácii *T. luteus* rastúcej na ryži (20 kg), v množstve 25 mg (cit.[26]).

2.10. Izochromofilóny

Metabolity tohto typu boli izolované z fermentačnej pôdy *Penicillium sp.* FO-2338 (cit.[27]), molekulové vzorce boli určené ako $C_{23}H_{25}O_5Cl$ (I) a $C_{22}H_{27}O_4Cl$ (II). UV a IR charakteristiky obidvoch látok sú veľmi podobné, avšak absorpcia γ-laktónového karbonylu zistená pre látku *I* sa nepozorovala v IR spektre izochromofilónu II. Metabolity obsahujú atóm chlóru. Na azafilónový skelet rovnaký ako skelet sklerotiorínu a postranné reťazce je naviazaných dovedna päť metylových skupín (obr. 2). Izochromofilóny I a II sa izolovali spolu so sklerotiorínom zo submerznej kultúry *Penicillium sp.* FO-2338, neskôr identifikovanej ako *Penicillium multicolor*[28], na médiu s kombinovaným uhlíkatým a dusíkatým zdrojom, vo forme žltého prášku. Ich množstvá v médiu boli 2,02 (I), resp. 1,39 (II) $mg.l^{-1}$. Metabolity sú prvé nepeptidové látky inhibujúce špecifickú väzbu HIVgp120 proteínu s CD_4 molekulou na povrchu citlivých buniek organizmu, ktorý vírus atakuje a zabraňujú tým vstupu HIV vírusu do bunky (IC_{50}6,6 a 3,9 $\mu mol.l^{-1}$). Izochromofilóny III–VI, inhibítory acyl-CoA: cholesterol acyltransferázy, izoloval Arai so spolupracovníkmi[29] z kultúry *Penicillium multicolor* FO-3216. Nové izochromofilóny VII a VIII sa získali z *Penicillium sp.* FO-4164. Metabolit VIII inhiboval diacylglycerol acyltransferázovú aktivitu, ako aj acyl-CoA: cholesterol acyltransferázovú aktivitu[30].

V tabuľke I je stručný prehľad produkcie azafilónových metabolitov vláknitými hubami.

Tabuľka I
Azafilónové pigmenty produkované mikroorganizmami

Metabolit	Mikroorganizmus	Lit.
Monascín	*Monascus purpureus* Went	7,9
	Monascus rubiginosus Sato	8
	Monascus rubropunctatus Sato	8
Rubropunktatín	*Monascus rubropunctatus* Sato	8
Rubropunktamín		3
Ankaflavín		3
Monaskorubrín	*Monascus purpureus*	8
Monaskorubramín		3
N-Glutarylrubropunktamín	*Monascus ruber*	7
N-Glutarylmonaskorubramín	*Monascus ruber*	7
Mitorubrín	*Penicillium rubrum*	5,31
	Talaromyces udagawae	30
Mitorubrinol	*Penicillium rubrum*	5
	Penicillium wortmannii	14
	Penicillium vermiculatum	16
Kyselina mitorubrínová	*Penicillium funiculosum*	6
	Penicillium vermiculatum	16,17
Monometyl-(+)-mitorubrín	*Talaromyces tardifaciens*	32
Wortmin	*Penicillium wortmannii*	14
Austdiol	*Aspergillus ustus*	23
Chaetoviridín A–D	*Chaetomium globosum* var. *flavo-viride*	21
Kyselina lunatová	*Cochliobolus lunata*	22
Falkonenzín A–D,H	*Emericella falconensis*	19,20
Rubrorotiorín	*Penicillium hirayamae*	24
Luteusín A–E	*Talaromyces luteus*	25,26
	Penicillium vonarxii	31
Izochromofilón I–VI	*Penicillium multicolor*	27–29
Izochromofilón VII,VIII	*Penicillium sp.* FO-4164	30

3. Záver

Niektoré v práci spomenuté azafilónové metabolity vláknitých húb (pigmenty *Monascus)*, sa bežne používajú na farbenie potravín. Ľahko sa derivatizujú prostredníctvom substitúcie kyslík/dusík. Selektívna derivatizácia substitúciou reaktívneho kyslíka otvára ďalšie možnosti v príprave novej skupiny semisyntetických farbív. Ich hlavnou výhodou je prírodný výskyt vo fermentovaných potravinách. Širšiemu uplatneniu v EU bráni nedoriešená legislatíva.

V náväznosti na poznatky zhrnuté v tejto práci, sa okrem metabolitov kmeňov *Monascus* javia perspektívnymi aj iné azafilónové zlúčeniny. Zostáva nezodpovedaných ešte mnoho otázok za účelom možností určenia farebného spektra pigmentov a výberu mikroorganizmov, ktoré by mohli mať široké uplatnenie predovšetkým v oblasti potravinárskych výrobkov s prihliadnutím nielen na ich štruktúru, ale aj na selektívnu elimináciu možných toxikologických problémov spojených s inými derivátmi než azafilónmi ako sprievodnými metabolitmi.

Práca bola financovaná v rámci úlohy 1/6252/99 grantovej agentúry VEGA.

LITERATÚRA

1. StMartin E. J., Kurek P. R., Schumacher E. F., Fohrbach R. P.(UOP, Des Plaines, Illinois): US 5013564 (1990).
2. Matsunaga M.: JP 02303477 (1990).
3. Můzlová P., Martínková L., Křen V.: J. Ind. Microbiol. *16*, 163 (1996).
4. Martínková L., Patáková-Můzlová P., Křen V., Kučerová Z., Havlíček P., Olšovský O., Hovorka B., Veselý D., Veselá D., Ulrichová J., Přikrylová V.: Food Addit. Contam. *16*, 15 (1999).
5. Buchi G., White J. D., Wogan G. N.: J. Am. Chem. Soc. *87*, 3484 (1965).
6. Natsume M., Takahashi Y., Marumo S.: Agric. Biol. Chem. *49*, 2517 (1985).
7. Hajjaj H., Klaébé A., Loret M. O., Tzékadis T., Goma G., Blanc P. J: Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2671 (1997).
8. Fielding B. C., Holker J. S. E., Jones D. F., Powell A. D. G., Richmond K. W., Robertson A., Whalley W. B.: J. Chem. Soc. *4*, 4579 (1961).
9. Chen F. C., Manchand P. S., Whalley W. B.: J. Chem. Soc. C *1971*, 3577.
10. Birch A. J., Cassera A., Fitton P., Holker J. S. E., Smith H., Thompson G. A., Whalley W. B.:. J. Chem. Soc. C, *1962*, 3583.
11. Slugeň D., Šturdíková M., Rosenberg M.: Bulletin PV *36*, 155 (1997).
12. Slugeň D., Menta S. S., Rosenberg, M., vo zborníku*: Papers of the Symposium on Monascus Culture and Applications*, str. 81. INRA, Toulouse 1998.
13. Slugeň D., Mogoňová E., Krištofíková L., Rosenberg M., vo zborníku*: Papers of the Symposium on Monascus Culture and Applications*, str. 239. INRA, Toulouse 1998.
14. Merlini L., Mondelli R., Nasini G.: Helv. Chim. Acta *50*, 232 (1973).
15. Proksa B., Liptaj T., Prónayová N., Fuska J.: Chem. Papers *48*, 429 (1994).
16. Proksa B., Uhrín D., Fuska J., Michálková E.: Collect. Czech. Chem. Commun. *57*, 408 (1992).
17. Proksa B., Šturdíková M., Mojumdar S. C., Fuska J.: Folia Microbiol. *42*, 133 (1997).
18. Šturdíková M., Slugeň D., Rosenberg M.: *21st Congress Czechoslov. Soc. Microbiol., Hradec Králové, 6.–10. September 1998*, Abstracts, Čs. spol. mikrobiol., Praha 1998.
19. Itabashi T., Nozawa K., Miyaji M., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K.: Chem. Pharm. Bull. *40*, 3142 (1992).
20. Itabashi T., Nozawa K., Nakajima S., Kawai K.: Chem. Pharm. Bull. *41*, 2040 (1993).
21. Takahashi M., Koyama K., Natori S.: Chem. Pharm. Bull. *38*, 625 (1990).
22. Nukina M., Marumo S.: Tetrahedron Lett. *30*, 2603 (1977).
23. Vleggaar R., Steyn P. S., Nagel D. W.: J. Chem. Soc. Perkin I *13*, 45 (1974).
24. Gray R. W., Whalley B.: J. Chem. Soc. C *1971*, 3575.
25. Satoh Y., Yamazaki M.: Chem. Pharm. Bull. *37*, 206 (1989).
26. Yoshida E., Fujimoto H., Yamazaki M.: Chem. Pharm. Bull. *44*, 284 (1996).
27. Omura S., Tanaka H., Matsuzaki K., Ikeda H., Masuma R.: J. Antibiot. *46*, 1908 (1993).
28. Matsuzaki K., Ikeda H., Masuma R., Tanaka H., Omura S.: J. Antibiot. *48*, 703 (1995).
29. Arai N., Shiomi K., Tomoda H., Tabata N., Yang D. J., Masuma R., Kawakubo T., Omura S.: J. Antibiot. *48*, 696 (1995).
30. Yang D. J., Tomoda H., Tabata N., Masuma R., Omura S.: J. Antibiot. *49*, 223 (1996).
31. Nakanishi S., Kakita S., Takahashi I., Kawakara K., Tsukuda E., Sano T., Yamada K., Yoshida M., Kase H., Matsuda Y.: J. Biol. Chem. *267*, 2157 (1992).
32. Nozawa K., Saito R., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K.: Phytochemistry *29*, 719 (1995).

M. Šturdíková, D. Slugeň, K. Lešová and M. Rosenberg *(Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic):* **Microbial Production of Coloured Azaphilone Metabolites**

Azaphilones, fungal secondary metabolites of the pyranequinone structure, react with ammonia yielding vinylogous 4-pyridones. The pigments also react with amines, such as proteins, amino acids and nucleic acids, to form water-soluble pigments. Their most remarkable and valuable properties include the natural origin, yellow-red spectra, thermostability (in comparison with other natural red pigments), and easy derivatization. So far, they have been identified in a variety of fungal sources. Of the microorganisms tested, only genera *Monascus*, *Penicillium* and *Chaetomium* are good producers of azaphilone pigments. However, similar structures were also identified in *Aspergillus ustus*, *Cochliobolus lunata, Talaromyces sp.* and *Emericella falconensis*. The microorganisms could be a promising source of the new group of natural pigments for food and cosmetic industry.

BIOLOGICKÁ A FARMAKOLOGICKÁ AKTIVITA LIGNANŮ

JIŘÍ SLANINA

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
e-mail: jslanina@med.muni.cz

Došlo dne 22.II.1999

Klíčovová slova: lignany, biologická aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Protinádorová aktivita
3. Antivirová aktivita
4. Kardiovaskulární aktivita
5. Antioxidační aktivita
6. Lignany u savců a člověka

1. Úvod

Lignany jsou poměrně rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Skládají se ze dvou fenylpropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců. Název lignany byl pro tuto skupinu přírodních látek odvozen z toho, že tyto sloučeniny byly původně považovány za meziprodukty při biosyntéze ligninu $(C_6–C_3)_n$, polymeru rovněž složeného z fenylpropanových jednotek jako lignany $(C_6–C_3)_2$. Dnes je zřejmé, že vzhledem ke struktuře ligninu a lignanů pouze některé z nich mohou sloužit k tomuto účelu. Navíc, lignin je na rozdíl od naprosté většiny lignanů opticky inaktivní. Rovněž skutečnost, že je známo velmi malé množství vyšších oligomerů, jako jsou seskvilignany $(C_6–C_3)_3$ nebo dilignany $(C_6–C_3)_4$ podporuje tento názor[1].

Obr. 1 popisuje předpokládanou biosyntetickou dráhu 6 hlavních strukturních tříd lignanů. Biosyntéza začíná oxidační dimerizací koniferylalkoholu (*I*) za vzniku chirálních produktů, lignanů. Některé enzymy ((+)-pinoresinol synthasa[2] a (+)-pinoresinol:(+)-lariciresinol oxidoreduktasa[3]), které se podílejí na biosyntéze lignanů, byly již purifikovány a charakterizovány[2,3]. V rostlinách se vyskytují sloučeniny, které mají podobné strukturní znaky jako lignany. Mezi tyto příbuzné sloučeniny patří především neolignany, ve kterých jsou dvě fenylpropanové jednotky spojeny jinou vazbou, než je vazba přes centrální (β) uhlíky alifatických řetězců. Existují také hybridní lignany jako jsou flavanolignany, kumarinolignany a lignan-iridoidy, v nichž jedna část molekuly je tvořena fenylpropanovou jednotkou a druhá část jinou přírodní látkou. O flavanolignanech bylo v tomto časopise pojednáno nedávno[4].

V současnosti je známo více jak 200 lignanů nacházejících se ve více než 70 čeledích rostlin. Mohou se vyskytovat v rostlinách ve formě glykosidů, většinou jsou však přítomny ve formě aglykonů. Lignany se nacházejí hojně u nahosemenných rostlin (jehličnany) a u dvouděložných rostlin. Jsou hlavními sekundárními metabolity čeledi *Podophyllaceae*[5] a živého reliktu, čeledi *Schisandraceae*, která je vývojově nejstarší čeledí dvouděložných rostlin. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typická je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů a v pryskyřicích[6]. U některých druhů byl nejvyšší obsah lignanů nalezen v semenech[7]. Z rostlinného materiálu jsou vzhledem ke své nízké polaritě extrahovány petroletherem, hexanem nebo jinými nepolárními rozpouštědly. K extrakci lze s výhodou použít také superkritickou fluidní extrakci CO_2 (cit.[8,9]).

Málo je známo o fyziologické funkci lignanů v rostlinách. Protože se jedná o sloučeniny, které vykazují antimikrobiální, antimitotické, antivirové, antioxidační a antinutriční vlastnosti, předpokládá se, že podobně jako jiné sekundární metabolity zvyšují rezistenci rostlin proti různým patogenům[3].

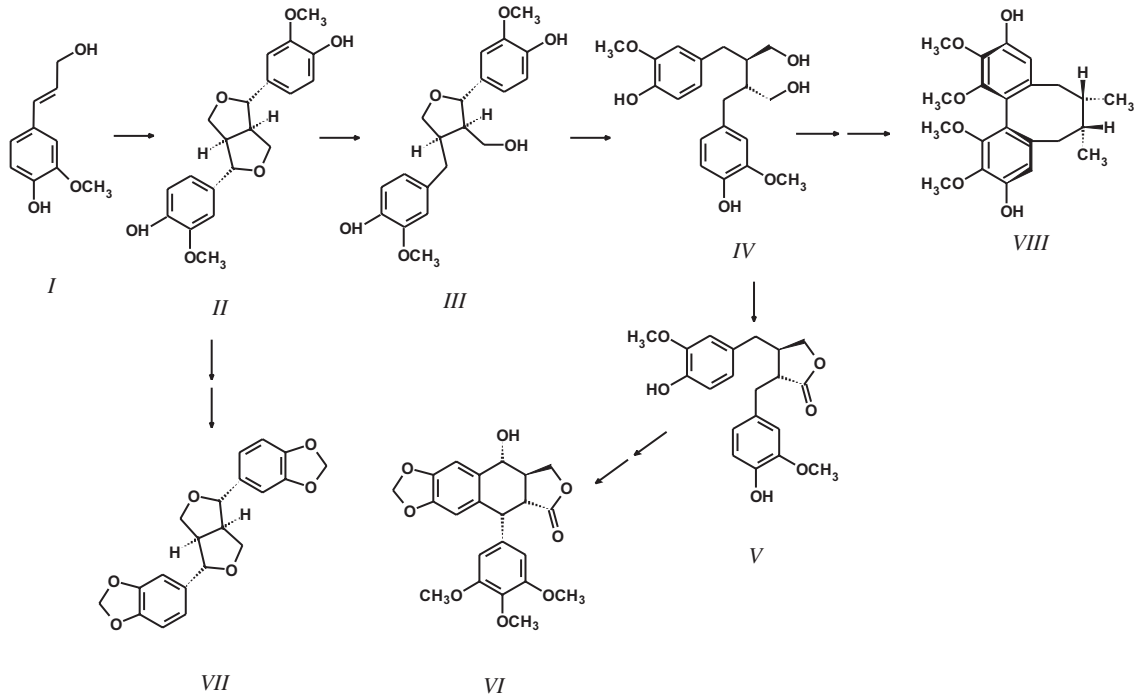
Nepolární charakter lignanů umožňuje jejich snadnou prostupnost buněčnými membránami a schopnost ovlivnit v buňkách řadu biologických dějů. Některé lignany se používají jako léčiva, např. cytostatika etoposid a teniposid. Vykazují také výraznou antivirovou aktivitu, včetně aktivity vůči viru HIV. Na molekulární úrovni se některé z nich váží na mikrotubuly, inhibují jaderné topoisomerasy, jiné se používají ke specifické inhibici enzymů[10].

Lignany byly také nalezeny v krvi a moči savců, včetně člověka. Tyto „živočišné“ lignany vznikají ve střevech savců mikrobiální transformací rostlinných lignanů, účinkují v organismu jako fytoestrogeny[11] a pravděpodobně působí preventivně proti vzniku některých nádorových onemocnění.

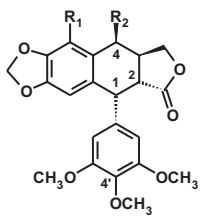
2. Protinádorová aktivita

Výrazná protinádorová aktivita byla popsána u řady lignanů. MacRae a Towers[6] uvádějí ve svém přehledu 33 lignanů s protinádorovou aktivitou, 31 z nich má methylendioxydovou skupinu a 29 z nich má pětičlenný laktonový cyklus. Oba tyto strukturní rysy mají tetrahydronaftalenové lignany z oddenků noholistu (*Podophyllum peltatum* nebo *P. emodi*). Nejlépe prostudovaný podofylotoxin (*VI*) je známým mitotickým jedem[12]. Působí jako inhibitor polymerace tubulinu, zabraňuje tvorbě dělícího vřeténka a zastavuje tak buněčné dělení v metafázi. Podofylotoxin má asi dvakrát vyšší afinitu k tubulinu než alkaloid kolchicin. Podofylotoxin a kolchicin se váží k tubulinu na dvou místech, jedno z nich, které je specifické pro 3,4,5-trimetoxyfenylovou skupinu, je společné pro oba toxiny.

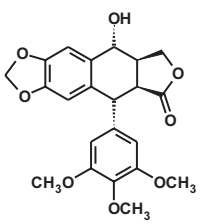
Také deriváty podofylotoxinu působí jako inhibitory polymerace tubulinu. Deoxypodofylotoxin (*IXa*) je stejně účinný jako podofylotoxin (*VI*), zatímco epipodofylotoxin (*IXb*), C–4 stereoizomer podofylotoxinu, má o více než řád sníženou aktivitu. β-peltatin (*IXc*) má dokonce vyšší afinitu k tubulinu než podofylotoxin. Podmínkou antimitotické aktivity těchto látek je *trans*-konfigurace laktonového cyklu. Pro účinek je



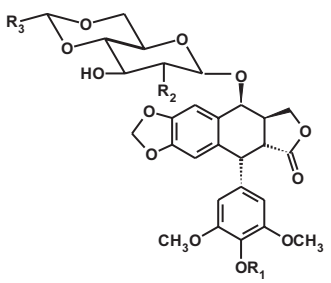
Obr. 1. **Schéma biosyntézy šesti hlavních strukturních tříd lignanů**. *I* = E-koniferylalkohol, *II* = pinoresinol (furofuranový lignan), *III* = laricirezinol (tetrahydrofuranový lig.), *IV* = sekoisolariciresinol (dibenzylbutanový lig), *V* = matairesinol (dibenzylbutyrolaktonový lig.), *VI* = podofylotoxin (aryltetrahydronaftalenový lig.), *VII* = sezamin, *VIII* = gomisin J (dibenzocyklooktadienový lig.)



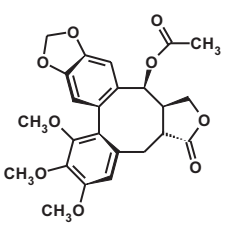
	R_1	R_2
IXa	H	H
IXb	H	OH
IXc	OH	H



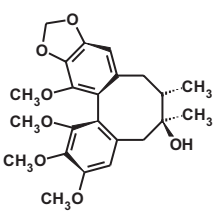
X



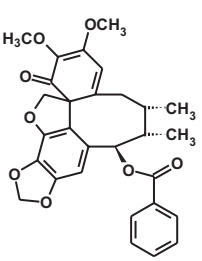
	R_1	R_2	R_3
XIa	H	OH	
XIb	H	OH	CH_3
XIc	PO_3H_2	OH	CH_3
XId	H	$N(CH_3)_2$	CH_3



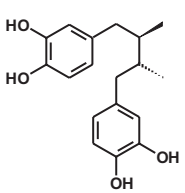
XII



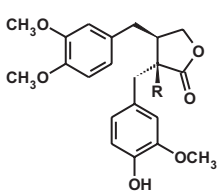
XIII



XIV



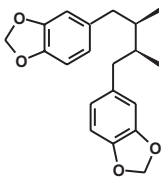
XV



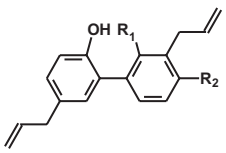
	R
XVIa	H
XVIb	OH

rovněž důležitá *R*-konfigurace na uhlíku C–2. Pikropodofylotoxin (*X*), který se liší od podofylotoxinu pouze konfigurací na C–2 se neváže na tubulin a jeho protinádorová aktivita je značně snížena[6].

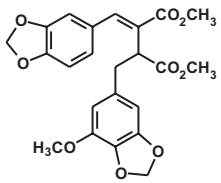
Deriváty 4'-demethylepipodofylotoxinu vykazují rovněž protinádorový účinek, působí však překvapivě zcela jiným mechanismem. Tyto sloučeniny, které mají jen velmi malou afinitu k tubulinu[13], inhibují topoisomerasu II. Do klinické praxe jako cytostatika byly zavedeny na konci sedmdesátých a na začátku osmdesátých let dva deriváty, teniposid (*XIa*) a etoposid[14] (*XIb*). K hlavním indikacím etoposidu a teniposidu patří malobuněčný karcinom plic a testikulární nádory.



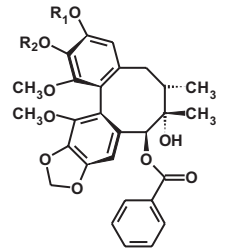
XVII



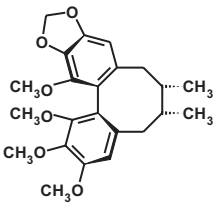
	R_1	R_2
XVIIIa	OH	H
XVIIIb	H	OH



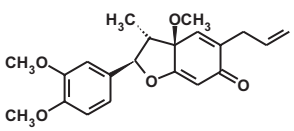
XIX



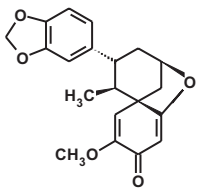
XXa $R_1 = R_2 = -CH_2-$
XXb $R_1 = R_2 = CH_3$



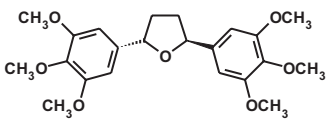
XXI



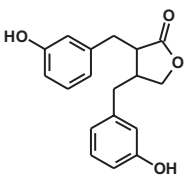
XXII



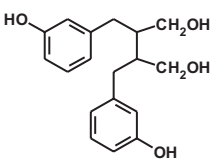
XXIII



XXIV



XXV



XXVI

Etoposid je často základní, těžko nahraditelnou součástí chemoterapie první volby[15,16]. Etoposid se vyrábí semisynteticky z podofylotoxinu, jehož nejběžnějším zdrojem je *Podophyllum emodi*, původem z Indie[17]. Značná pozornost je věnována nalezení analog etoposidu s vyšším protinádorovým účinkem, vyšší aktivitou vůči liniím nádorových buněk rezistentních k cytostatikům a vylepšenou farmakokinetikou a biologickou dostupností. V roce 1996 byl schválen k použití proti karcinomu plic etopofos (*XIc*), ve vodě rozpustný derivát etoposidu[18]. Ve 2. fázi klinického testování rovněž proti rakovině plic je ve vodě dobře rozpustný derivát etoposidu NK-611 (*XId*) (cit.[18]). Byly také syntetizovány deriváty podofylotoxinu (např. 4-O--butanoyl-4'-demethylpodofylotoxin), které jsou cytotoxické ve 100–1000× nižších koncentracích než běžná protinádorová léčiva a aktivní vůči liniím nádorových buněk rezistentních k etoposidu[10].

Dobře známými mitotickými jedy jsou také dibenzocyklooktadienové laktony ze *Steganotaenia araliacea*. Struktura těchto látek je značně podobná předešlým tetrahydronaftalenovým lignanům. Nejsilnější antitubulinový a protinádorový účinek z lignanů této rostliny vykazuje steganangin (*XII*). Podobně jako u podofylotoxinu, nutnou podmínkou antitubulinové aktivity je přikondenzování laktonového cyklu v *trans*--konfiguraci. Pro inhibici polymerace tubulinu je také nezbytná *S*-konfigurace biarylu[19]. Také některé další dibenzocyklooktadienové lignany s methylendioxydovou skupinou vykazují protinádorový účinek, přestože se neváží na mikrotubuly. Příkladem je gomisin A (*XIII*) ze *Schisandra chinensis*, který tlumí u krys hepatokarcinogenní působení azobarviv[20] a aflatoxinů[21] nebo schiarisanrin C (*XIV*) ze *Schisandra arisanensis*[22].

Dalším terapeutickým lignanem je nordihydroguajaretová kyselina (NDGA, masoprocol, *XV*), která se používá v prevenci a léčbě premaligních kožních lézí, především aktinické keratózy. NDGA je také v klinickém zkoušení při léčbě zhoubných nádorů[5].

Současná studie ukázala, že lignany matairesinol (*V*), arctigenin (*XVIa*), machilin A (*XVII*) a neolignan honokiol (*XVIIIa*) inhibují *in vitro* růst buněk lidské myeloidní leukémie o koncentracích menších než 100 $ng.ml^{-1}$. Takové koncentrace jsou pouze o jeden řád vyšší než u cytostatik, které se běžně používají při léčbě leukémie. Lignany však byly na rozdíl od současných protinádorových léčiv podstatně méně cytotoxické[23].

3. Antivirová aktivita

Velmi dlouho je známo, že pryskyřice několika druhů rodu *Podophyllum* je účinná v léčbě kožních výrůstků, které jsou způsobeny papilomaviry, zejména u condyloma acuminatum. Lze ji použít i u lentigo senilis a seboroických bradavic. Účinnými látkami jsou tetrahydronaftalenové lignany. Alkoholový extrakt z oddenků rostlin rodu *P. emodi* nebo *P. peltatum* nazývaný podofylin a lignan podofylotoxin (*VI*) v masti nebo roztoku se používají v dermatologii k léčbě těchto obtíží[24]. Aplikace většího množství podofylinu může vést k perkutánnímu vstřebávání a k toxickým projevům. Bezpečnější je proto podání čistého podofylotoxinu.

Podofylotoxin (*VI*), deoxypodofylotoxin (*IXa*) a β-peltatin (*IXc*) vykazují aktivitu proti viru spalniček a viru herpex simplex I (cit.[6]). Nezávisle na tom bylo zjištěno, že za antiherpetickou aktivitu extraktů z rostlin rodu *Juniperus* jsou zodpovědné rovněž arylnaftalenové lignany, zvláště deoxypodofylotoxin[6]. Roztok podofylotoxinu o koncentraci 1 $\mu g.ml^{-1}$ zcela inhibuje replikaci cytomegaloviru v tkáňové kultuře[25]. Nedávno vzbudila pozornost aktivita rhinacanthinu E (*XIX*) proti viru chřipky typu A (cit.[26]).

První poznatek o aktivitě lignanů proti viru HIV, původce onemocnění AIDS, publikovali Schröder a kol. v roce 1990. Izolovali z tropického popínavého keře *Ipomoea cairica* dva lignany, arctigenin (*XVIa*) a trachelogenin (*XVIb*), které v submikromolárních koncentracích inhibovaly replikaci viru HIV-1

a reverzní transkriptasu[27]. Avšak poměr mezi toxickou dávkou a efektivní dávkou (selektivní index) nebyl větší než 5. Byl rovněž připraven demethylovaný derivát arctigeninu, který je účinným inhibitorem HIV integrasy[28]. Inhibitory HIV-1 integrasy představují velmi perspektivní skupinu sloučenin, která by se v budoucnu mohla uplatnit v terapii AIDS (cit.[29,30]).

Nedávno bylo zjištěno, že gomisin J (*VIII*), dibenzocyklooktadienový lignan ze *Schisandra chinensis*, a jeho halogenované deriváty inhibují replikaci viru HIV-1 v submikromolárních koncentracích. Nejúčinnějším inhibitorem byl 2,9-dibromgomisin J se selektivním indexem přes 300. Tyto sloučeniny inhibovaly reverzní transkriptasu, ale zdá se, že to není jediný mechanismus účinku. Navíc halogenované deriváty gomisinu J působily synergicky s azidothymidinem (AZT) a byly účinné i proti klonům rezistentním k AZT (cit.[31]) Dalším dibenzocyklooktadienovým lignanem s *S*-konfigurací biarylu, který působí v tkáňové kultuře proti viru HIV-1 je schisantherin D (*XXa*, selektivní index 110) a gomisin G (*XXb*, EC_{50} = 6 $ng.ml^{-1}$ a selektivní index 300)[32]. Byla také syntetizována analoga tetrahydronaftalenových lignanů se selektivním indexem větším než 250 (cit.[33]).

NDGA (*XV*) a zejména její 3´-O-methylether byly vyizolovány jako látky zodpovědné za anti-HIV-1 aktivitu extraktů z pouštní rostliny *Larrea tridentata.* Autoři se domnívají, že 3´-O-methylether NDGA se váže na LTR sekvenci HIV-1 a je tak schopen potlačit transkripci provirové DNA (cit.[34]).

4. Kardiovaskulární aktivita

Je známo, že poměrně velké množství lignanů inhibuje cAMP fosfodiesterasu a tím zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP a stimuluje tak mimo jiné činnost myokardu. Inhibici vykazují především dibenzocyklooktadienové a dibenzylbutanové lignany s nejúčinnějšími zástupci gomisinem N (*XXI,* IC_{50}= 1,1.10^{-5} $mol.l^{-1}$) a NDGA (*XV*, IC_{50} = 1.10^{-6} $mol.l^{-1}$) (cit.[35]). Gomisin N se vyskytuje v plodech *Schisandra chinensis,* známé tonizující rostliny tradiční čínské medicíny.

Kadsurenon (*XXII*) a futoenon (*XXIII*), neolignany z *Piper futokadsura* jsou vedle diterpenových gingolidů z *Gingo biloba* velmi účinnými antagonisty fosfolipidu PAF (z anglického platelet activating factor, faktor aktivující trombocyty), který je endogenním aktivátorem agregace trombocytů. PAF se uplatňuje také při patologických stavech jako je vznik trombů, hypotenze, akutní zánět a anafylaktická reakce. Kadsurenon inhibuje vazbu PAF na jeho receptor (IC_{50} = 1.10^{-7} $mol.l^{-1}$) a agregaci krevních destiček vyvolanou PAF (IC_{50}= 9,9.10^{-7} $mol.l^{-1}$) (cit.[36]). Antiagregační aktivita tetrahydrofuranových lignanů vedla k přípravě derivátu L-652731 (*XXIV*), který je účinným antagonistou PAF (IC_{50}= 5.10^{-9} $mol.l^{-1}$) a inhibitorem agregace trombocytů (IC_{50}= 19.10^{-9} $mol.l^{-1}$) (cit.[37]).

Trachelogenin (*XVIb*) z *Arctium lappa* a *Tracheolospermum jasminoides*, rostliny používané v tradiční čínské medicíně, je nejvýraznějším lignanovým blokátorem vápníkových kanálů. Jeho aktivita je přibližně šestinou aktivity verapamilu, kalciového blokátora, který se široce užívá v klinické praxi[38].

Extrakt z *Eucommia ulmoides* je užíván v Číně po staletí jako tonikum a má také antihypertenzní účinky. Pinoresinol diglukosid byl vyizolován jako látka zodpovědná za antihypertenzní efekt. Lignan pinoresinol (*II*) je také inhibitorem fosfodiesterasy[6,36].

Dobře je dokumentována antihypertenzní aktivita sezaminu (*VII*), lignanu sezamového oleje[39]. Sezamin je schopen u krys zvýšit hladinu HDL-cholesterolu a snížit hladinu aterogenního LDL-cholesterolu[40]. Sezamin je specifický inhibitor Δ-5 desaturasy a inhibuje tak biosyntézu arachidonové kyseliny (20:4, n-6) z dihomo-γ-linolenové kyseliny(20:3, n-6). Snížené množství kyseliny arachidonové vede k nižší koncentraci některých eikosanoidů, např. PGE_2 (cit.[41]).

5. Antioxidační aktivita

Velká pozornost je v současnosti věnována studiu antioxidantů, které jsou schopny potlačit účinky volných kyslíkových radikálů podílejících se na velkém množství patologických stavů v lidském organismu. Výzkum antioxidační aktivity lignanů je soustředěn především na furofuranový lignan sezamin (*VII*) ze sezamového oleje[42], na neolignany honokiol (*XVIIIa*) a magnolol (*XVIIIb*) z rostlin rodu *Magnolia* a dibenzocyklooktadienové lignany ze *Schisandra chinensis*. Výrazné redukční účinky NDGA (*XV*) našly využití v potravinářství, kde se používá jako antioxidační aditivum[43]. NDGA se také široce používá v laboratorních experimentech k inhibici lipoxygenas.

Neolignany honokiol (*XVIIIa*) a magnolol (*XVIIIb)* z kůry rostlin rodu *Magnolia* vykazují silnou antioxidační aktivitu v různých biologických systémech. Inhibují peroxidaci lipidů jak mitochondriálních[44], tak mikrosomálních[45] membrán a hemolýzu erytrocytů vyvolanou oxidačními činidly[45]. Honokiol je silnější antioxidant než magnolol[46]. Ačkoliv honokiol i magnolol vykazují nižší antiradikálový účinek než α-tokoferol v testech se syntetickým stabilním organickým radikálem[44], v biologických systémech je honokiol až 1000× účinnějším antioxidantem než α-tokoferol[44,46].

Sloučeninami s antioxidačními vlastnostmi jsou také dibenzocyklooktadienové lignany obsažené v plodech *Schisandra chinensis*. Cytoprotektivní aktivita těchto látek je intenzivně studována a dobře dokumentována[47]. Pro účinek je pravděpodobně důležitá přítomnost methylendioxydové skupiny[48,49]. Tyto lignany sice nezháší syntetické organické radikály[49,50], jsou však schopny zvýšit hladinu redukovaného glutathionu v buňce a ochránit biologické membrány před lipoperoxidací v různých modelech oxidačního poškození[48]. Antioxidační aktivita některých lignanů ze *S. chinensis* je také vyšší než u α-tokoferolu a tyto sloučeniny nevykazují prooxidační vlastnosti[51]. Mechanismus účinku není přesně znám, může spočívat mimo jiné v indukci detoxikačních enzymů a zvýšení proliferace endoplazmatického retikula v hepatocytech. Gomisin A (*XIII*) je u japonské firmy Tsumura v preklinické fázi vývoje jako hepatoprotektivní látka[18].

6. Lignany u savců a člověka

Zájem o lignany prudce vzrostl, jakmile byly tyto sloučeniny identifikovány v séru a moči savců a člověka. Jedná se především o dva lignany enterolakton (*XXV*) a enterodiol[52] (*XXVI*). Tyto „živočišné“ lignany mají hydroxylové skupiny pouze v pozicích *meta* aromatických jader. Taková substituce nebyla pozorována u lignanů rostlinného původu. Původně byly považovány za produkt metabolismu savců a člověka.

Tento endogenní původ a kolísání jejich koncentrace v průběhu menstruačního cyklu u žen s maximem v luteální fázi a v těhotenství nebylo později potvrzeno. Enterolakton a enterodiol vznikají jako produkt metabolismu střevní mikroflóry z rostlinných prekurzorů, především z matairesinolu (*V*) a secoisolariciresinolu (*IV*), které se nacházejí často v semenech rostlin, celozrném pečivu, vláknině a v některé zelenině a ovoci. Daleko nejvyšší obsah matairesinolu a secoisolariciresinolu byl nalezen ve lněném semínku a je zde asi 100× vyšší než v ostatních zdrojích. „Živočišné lignany" jsou vylučovány z organismu žlučí a močí v poměrně velkém množství (řádově μmol za den) jako glukuronidy a sulfoglukuronidy[36].

Lignany enterolakton a enterodiol působí jako slabé estrogeny. Podle hladiny estrogenů se váží nebo soutěží s estradiolem o vazbu na jaderný receptor pro estrogeny. Při nízké koncentraci estrogenů, např. u žen po menopauze, tak působí jako slabé estrogeny. Při vysoké koncentraci estrogenů mohou působit jako antiestrogeny[53,54].

„Živočišné lignany" účinkují také jako slabé inhibitory agregace trombocytů a inhibitory Na^+/K^+ pumpy. Jsou přibližně o tři řády slabší inhibitory Na^+/K^+ pumpy než ouabain a neváží se na vazebné místo pro digitalisové glykosidy[55].

Neustále přibývá důkazů o tom, že příjem potravin s vysokým obsahem lignanů snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu, rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů[53]. Vysoká exkrece enterolaktonu v moči je spojována s nízkým rizikem rakoviny prsu[54,56]. Tuto hypotézu podporují experimenty na zvířecích modelech[57] a tkáňových kulturách nádorových buněk[53]. Enterolakton ve vysoké koncentraci také inhibuje růst nádorových buněk kolorektálního karcinomu[58] a rakoviny prsu nezávislé na estrogenech[11]. Lignany mohou působit preventivně vůči nádorovým onemocněním nejen díky své antiestrogenní aktivitě, ale také díky schopnosti inhibovat klíčové enzymy biosyntézy steroidních hormonů 5α-reduktasu a aromatasu[59] a vyvolat indukci syntézy enzymů, které se podílejí na II. fázi detoxikace xenobiotik[60] nebo působit jinými zatím neznámými mechanismy.

LITERATURA

1. Massanet G. M., Pando E., Rodriguez-Luis F., Zubia E.: Fitoterapia *60*, 3 (1989).
2. Davin L. B., Wang H. B., Crowell A. L., Bedgar D. L., Martin D. M., Sarkanen S., Lewis N. G.: Science *275*, 362 (1997).
3. Dinkova-Kostova A. T., Gang D. R., Davin L. B., Bedgar D. L., Chu A., Lewis N. G.: J. Biol. Chem. *271*, 29473 (1996).
4. Jegorov A.: Chem. Listy *90*, 859 (1996).
5. Castro M. A., Gordaliza M., Miguel del Corral J. M., San Feliciano A.: Phytochemistry *41*, 995 (1996).
6. MacRae W. D., Towers G. H. N.: Phytochemistry *23*, 1207 (1984).
7. Slanina J., Táborská E., Lojková L.: Planta Med. *63*, 277 (1997).
8. Chandra A., Nair M. G.: Planta Med. *61*, 192 (1995).
9. Lojková L., Slanina J., Mikešová M., Táborská E., Vejrosta J.: Phytochem. Anal. *8*, 261 (1997).
10. Ward R. S.: Nat. Prod. Rep. *14*, 43 (1997).
11. Wang C., Kurzer M. S.: Nutr. Cancer *28*, 236 (1997).
12. Viklický V., Hašek J., Streiblová E., Nečas O., v knize: *Cytoskelet* (Nečas O., ed.), str. 47. Academia, Praha 1991.
13. Kokoshka J. M., Ireland C. M., Barrows L. R.: J. Nat. Prod. *59*, 1179 (1996).
14. Stähelin H. F., Wartburg A.: Cancer Res. *51*, 5 (1991).
15. Vítek P., Benešová K., Klener P.: Remedia *6*, 194 (1996).
16. Haber J., Klener P.: Remedia *8*, 49 (1998).
17. Bastos J. K., Burandt C. L., Nanayakkara N. P. D., Bryant L., McChesney J. D.: J. Nat. Prod. *59*, 406 (1996).
18. Shu Y. Z.: J. Nat. Prod. *61*, 1053 (1998).
19. Wickramaratne D. B. M., Pengsuparp T., Mar W., Chai H. B., Chagwedera T. E., Beecher C. W. W., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Pezzuto J. M., Cordell G. A.: J. Nat. Prod. *56*, 2083 (1993).
20. Nomura M., Nakachiyama M., Hida T., Ohtaki Y., Sudo K., Aizawa T., Aburada M., Miyamoto K. I.: Cancer Lett. *76*, 11 (1994).
21. Ip S. P., Mak D. H. F., Li P. C., Poon M. K. T., Ko K. M.: Pharmacol. Toxicol. *78*, 413 (1996).
22. Kuo Y. H., Kuo L. M. Y., Chen C. F.: J. Org. Chem. *62*, 3242 (1997).
23. Hirano T., Gotoh M., Oka K.: Life Sci. *55*, 1061 (1994).
24. Jirásková M., v knize: *Remedia compendium* (Suchopár J., ed.), kap. 13.22. Panax, Praha 1997.
25. MacRae W. D., Hudson J. B., Towers G. H.: Planta Med. *55*, 531 (1989).
26. Kernan M. R., Sendl A., Chen J. L., Jolad S. D., Blanc P., Murphy J. T., Stoddart C. A., Nanakorn W., Balick M., Rozhon E. J.: J. Nat. Prod. *60*, 635 (1997).
27. Schröder H. C., Merz H., Steffen R., Müller W. E., Sarin P. S., Trumm S., Schulz J., Eich E.: Z. Naturforsch. [C]. *45*, 1215 (1990).
28. Eich E., Pertz H., Kaloga M., Schulz J., Fesen M. R., Mazumder A., Pommier Y.: J. Med. Chem. *39*, 86 (1996).
29. Pommier Y., Pilon A. A., Bajaj K., Mazumder A., Neamati N.: Antiviral Chem. Chemother. *8*, 463 (1997).
30. Snášel J., Pichová I.: Chem. Listy *90*, 927 (1996).
31. Fujihashi T., Hara H., Sakata T., Mori K., Higuchi H., Tanaka A., Kaji H., Kaji A.: Antimicrob. Agents Chemother. *39*, 2000 (1995).
32. Chen D. F., Zhang S. X., Xie L., Xie J. X., Chen K., Kashiwada Y., Zhou B. N., Wang P., Cosentino L. M., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem. *5*, 1715 (1997).
33. Charlton J. L.: J. Nat. Prod. *61*, 1447 (1998).
34. Gnabre J. N., Brady J. N., Clanton D. J., Ito Y., Dittmer J., Bates R. B., Huang R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 11239 (1995).
35. Sakurai H., Nikaido T., Ohmoto T., Ikeya Y., Mitsuhashi, H.: Chem. Pharm. Bull. *40*, 1191 (1992).
36. Ghisalberti E. L.: Phytomedicine *4*, 151 (1997).
37. Hwang S. B., Lam M. H., Biftu T., Beattie T. R., Shen T. Y.: J. Biol. Chem. *260*, 15639 (1985).
38. Ichikawa K., Kinoshita T., Nishibe S., Sankawa U.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) *34*, 3514 (1986).
39. Kita S., Matsumura Y., Morimoto S., Akimoto K., Furuya M., Oka N., Tanaka T.: Biol. Pharm. Bull. *18*, 1283 (1995).
40. Umeda-Sawada R., Takahashi N., Igarashi O.: Biosci. Biotechnol. Biochem. *59*, 2268 (1995).
41. Chavali S. R., Zhong W. W., Forse R. A.: Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids *58*, 185 (1998).
42. Fauré M., Lissi E., Torres R., Videla L.: Phytochemistry *29*, 3773 (1990).

43. Vodrážka Z. v knize: *Biochemie* [3], kap. 8.3.2, str. 138. Academia, Praha 1993.
44. Lo Y. C., Teng C. M., Chen C. F., Chen C. C., Hong C. Y.: Biochem. Pharmacol. *47*, 549 (1994).
45. Haraguchi H., Ishikawa H., Shirataki N., Fukuda A.: J. Pharm. Pharmacol. *49*, 209 (1997).
46. Chiu J. H., Ho C. T., Wei Y, H., Lui W. Y., Hong C. Y.: Life Sci. *61*, 1961 (1997).
47. Hikino H., Kiso Y., Taguchi H., Ikeya Y.: Planta Med. *50*, 213 (1984).
48. Ip S. P., Ma C. Y., Che C. T., Ko K. M.: Biochem. Pharmacol. *54*, 317 (1997).
49. Kiso Y., Tohkin M., Hikino H., Ikeya Y., Taguchi H.: Planta Med. *52*, 351 (1985).
50. Slanina J., Paulová H., Táborská E.: Pharm. Pharmacol. Lett. *7*, 53 (1997).
51. Mak D. H. F., Ip S. P., Li P. C., Poon M. K. T., Ko K. M.: Mol. Cell. Biochem. *165*, 161 (1996).
52. Setchell K. D., Lawson A. M., Mitchell F. L., Adlercreutz H., Kirk D. N., Axelson M.: Nature *287*, 740 (1980).
53. Mousavi Y., Adlercreutz H.: J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. *41*, 615 (1992).
54. Slavin J., Jacobs D., Marquart L.: Nutr. Cancer *27*, 14 (1997).
55. Fagoo M., Braquet P., Robin J. P., Esanu A., Godfraind T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *134*, 1064 (1986).
56. Ingram D., Sanders K., Kolybaba M., Lopez D.: Lancet *350*, 990 (1997).
57. Serraino M., Thompson L. U.: Nutr. Cancer *17*, 153 (1992).
58. Sung M. K., Lautens M., Thompson L. U.: Anticancer Res. *18*, 1405 (1998).
59. Evans B. A., Griffiths K., Morton M. S.: J. Endocrinol. *147*, 295 (1995).
60. Wang W., Liu L. Q., Higuchi C. M., Chen H.: Biochem. Pharmacol. *56*, 189 (1998).

J. Slanina *(Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno):* **Biological and Pharmacological Activity of Lignans**

Lignans are secondary plant metabolites consisting of two phenylpropane units. Their antineoplastic, cardiovascular and antioxidant activities are discussed in the review. The podophyllotoxin derivatives etoposide and teniposide are used in medical practice as cytostatics. Enterolactone and enterodiol were identified in serum and urine of mammalians. They are formed as metabolic products of intestinal microflora from plant precursors, acting in the organism as phytoestrogens and probably preventing some types of cancer.

ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY A LEDVINOVÉ ONEMOCNĚNÍ „CHINESE HERBS NEPHROPATHY“

MARIE STIBOROVÁ[a], EVA FREI[b] a HEINZ H. SCHMEISER[b]

[a]Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: stiborov@prfdec.natur.cuni.cz, [b]Institut für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neunenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg

Došlo dne 4.III.1999

Klíčová slova: aristolochové kyseliny, DNA adukty, mechanismus onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

Obsah

1. Úvod
2. Ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“
3. Aristolochové kyseliny, jejich metabolická aktivace a molekulární mechanismus karcinogenního působení
4. Adukty aristolochových kyselin v DNA ledvin pacientek vysvětlují příčinu onemocnění „Chinese herbs nephropathy“
5. Závěr

1. Úvod

Denně jsme z mnoha stran (např. prostřednictvím sdělovacích prostředků) „zavalováni“ plejádou reklam na řadu prostředků majících „zázračné“ účinky na náš zdravotní stav, fyzickou či psychickou kondici, odolnost, výkonnost a pod. Některé svými informacemi lákají rovněž zákazníky mající potřebu snížit svou tělesnou váhu, aby zakoupili… *„zcela účinné a bezpečné prostředky způsobující ztrátu nadbytečných kilogramů bez použití drastických odtučňovacích diet a namáhavých cvičení“*… Často u takových preparátů chybí přesný popis a výčet všech ingrediencí, které jsou v nich obsaženy, většinou jsou charakterizovány pouze některé ze složek. Někde nalezneme stručný popis, že jsou v preparátu přítomny i různé složky, které jsou přírodního např. rostlinného původu, nejsou však přesně specifikovány. Distribuovány a prodávány jsou i bez lékařského předpisu. V současnosti je téměř nemožné vyjmenovat názvy všech takových „léčebných“ prostředků, neboť je často ani nenajdeme v oficiálních seznamech léčivých přípravků, či parafarmaceutik (vitaminosních prostředků, výživových doplňků a pod.) schválených k humánnímu použití. Nedojde-li k případům, že se objeví jejich vedlejší (negativní) účinky je, zdá se, vše v pořádku. Tak se situace prozatím jeví i v naší republice. Informace a zkušenosti ze zahraničí však mluví opačně. Ukazuje se, že zvlášť nebezpečné je používání rozličných rostlin, bylin (buď v uvedených preparátech nebo samostatně), obsahujících látky, u nichž dosud nejsou přesně určeny všechny jejich účinky. Jeden z takových případů byl nedávno popsán nejen ve vědeckých časopisech, ale objevil se, vzhledem k tragickým následkům, i v populárně-naučných časopisech i denním tisku. Tento případ stojí za to, aby o něm byla podrobně informována česká veřejnost jak laická, tak i odborná a dokonce i kompetentní orgány státní správy. Zároveň je tento případ zajímavý i jako problém ryze vědecký, jehož osvětlení může přispět k rozvoji nových poznatků v základním teoretickém výzkumu, zprostředkovaně i pro terapeutické využití.

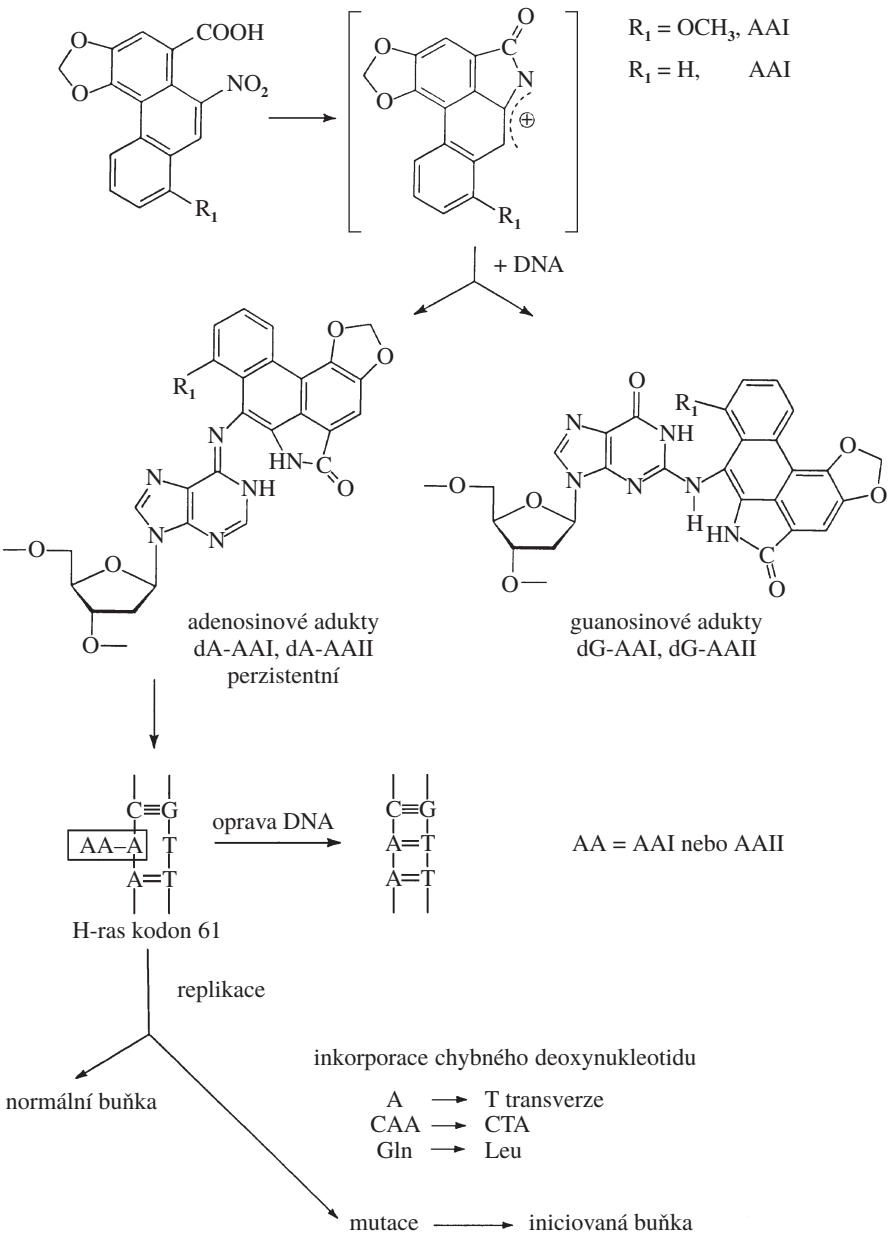
Nedávno přinesly belgické listy, a poté i naše deníky[1,2], zprávu o nebezpečnosti některých rádoby zázračných čínských bylin pro lidské zdraví. V nich se sugestivně líčí smutný osud desítek žen, které se ve snaze zhubnout nechaly zlákat léčebnou kúrou založenou na čínských bylinách obsahující „nefrotoxická“ semena rostliny druhu *Aristolochia*, zničily si ledviny a čelí hrozbě rakoviny. Lze sice kvitovat s povděkem, že o této smutné skutečnosti byla díky tomu informována jak česká veřejnost, tak i kompetentní orgány, bohužel však, vzhledem ke stručnosti zprávy poněkud nedostatečně. A to nejenom po odborné stránce. Trefnému přirovnání situace k thrilleru vyjádřením: „Jde o krutý film se všemi ingrediencemi žánru: zlými chlapy, nezodpovědným okolím a naivními oběťmi“[2] totiž chybělo rozpracování detailu, „špetka“ ponaučení a jiskřička pozitiva či naděje, které v podobných „dílkách“ jindy určitě nalezneme. Scénář thrilleru je tedy nutné doplnit. Za pozitivní lze považovat skutečnost, že vůbec došlo k vysvětlení příčiny uvedeného smutného příběhu, i když až za dva roky po objevení se prvních obětí, a že „léčebný“ postup byl po tomto poznání okamžitě zastaven. Osoby zodpovědné za případ jsou v soudním řízení a podobný „léčebný“ postup již stěží bude v budoucnosti použit (alespoň v Belgii).

2. Ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

V roce 1993 popsal Vanhenwerghen se spolupracovníky výskyt několika případů atypické ledvinové nedostatečnosti (extensive interstitial fibrosis of the kidney without glomerular lesions) u žen žijících v Bruselu a jeho okolí, která vedla až k totálnímu selhání funkce ledvin[3]. Poškození bylo dáno do souvislosti s léčebnou procedurou, které se pacientky podrobily na jedné bruselské klinice, a jež měla vést k redukci jejich tělesné váhy postupem kontrolovaným lékařským dohledem (procedura kontrolovaného hubnutí). Rozsáhlejší studie populace žen žijících v této oblasti uvedenou souvislost potvrdila[3]. Ledvinové poškození bylo označeno podle jedné ze složek „léčebného“ postupu (použity byly čínské byliny, jimiž byla terapie doplněna právě počátkem 90. let) jako „Chinese herbs nephropathy“ (CHN)[3]. V současnosti je již onemocnění zjištěno u více než 100 pacientek[4,5]. Všechny takto postižené ženy užívaly čínské byliny dlouhodobě[4,5]. Prognóza vývoje choroby z hlediska vyléčení není optimistická. U řady pacientek vedlo ledvinové selhání až k transplantaci obou ledvin. Předpokládaný pozitivní výsledek tohoto postupu se však nedosta-

vil. I u těchto žen patologický proces pokračuje, dochází k vývoji nádorového onemocnění, především nádorů močových cest[4,5], vedle toho i srdeční poškození (valvular heart disease)[4-6].

Již při prvním výskytu choroby se za její příčinu začala považovat přítomnost rostliny čeledi podražcovitých (*Aristolochiacea*) (*Aristolochia fangchi*) v léčebném přípravku užitém v therapii, k jejímuž přidání došlo pravděpodobně záměnou za rostlinný druh *Stephania tetrandra* vzhledem k podobnosti čínských názvů obou rostlin (*fangchi x fangji*)[3]. Rostliny čeledi *Aristolochiacea* totiž obsahují aristolochové kyseliny, které jsou nefrotoxické a silně karcinogenní[7,8]. Skutečný důkaz potvrzující uvedený předpoklad však chyběl. V roce 1995 byl proto zahájen interdisciplinární výzkum této problematiky (na němž dodnes participují vědecké týmy evropských zemí Německa, Belgie a České republiky), který přinesl velmi brzy dílčí výsledky. Ty vedly k okamžitému zastavení „léčebného" postupu. Výzkum pokračuje nadále, a to nejen z důvodů poznání skutečné příčiny choroby[5,6,9,10], ale i proto, že popsané ledvinové poškození vykazuje nápadnou shodu s chorobou popsanou pod názvem „Balkánská nefropathie"[3,11]. Toto onemocnění postihuje nezanedbatelnou část balkánské populace[3,11]. Příčina „Balkánské nefropathie" není doposud vysvětlena. Předpokládá se, že by mohla být vyvolána konzumací potravin kontaminovaných specifickými látkami přírodního původu balkánským obyvatelstvem. Za jedny z takových látek byly rovněž uvažovány i aristolochové kyseliny, z dalších pak některé mykotoxiny[3].



Obr. 1. **Molekulární mechanismus karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami**

3. Aristolochové kyseliny, jejich metabolická aktivace a molekulární mechanismus karcinogenního působení

Aristolochové kyseliny jsou strukturně podobné nitrofenantrenové kyseliny (obr. 1). Aristolochová kyselina I a aristolochová kyselina II se liší pouze methoxyskupinou ve své molekule (obr. 1). Do roku 1982 byly používány farmaceuticky, jako součást protizánětlivých léků, po zjištění jejich toxicity a karcinogenity[7,8] byly z farmaceutického trhu prakticky vyloučeny. Obě kyseliny jsou mutagenními sloučeninami[12]. Metabolické studie prokázaly, že majoritními metabolity aristolochových kyselin tvořenými *in vitro* a *in vivo* jsou redukční produkty aristolaktam I a aristolaktam II, jež byly detegovány jak v konjugované, tak i nekonjugované formě v moči a výkalech savců včetně člověka[13,14].

Aktivace aristolochových kyselin na ultimální karcinogeny (ultimální toxikanty) probíhá rovněž redukční cestou[14-16]. V průběhu redukce obou kyselin dochází ke vzniku reaktivního cyklického acylnitreniového iontu, který se váže na DNA a tvoří dva majoritní adukty jak v experimentech *in vitro*, tak i u experimentálních zvířat *in vivo*[14-17]. Jde o adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem [7-(deoxyadenosin-N^6-yl)--aristolaktam (dA-AA) a 7-(deoxyguanosin-N^2-yl)aristolaktam (dG-AA)][14-17] (obr. 1). Aristolochová kyselina I je ve vyvolání tvorby aduktů efektivnější než aristolochová kyselina II (cit.[14-17]). K detekci a identifikaci aduktů tvořených z aristolochových kyselin byla využita vysoce senzitivní Randerathova metoda (^{32}P-postlabelling)[18-20]. Jejím prostřednictvím byl odhalen i vztah mezi perzistencí aduktů a karcinogenním účinkem aristolochových kyselin. Na rozdíl od doby přetrvání aduktu 7-(deoxyguanosin-N^2-yl)-aristolaktamu I v DNA různých orgánů experimentálních zvířat (potkanů), která nebyla delší než dva týdny, perzistence aduktů s deoxyadenosinem (dA-AAI) byla dlouhodobá[10,22]. Uvedená skutečnost signalizuje, že dlouhodobá perzistence deoxyadenosinového aduktu může být kritickým prekarcinogenním stavem (lézí v DNA), který je zodpovědný za iniciaci karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami. Cílovým genem karcinogenese vyvolané aristolochovou kyselinou I u laboratorních potkanů je *c*-H-*ras* gen[23,24]. Studie aktivačních mutací v onkogenech nalezených v nádorech indukovaných aristolochovou kyselinou totiž prokázala vysokou incidenci (90–100 %) mutací ve druhé pozici kodonu 61 (CAA) *c*-H-*ras* genu (AT → TA transverse)[23,24]. Schéma molekulárního mechanismu karcinogenese vyvolané aristolochovými kyselinami u laboratorních potkanů je uvedené na obrázku 1.

Prokázání, že choroba „Chinese herbs nephropathy“ má přímou souvislost s aristolochovými kyselinami z čínských bylin užitých v „léčebném“ postupu, nebylo jednoduché.

4. Adukty aristolochových kyselin v DNA ledvin pacientek vysvětlují příčinu onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

Analýza rostlinného materiálu importovaného do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra* prokázala přítomnost obou aristolochových kyselin v testovaném rostlinném preparátu[10]. Tento nález silně podpořil počáteční předpoklad, že původ onemocnění vyplývá ze záměny rostliny *S. tetrandra* za jinou čínskou bylinu *Aristolochia fangchi*, o které je známo, že obě tyto kyseliny obsahuje[25,26]. Klíčem k důkazu iniciace choroby „Chinese herbs nephropathy“ (a následného vývoje nádorového onemocnění) byla však až analýza DNA izolované z biologického materiálu postižených pacientek.

Jak je známo, v iniciační fázi procesu chemické kancerogeneze dochází k rozličným modifikacím molekul DNA. Tvorba kovalentních aduktů s karcinogenem je z hlediska iniciace kancerogeneze považována za modifikaci nejvýznamnější[27-30]. Užitím metody „^{32}P-postlabellingu“, která se prokázala extrémně výhodnou pro monitorování tvorby aduktů vyvolaných aristolochovými kyselinami *in vitro* a *in vivo* (viz výše uvedené), byly v DNA ledvin (získaných po transplantaci) a močové trubice odebrané pacientkám, detegovány identické adukty s adukty produkovanými aristolochovými kyselinami *in vitro* a v orgánech experimentálních zvířat *in vivo* (dA-AAI, dG-AAI a dA-AAII)[10,31,32]. Navíc, analogicky jako v experimentech s laboratorními zvířaty, majoritní adukt (dA--AAI) vykazuje extrémně dlouhou dobu perzistence i u člověka (tedy žen trpící chorobou Chinese herbs nephropathy)[10]. V DNA močové trubice byl nalezen také další adukt, jehož původ je v aristolochových kyselinách. Jde o adukt tvořený z „detoxikačního“ metabolitu aristolochové kyseliny I (aristolaktamu I) aktivovaného jednoelektronovou oxidací cytochromy P450 (CYP)[33,34]. Nalezení uvedených aduktů potvrdilo přímou souvislost aristolochových kyselin s iniciací patologických procesů provázejících chorobu „Chinese herbs nephropathy“. Poskytuje rovněž vysvětlení nárůstu nádorových onemocnění močových cest, který je u pacientek (dokonce i po transplantaci poškozených ledvin) pozorován. Aristolochové kyseliny jsou totiž tím, že tvoří adukty v DNA přímo zodpovědné za produkci primárních karcinogenních lézí v postižených orgánech. Důkaz je tedy na stole. Výzkumná práce však tímto poznáním nekončí. Prokázání původu choroby je dále potvrzováno analýzami DNA dalších pacientek, u kterých poškození ledvin vyvolává nutnost transplantace ledvin. Doposud detegování aduktů rezultujících z aristolochových kyselin v analyzované DNA ledvin postižených žen neselhalo. Naopak v DNA ledvin pacientů trpících jinými ledvinovými onemocněními takové adukty nikdy nalezeny nebyly[10]. Souvislost aristolochových kyselin ze „zaměněných“ čínských bylin s vývojem nového ledvinového onemocnění (a tím i s nezodpovědností osob zapletených jakýmkoliv způsobem do případu) se stává jistotou…

5. Závěr

I po poznání příčiny choroby „Chinese herbs nephropathy“ zůstává ještě řada otazníků, jejichž vyřešení je podmínkou ke zlepšení prognózy vývoje onemocnění, jakož i k návrhům vedoucím k prevenci podobných případů. Jednou z otázek, která je důležitá z vědeckého hlediska je skutečnost, že se choroba projevila pouze u několika procent „léčených“ žen (naštěstí). Je to dáno rozdílnou výbavou enzymovými systémy, které aktivují či detoxikují aristolochové kyseliny, nebo opravných enzymů (systémů) odstraňující modifikované úseky v DNA, či snad ochranou specifických genů, jejichž modifikací je iniciován proces karcinogeneze vyvolaný aristolochovými kyselinami? To jsou otázky, které se nabízejí a lákají

odbornou veřejnost k podrobnému prozkoumání. Jejich vyřešení má význam i daleko širší. Praktický význam tkví v předvídání rizik pro lidskou populaci, které vyplývají z používání jak některých přírodních léčiv, tak i léčiv s dosud ne přesně známým mechanismem účinku. Teoretický význam má pro poznání působení enzymů a potenciální participace metabolického polymorfismu na iniciačních fázích chemické karcinogeneze, dále pak i pro poznání molekulárně biologických aspektů těchto procesů. Proto výzkum této unikátní problematiky pokračuje v interdisciplinárním rámci i nadále.

A zpět ke thrilleru, ke kterému byla celá katastrofa přirovnána. Ponaučení z příběhu nechybí. Příčina, proč k onemocnění došlo je totiž mementem pro laickou veřejnost; nepodléhat střídavě se objevujícím „módním" vlnám o „zázračnosti" určitých přírodních preparátů či postupů, které však při střízlivém pohledu (či přesném zhodnocení) zavánějí šarlatánstvím. Je navíc vykřičníkem pro orgány státní správy povolující dovoz a distribuci obdobných preparátů i v ČR. Vždyť k chybnému použití nebezpečného rostlinného druhu došlo nejen při výrobě v zemi původu, ale …dovozce a distributor se provinili „jen" tím, že věřili složení uvedenému na obalu a nedali látku preventivně analyzovat[2].

Autoři děkují za podporu Německému centru výzkumu rakoviny a grantům GA ČR (303/99/0893) a MŠMT ČR (VS 96141).

LITERATURA

1. Anonym: Mladá fronta DNES *IX/109*, 7 (1998).
2. Anonym: Právo *8(109)*, 8 (1998).
3. Vanherweghem J.-L., Depierreux M., Tielemans C., Abramowicz D., Dratwa M., Jadoul M., Richard C., Vandervelde D., Verbeelen D., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M.: Lancet *341*, 387 (1993).
4. Violon C.: Pharm. Belg. *52*, 7 (1997).
5. Vanherweghem J.-L.: J. Altern. Complement. Med. *4*, 9 (1998).
6. Vanherweghem J.-L.: Lancet *350*, 1858 (1997).
7. Mengs U., Lang W., Poch J. A.: Arch. Toxicol. *51*, 107 (1982).
8. Mengs U.: Arch. Toxicol. *61*, 504 (1988).
9. Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., But P., Vanherweghem J.-L.: Am. J. Kidney Dis. *343*, 174 (1994).
10. Bieler C.-A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P. van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H. H.: Carcinogenesis *18*, 1063 (1997).
11. Stefanovic V., Polenakovic M. H.: Am. J. Nephrol. *10*, 1 (1990).
12. Schmeiser H. H., Pool B. L., Wiessler M.: Cancer Lett. *23*, 97 (1984).
13. Krumbiegel G., Hallensleben J., Meunicke W., Rittman N., Roth M. J.: Xenobiotica *17*, 981 (1987).
14. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Carcinogenesis *11*, 313 (1990).
15. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Chem. Res. Toxicol. *4*, 581 (1991).
16. Stiborová M., Fernando R. C., Schmeiser H. H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: Carcinogenesis *15*, 1187 (1994).
17. Schmeiser H. H., Frei E., Wiessler M., Stiborová M.: Carcinogenesis *18*, 1055 (1997).
18. Randerath K., Reddy M. V., Gupta R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *78*, 6126 (1981).
19. Gupta R. C., Early K.: Carcinogenesis *9*, 1687 (1988).
20. Reddy M. V., Randerath K.: Carcinogenesis *7*, 1543 (1986).
21. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: Chem. Listy *92*, 661 (1998).
22. Fernando R. C., Schmeiser H. H., Scherf H. R., Wiessler M., in: *Postlabelling Methods* for *Detection of DNA Adducts* (Phillips D. H., Castegnaro M., Bartsch H., ed.), IARC Scientific Publications *124*, str. 167. IARC Lyon 1993.
23. Schmeiser H. H., Janssen J. W. G., Lyons J., Scherf H. R., Pfau W., Buchmann A., Bartram C. R., Wiessler M.: Cancer Res. *50*, 5464 (1990).
24. Schmeiser H. H., Scherf H. R., Wiessler M.: Cancer Lett. *59*, 139 (1991).
25. Priestap S. M.: Phytochemistry *24*, 849 (1985).
26. Zhu M., Phillipson J. D.: Int. J. Pharmacognosy *34*, 283 (1996).
27. Bishop J.: Cell *64*, 235 (1991).
28. Harris C.: Cancer Res. *51*, 5023 (1991).
29. Aaronson S.: Science *254*, 1146 (1991).
30. Hemminki K.: J. Occup. Environ. Med. *37*, 44 (1995).
31. Schmeiser H. H., Bieler C. A., Wiessler M., van Ypersele de Strihou C., Cosyns J.-P.: Cancer Res. *56*, 2025 (1996).
32. Schmeiser H. H., Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., van Ypersele de Strihou, Cosyns J.-P.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. *37*, 98 (1996).
33. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M: Collect. Czech. Chem. Commun. *60*, 2189 (1995).
34. Stiborová M., Frei E., Breuer A., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: Exp. Toxic. Pathol. *51*, 421 (1999).

M. Stiborová[a], E. Frei[b], and H. H. Schmeiser[b] *([a]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, [b]Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany):* **Aristolochic Acids and a Renal Disease – Chinese Herbs Nephropathy**

The review describes an explanation of the molecular mechanism of a unique type of renal fibrosis, designated as Chinese herbs nephropathy (CHN). So far, over 100 patients have been identified, all of them followed a slimming regimen with the prolonged use of Chinese herbs. Using the ^{32}P-postlabelling method, three specific DNA adducts derived from aristolochic acids (AA) were detected in renal tissues of patients with CHN. The AA-specific adduct pattern was also found in a ureter obtained from a CHN patient after renal transplantation. The data indicate that AA are involved in CHN providing an explanation for the increasing number of urothelial carcinomas reported in patients with CHN.

TAXANY – PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA S UNIKÁTNÍM MECHANISMEM ÚČINKU

LUCIE BOŘEK-DOHALSKÁ a MARIE STIBOROVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2, e-mail: Dohalska@yahoo.com

Došlo dne 6.V.1999

Klíčová slova: mechanismus účinu taxanů, metabolismus taxanů, cytochrom P450

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus účinu taxanů
3. Metabolismus taxanů
   3.1. Metabolismus paclitaxelu
   3.2. Metabolismus docetaxelu
4. Závěr

1. Úvod

Taxany (taxoidy) reprezentují novou skupinu látek s výrazným protinádorovým účinkem. Dnes patří mezi jedny z nejdůležitějších cytostatik používaných v kombinované chemoterapii, především k léčbě karcinomů prsu a ovaria. Zkoušejí se též v léčbě nádorů plic, tlustého střeva, pankreatu a žaludku[1-4]. První sloučeninou s taxanovým kruhem, u které byla prokázaná protinádorová aktivita, je paclitaxel (obr. 1). Ten byl poprvé extrahován z kůry pacifického tisu *Taxus brevifolia* již v roce 1963. Vzhledem k náročnému způsobu extrakce však jeho preklinické a klinické testování nepokračovalo řadu let. Teprve práce, které poukázaly na jeho mimořádný a u jiných cytostatik dosud nepopsaný mechanismus protinádorového účinku, podnítily zájem o jeho další studium[5,6]. V roce 1992 bylo zjištěno, že paclitaxel není produkován přímo tisem, ale jeho zdrojem je endofytická houba *Taxomyces andrenae*. V průběhu dalších let se z necytotoxického prekursoru, 10-deacetyl baccatinu III, extrahovaného z jehličí *Taxus baccata* L., podařilo polosynteticky připravit další významný taxan – docetaxel[6,7].

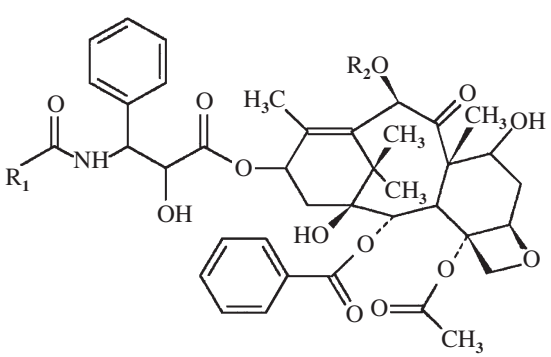
V předkládaném přehledu jsou uvedeny poznatky o specifickém mechanismu působení obou výše uvedených taxanů jako protinádorových léčiv, a navíc i o jejich metabolismu. Poznání metabolických cest, včetně produktů biotransformačních reakcí obou taxanů, je nezbytné z hlediska možné potenciace jejich farmakologického účinku, jakož i snížení jejich vedlejšího (toxického) působení.

2. Mechanismus účinku taxanů

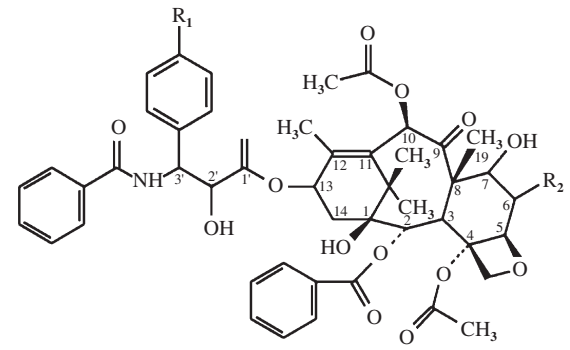
Taxany patří mezi tzv. mitotické jedy, látky působící cytotoxicky v průběhu mitózy[2]. Cílovým místem účinku taxanů v eukaryotické buňce jsou mikrotubuly, organely s důležitou buněčnou funkcí. Klíčovou roli mikrotubuly hrají v pohybu chromosomů během mitózy, participují i na regulaci buněčné morfologie, přeměně signálů mezi povrchovými membránovými receptory a jádrem, ukotvení receptorů v membráně a buněčné motilitě. Mikrotubuly jsou tvořeny z tubulinu, proteinu který se skládá ze dvou podjednotek, α a β. Tubulin se formuje střídavým řazením obou podjednotek (α a β) do protofilament. Třináct protofilament vytváří mikrotubulus[3]. Za normálních podmínek existuje v buňce rovnováha mezi volným tubulinem a tubulinem vázaným v mikrotubulech. Uvedená rovnováha je kontrolována různými biochemickými entitami a proteiny, např. MAPs (microtubule associated proteins) a může být ovlivněna i různými xenobiotiky[5,6,8,9].

Až dosud byly popsány dva odlišné mechanismy účinku protinádorových léčiv ovlivňujících stabilitu mikrotubulů. Taxany tvorbu mikrotubulů urychlují. Stabilizují již vytvořené mikrotubuly a brání jejich depolymerizaci, čímž blokují průběh mitózy[2,10,11]. Toto je efekt pro taxany unikátní. Jiné mitotické jedy s protinádorovou aktivitou, vinca alkaloidy (vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin), totiž naopaktvorbu mikrotubulů inhibují[5]. Přesto funkční důsledky obou procesů jsou do značné míry podobné[2]. Docetaxel je účinnější stabilizátor mikrotubulů a inhibitor jejich depolymerizace než paclitaxel[6,8]. Docetaxel má totiž v důsledku větší rozpustnosti větší afinitu k mikrotubulům než paclitaxel.

Taxany působí v různých fázích buněčného cyklu: docetaxel je nejvíce aktivní v S fázi, zatímco paclitaxel je převážně aktivní v G_2/M fázi[12,13]. Je pravděpodobné, že dalším mechanismem účinku taxanů je indukce programované smrti buňky – apoptózy. Tlumí totiž expresi onkogenu bcl-2, kódujícího protein vnitřní membrány mitochondrií, který apoptózu inhibuje. Přesný mechanismus indukce apoptózy však doposud není znám[2,5].



Obr. 1. **Strukturní vzorec taxanů**; a) paclitaxel: $R_1 = -C_6H_5$, $R_2 = -COCH_3$; b) docetaxel: $R_1 = -OC(CH_3)_3$, $R_2 = -H$



Sloučenina	R_1	R_2
Paclitaxel	–H	–H
6α-Hydroxypaclitaxel	–H	–OH
3´-(*p*-Hydroxyfenyl)paclitaxel	–OH	–H
Dihydroxypaclitaxel	–OH	–OH

Obr. 2. **Schéma metabolismu paclitaxelu v lidském organismu** (modifikováno podle cit.[14,19,25])

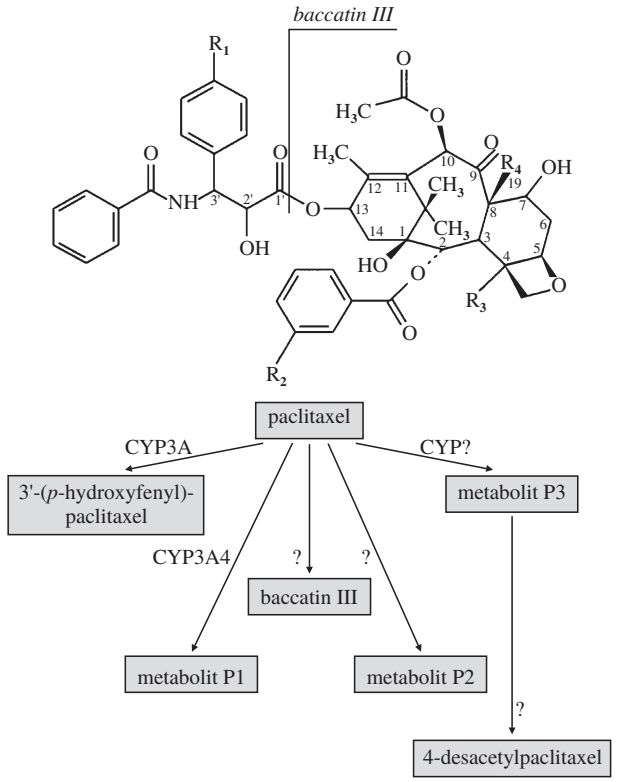
3. Metabolismus taxanů

3.1. Metabolismus paclitaxelu

Hlavní cesty přeměny paclitaxelu v lidském organismu se liší od metabolismu v experimentálních zvířatech[4,5,14]. Ve žluči pacientů, kterým byl podáván paclitaxel, bylo nalezeno šest metabolitů tohoto léčiva[14]. Hlavním metabolitem je zde 6α-hydroxypaclitaxel. 3´-(*p*-Hydroxy-fenyl)paclitaxel a dihydroxypaclitaxel jsou minoritními metabolity[4,5] (obr. 2). 6α--Hydroxypaclitaxel a 3´-(p-hydroxyfenyl)paclitaxel vznikají i v experimentech *in vitro*, při inkubaci s lidskými jaterními mikrosomy[12,14].

Ve žluči potkanů bylo ve studiích *in vivo* detegováno devět metabolitů[14], z nichž bylo pět identifikováno. Dvěma základními metabolity jsou fenolické sloučeniny, 3´-(*p*-hydroxy-fenyl)paclitaxel a metabolit označovaný jako P1. Baccatin III, který vzniká hydrolýzou C13 esterové skupiny postranního řetězce paclitaxelu a C19 hydroxylovaný produkt (metabolit P2) jsou minoritními metabolity paclitaxelu[5,14]. Slatter se spolupracovníky[15] objevili další metabolit, kterým je paclitaxel hydroxylovaný na acetylu v poloze 4 (metabolit P3). Ten podléhá deacetylaci za vzniku 4-deacetyl paclitaxelu (obr. 3). V experimentech *in vitro* (inkubace s jaterními mikrosomy nebo hepatocyty potkana) vznikají dvě fenolické sloučeniny a dva metabolity, jejichž struktura zatím nebyla určena[16].

Oxidace paclitaxelu v lidském organismu i experimentálních zvířatech je velmi účinná. Pouze malé množství nezměněného paclitaxelu je vylučováno močí (10 %) nebo faeces



Sloučenina	R_1	R_2	R_3	R_4
Paclitaxel	–H	–H	$–OCOCH_3$	$–CH_3$
3´-(*p*-Hydroxyfenyl)-paclitaxel	–OH	–H	$–OCOCH_3$	$–CH_3$
Metabolit P1	–H	–OH	$–OCOCH_3$	$–CH_3$
Metabolit P2	–H	–H	$–OCOCH_3$	$–CH_2OH$
Metabolit P3	–H	–H	$–OCOCH_2OH$	$–CH_3$
4-Deacetyl paclitaxel	–H	–H	–H	$–CH_3$
Baccatin III	viz vzorec			

Obr. 3. **Schéma metabolismu paclitaxelu u potkana** (modifikováno podle cit.[14])

(12 %), většina léčiva je však vylučována ve formě metabolitů, především cestou exkrece do žluči (71 %)[14,16]. Eliminace paclitaxelu z plazmy má dvoufázový průběh[2,17]. První fáze, kdy dochází k rychlému poklesu odpovídá distribuci tohoto cytostatika do tkání, druhá, pomalá fáze, odpovídá postupnému uvolňování paclitaxelu z periferního „poolu“[2,18].

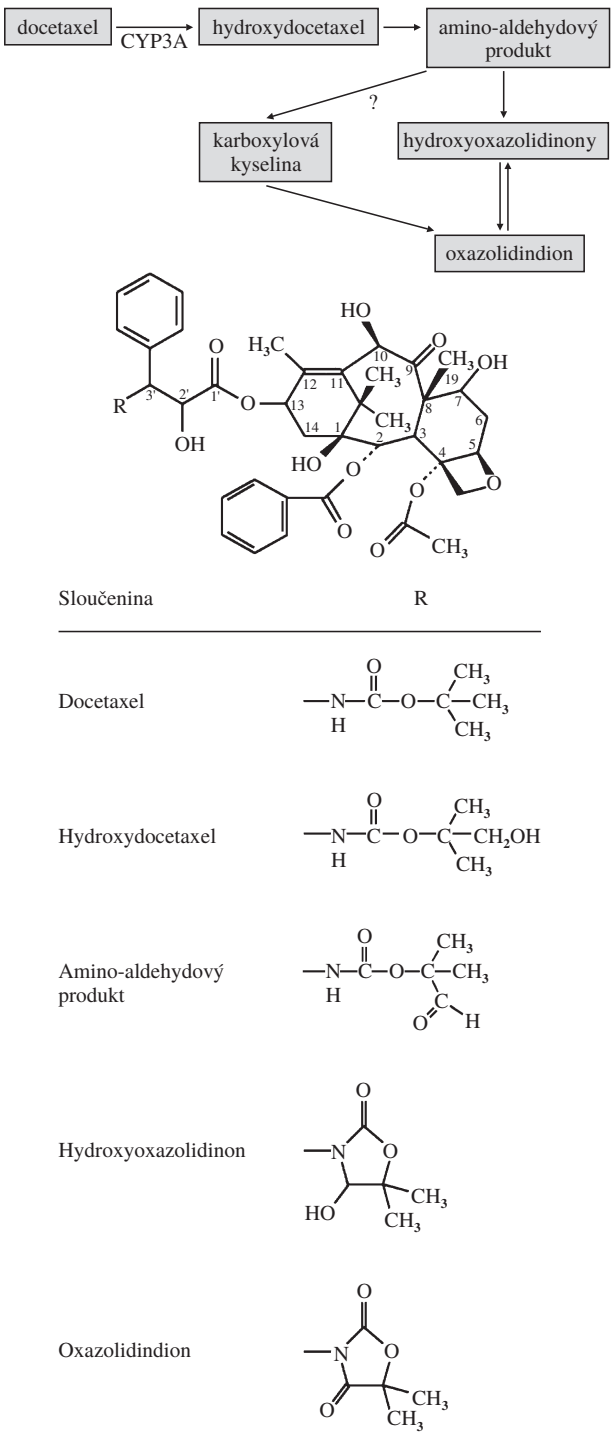
Hlavními enzymy katalyzujícími přeměnu paclitaxelu jsou jaterní cytochromy P450 (CYP)[4,5,12]. V lidském organismu se 6α-hydroxypaclitaxel tvoří pouze v přítomnosti isoformy CYP2C8 (cit.[19]) (obr. 2), zatímco minoritní fenolické sloučeniny vznikají za katalýzy formy CYP3A (cit.[12]). U potkanů za metabolismus paclitaxelu zodpovídá CYP3A (cit.[16]) (obr. 3). Zda jsou metabolity paclitaxelu farmakologicky více účinné nebo zda je toto léčivo metabolismem inaktivováno (ztrácí biologickou účinnost) není doposud známo[14].

3.2. Metabolismus docetaxelu

Na rozdíl od paclitaxelu jsou metabolity docetaxelu detegované u člověka i potkana shodné. Navíc ani metabolické

studie *in vivo* prováděné s dalšími experimentálními zvířaty (myš, králík a pes), neukázaly žádné rozdíly v biotransformaci docetaxelu mezi těmito živočišnými druhy a člověkem. Proto jsou tato experimentální zvířata vhodným modelem pro studium lidského metabolismu docetaxelu[8,10].

Hlavní cestou metabolismu docetaxelu *in vivo* je hydroxylace terc. butylové skupiny na C-13 uhlíku postranního řetězce. V reakci vzniká hydroxydocetaxel, který se dále oxiduje a cyklizuje přes nestálý aldehyd na dva izomerické hydroxyoxazolidinony. Hydroxydocetaxel se také může oxidovat přes nestálou karboxylovou kyselinu na oxazolidindion[5,9,10](obr. 4). U docetaxelu nebyly detegovány metabolity vznikající modifikací taxanového kruhu, které byly nalezeny u paclitaxelu[8]. Je tedy zajímavé, že přestože oba taxany patří do stejné skupiny diterpenů, mají neočekávaně rozdílné metabolity. V experimentech *in vitro* nalezl Marre se spolupracovníky[9] všechny čtyři metabolity docetaxelu, které byly izolované *in vivo* (inkubace s lidskými jaterními mikrosomy). Naopak Royer se spolupracovníky[10] detegoval při inkubaci docetaxelu s lidskými jaterními mikrosomy pouze hydroxydocetaxel. Při inkubaci s mikrosomy myši nalezl Feenstra se spolupracovníky[20] dva metabolity docetaxelu, hydroxydocetaxel a hydroxyoxazolidinon. Uvedené rozdíly jsou zřejmě dány rozdílnými experimentálními podmínkami (různá množství enzymu a docetaxelu, různý způsob detekce a tím i rozdílná citlivost metody).



Obr. 4. **Schéma metabolismu docetaxelu v lidském organismu a u laboratorních zvířat** (modifikováno podle cit.[11,15])

Eliminace docetaxelu je třífázová, s poločasy 4 minuty, 36 minut a 11hodin[2,3]. Nezměněný docetaxel, podobně jako paclitaxel, se vylučuje do stolice převážně žlučí (10 %)[11], částečně i žaludeční sekrecí[2], naopak až 75 % léčiva je vyloučeno stolicí ve formě metabolitů[11]. Močí se vyloučí pouze 5–7 % původního cytostatika[2,3].

Jako u paclitaxelu byly i u docetaxelu prokázány jaterní cytochromy P450 jako hlavní enzymy katalyzující jeho přeměnu[5,9-11]. CYP3A byl identifikován jako enzym zodpovědný za metabolismus docetaxelu u člověka a potkana[10,21,22] (obr. 4). Bylo zjištěno, že metabolity docetaxelu jsou méně terapeuticky účinné než samotná látka[9,11].

4. Závěr

Objevení dvou zástupců taxanů jako protinádorových léčiv se specifickým mechanismem účinku přispělo nejen k významnému rozvoji protinádorové terapie, ale i k teoretickému poznání, které biochemické pochody jsou pro vývoj nádorových onemocnění letální.

Pilotní experimenty sledující metabolismus docetaxelu vysoce efektivními enzymovými systémy *in vitro*, signalizují vznik ještě dalších produktů, než jsou metabolity, které již byly identifikovány dříve[23,24]. Další detailní poznání metabolismu paclitaxelu a docetaxelu spolu s poznáním potenciace či snížení jejich farmakologického účinku je tedy vysoce žádoucí. Může totiž přispět k efektivnějšímu terapeutickému využití protinádorových léčiv na bázi taxanů.

Autorky děkují za podporu grantům IGA MZ (10850-5) a MŠMT ČR (VS 96 141).

LITERATURA

1. Anderson C. D., Wang J., Kumar G. N., McMillan J. M., Walle U. K., Walle T.: Drug. Metab. Dispos. *23*, 1286 (1995).
2. Klener P.: Remedia *5*, 154 (1995).
3. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*. Galén, Praha 1996.

4. Kumar G. N., Walle U. K., Walle T.: J. Pharmacol. Experim. Ther. *268*, 1160 (1993).
5. Monsarrat B., Royer I., Wright M., Cresteil T.: Bull. Cancer *84*, 125 (1997).
6. Verweij J., Clavel M., Chevalier D.: Ann. Oncol. *5*, 495 (1994).
7. Guéritte-Voegelein F., Guénard D., Lavlle F., Le Goff M. T., Mangatal L., Potier P.: J. Med. Chem. *34*, 992 (1991).
8. Bissery M. C., Nohynek G., Sanderink G. J., Lavelle F.: Anti-Cancer Drugs *6*, 339 (1995).
9. Marre F., Sanderink G. J., de Sousa G., Gaillard C., Martinet M., Rahmani R.: Cancer Res. *56*, 1296 (1996).
10. Royer I., Monsarrat B., Sonnier M., Wright M., Cresteil T.: Cancer Res. *56*, 58 (1996).
11. Sparreboom A., Tellingen O, Scherrenburg E. J., Boesen J. J. B., Huizing M. T., Nooijen W. J., Versluis C., Beijnen J. H.: Drug Metab. Dispos. *24*, 655 (1996).
12. Harris W. J., Rahman A., Kim B. R., Guengerich F. P., Collins J. M.: Cancer Res. *54*, 4026 (1994).
13. Hennequin C. G., Giocampi N., Favaudon V.: *5th International Congress on Anti-Cancer Chemotherapy, Paris 1995*, Abstr. 175.
14. Park H., Hepperle M., Boge T. C., Himes R. H., Georg G. I.: J. Med. Chem. *39*, 2705 (1996).
15. Slatter G., Feenstra K. L., Mattern S. J., Waggoner D. J., Northup J. J., Feller C. J., DeKoning T. F., McGovren J. P.: *6th European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics, Gothenburg 1997*, Abstr. 181.
16. Walle T., Kumar G. N., McMillan J. M., Thornburg K. R., Walle U. K.: Biochem. Pharmacol. *46*, 1661 (1993) .
17. Rowinsky E. K., Eisenhauer E. A., Chaudhry V.: Semin. Oncol. 20, Suppl. *3*, 16 (1993).
18. Rowinsky E. K., Donehover N. C.: Semin. Oncol. 20, Suppl. *3*, 16 (1993).
19. Rahman A., Korzekwa K. R., Grogan J., Gonzales F. J., Harris J. W.: Cancer Res. *54*, 5543 (1994).
20. Feenstra K. L., Hauer M. J., Slatter J. G.: *6th European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics, Gothenburg 1997*, Abstr. 182.
21. Clarke S. J., Rivory L. P.: Clin. Pharmacokinet. *36*, 99 (1999).
22. Sanderink, G. J., Martinet, M., Touzet, A., Chapelle, P., Frydman, A.: *5th European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics, Tours 1993*, Abstr. 35.
23. Pospíšilová L.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 1998.
24. Gut I., Pospíšilová L., Souček P., Danielová V., Holubová, J., Klučková, H.: *12th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Montpellier 1998*, Abstr. 212.
25. Cresteil T., Monsarrat B., Alvinerie P., Tréluyer J. M., Vieira I., Wright. M.: Cancer. Res. *54*, 386 (1994).

L. Bořek-Dohalská and M. Stiborová *(Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague):* **Taxanes – Anticancer Drugs with Unique Mechanism of Action**

Taxanes (taxoids) are a new group of compounds with a significant anticancer activity. These compounds are mainly used for therapy of breast and ovarian cancer. Paclitaxel and docetaxel, two representatives of these anticancer drugs, are natural products extracted from *Taxus brevifolia* and *T. baccata* L., respectively. Taxanes exhibit a unique mechanism of action. They prevent depolymerization of microtubules, important proteins in cell proliferation. Taxanes rank among the so-called mitotic poisons: docetaxel is mainly active in the S phase, while paclitaxel in the G_2/M phase of the cell cycle. Metabolism of paclitaxel in humans is different from that in experimental animals. Major human metabolite of paclitaxel is 6α-hydroxypaclitaxel. Formation of this metabolite is catalyzed by CYP2C8, while the CYP3A subfamily mediates formation of minor metabolites of paclitaxel. Docetaxel is metabolized in humans and rats in the same way; therefore, rats are a suitable model for studies of docetaxel metabolism in humans. The major metabolite is hydroxydocetaxel. CYP3As were identified as the enzymes participating in metabolism of docetaxel in both species. The review summarizes data concerning the mechanism of action of taxanes and their metabolism. Additional information on metabolic transformation of these anticancer drugs may serve for potential improvement of their chemotherapeutic efficiencies.

JEDY ŽAB ČELEDI *DENDROBATIDAE* – INSPIRACE PRO BIOORGANICKOU CHEMII

JIŘÍ PATOČKA[a], MARIA CRISTINA ARDILA[b] a MARIO VÍCTOR VÁZQUEZ[c]

[a]Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, 500 01 Hradec Králové, patocka@pmfhk.cz, [b]Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 7495, Santafé de Bogotá, Colombia, mcardila@ciencias.ciencias.unal.edu.co, [c]Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Apartado Aireo 1226, Medellin, Colombia, mvazquez@matematicas.udea.edu.co

Došlo dne 1.VII.1999

Klíčová slova: toxin, žába, *Dendrobatidae*

Úvod

Některé druhy žab mají v kůži, zejména na hřbetě a na hlavě, četné jedové žlázy, z nichž vylučují vazký jedovatý sekret. Mezi nejjedovatější druhy patří drobné žáby čeledi *Dendrobatidae*, které obývají tropické deštné pralesy Jižní a Střední Ameriky. Jejich jasné barvy, ve kterých převládá červená, modrá, žlutá a oranžová, jsou varovným signálem pro eventuelní predátory a zdá se, že žáby mají v přírodě opravdu jen málo nepřátel. Mají však mnoho obdivovatelů mezi lidmi. Jsou pravými skvosty mezi živočichy, a zejména v poslední době se stávají velmi populární i v Evropě, kde jsou předmětem značného zájmu chovatelů[1]. Hrály a snad ještě i hrají významnou úlohu v životě domorodých indiánů, kteří využívají jejich jedů k lovu menších živočichů, zejména ptáků a opic. Jed těchto žab je velmi účinný a bylo v něm nalezeno velké množství heterocyklických dusíkatých látek. Mnohé z nich jsou nejen velmi toxické, ale mají i zajímavou chemickou strukturu a neméně zajímavé farmakologické účinky. Jsou proto předmětem zájmu mnoha farmaceutických firem i akademických pracovišť. Smyslem tohoto článku je podat stručný přehled dosud izolovaných látek a ukázat, jak inspirativní mohou být pro bioorganickou chemii.

Biologie žab čeledi *Dendrobatidae*

Dnes je známo více než sto druhů žab čeledi *Dendrobatidae*, které se dělí do šesti samostatných rodů: *Dendrobates, Phyllobates, Aromobates, Epipedobates, Minyobates a Colosthethus.* Nové druhy jsou však stále nalézány, jak pokračuje biologický výzkum nových oblastí[2].Tyto žáby jsou obyvateli deštných rovníkových pralesů Jižní a Střední Ameriky a jsou rozšířeny od Nikaragui a Kostariky až po jihovýchodní oblast Brazílie a Bolívie. Některé druhy však žijí i mimo deštný prales, na otevřených savanách a také na kakaových plantážích. Jsou to drobní živočichové, od 1,2 do 5 cm, kteří hýří jasnými barvami. Žába *Dendrobates minutus* se svými 12 mm délky patří mezi nejmenší žáby světa. Jejich barevnost nemá mezi obojživelníky obdoby. Jejich oči však mají vždy černou barvu. Žijí podobně jako jiné stromové žáby na poměrně malém prostoru, který je nejčastěji tvořen tůňkami dešťové vody tvořícími se v broméliích, a jejich nejbližším okolím. Zde kladou samičky několik vajíček, od 1 do 15, a o vylíhlé pulce se potom starají většinou samečci. Vývoj od pulce k dospělé žábě trvá dva až tři měsíce a v průběhu roku žába naklade několik snůšek. Dospělé žáby se živí drobným hmyzem, zejména mouchami a komáry[3].

Žáby čeledi *Dendrobatidae* jako zdroj šípového jedu

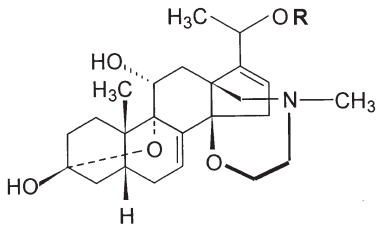
Domorodí obyvatelé deštných pralesů Jižní a Střední Ameriky využívali od pradávna jedovatých sekretů žab čeledi *Dendrobatidae* k napouštění svých šípů, které používají k lovení kořisti pomocí tzv. foukaček. Tento způsob lovu se dosud uchoval mezi kolumbijskými indiány žijícími v oblastech Choco a Noanama. K tomuto účelu je využíváno kolem 20 druhů žab. Za nejjedovatější jsou považovány *Phyllobates terribilis*, *P. aurotoenia* a *P. bicolor.* Žába *P. terribilis,* žijící v Kolumbii v oblasti Chaco je extrémě jedovatá a jed z jedné dospělé žáby je schopen usmrtit až dva tisíce myší[4]. Je to zřejmě nejjedovatější tvor na Zemi. Jen o něco méně jedovatá je žába *P. bicolor*. Obě žáby jsou velké asi 2 cm a mají kovově zlatožlutou barvu, kombinovanou s černou, která je na nohou. Při výrobě šípového jedu postupují domorodci tak, že nabodnou žábu na zašpičatělou větev a otáčejí s ní nad ohněm. Do lepkavé tekutiny, kterou žába vylučuje na kůži, namáčejí potom hroty svých šipek používaných do foukaček. Takto připravené šípy jsou neobyčejně účinné a i větší živočichy jsou schopny usmrtit ve velmi krátké době. Jsou také nebezpečné pro člověka. Svou jedovatost si uchovávají až dva roky. Mechanismus jejich toxického účinku spočívá v modulaci různých typů sodíkových kanálů, spřažených s receptory v buněčných membránách[5]. Smrtící efekt většiny žabích jedů je u savců vyvolán zástavou dechu a selháním srdeční činnosti.

Chemické složení jedů

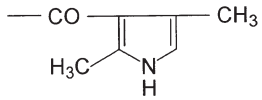
Po chemické stránce byly až dosud prozkoumány jen některé druhy žab čeledi *Dendrobatidae.* Ve všech případech byly jako toxické či jinak farmakologicky účinné látky identifikovány bazické dusíkaté sloučeniny, charakterizované jako živočišné alkaloidy[6,7]. Jsou to zejména batrachotoxiny, pumiliotoxiny, histrionicotoxiny, gephyrotoxin a epibatidin.

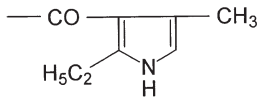
Batrachotoxiny

Batrachotoxiny jsou nejdéle známými a nejvíce prozkoumanými žabími jedy[8]. Jsou to látky se strukturou steroidních alkaloidů a tvoří skupinu podobných sloučenin, jejichž základem je batrachotoxinin A (*I*), poměrně málo toxický (LD_{50} pro myš při s.c. podání je 1 $mg.k^{-1}g$) pregnadienový alkohol s epoxidovým můstkem a oxazepinovým postraním kruhem (obr. 1), jehož estery jako např. batrachotoxin (*II*), homobatrachotoxin



I, R = H

II, R = 

III, R = 

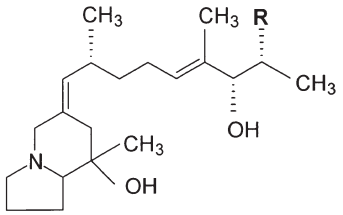
Obr. 1. **Vzorce batrachotoxininu A (*I*), batrachotoxinu (*II*) a homobatrachotoxinu (*III*), hlavních toxických alkaloidů žab rodu Phyllobates**

(*III*), isobatrachotoxin či pseudobatrachotoxin jsou mnohem toxičtější. Nejtoxičtější je batrachotoxin (*II*), tedy batrachotoxinin A, esterifikovaný v pozici 20 kyselinou 2,4-dimethylpyrrol-3-karboxylovou (obr. 1), jehož LD_{50} pro myš při s.c. podání je jen 2 $\mu g.kg^{-1}$ (cit.[9]). Zdrojem batrachotoxinů jsou zejména kolumbijské žáby rodu *Phyllobates* (*P. terribilis, P. bicolor, P. aurotaenia*) a šípový jed z nich připravený, patří mezi nejúčinnější.

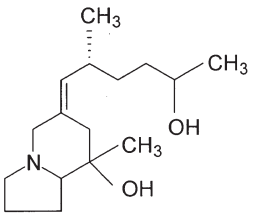
Toxický účinek batrachotoxinů je způsoben jejich vazbou na určité typy sodíkových kanálů savčích buněk, zejména v srdci a mozku, které jejich vlivem zůstávají trvale otevřeny. To vede k depolarizaci excitabilních buněčných membrán[10]. Batrachotoxin je extrémě účinným kardiotoxinem a neurotoxinem[11] s pestrými farmakologickými vlastnostmi. Způsobuje uvolňování acetylcholinu na cholinergních synapsích tím, že destruuje synaptické vesikuly a depolarizuje tak postsynaptickou membránu[10].

Pumiliotoxiny

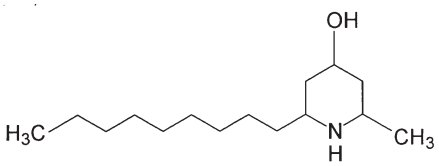
Dalším typem toxických látek žab čeledi *Dendrobatidae* jsou tzv. pumiliotoxiny, izolované z panamské žáby *Dendrobates pumilio*, nalezené však i v jiných druzích žab rodu *Dentrobates*[12,13], ale také např. v australských žábách čeledi *Myobatrachidae*[14] nebo madagaskarských žábách čeledi *Mantellinae* či brazilských žábách čeledi *Bufonidae*[15] . Jsou to zejména deriváty 1-azabicyklo-[4.3.0]-nonanu, které jsou základem pumiliotoxinů řady A a B (obr. 2), jejichž typickými představiteli jsou pumiliotoxin-A (*IV*) a pumiliotoxin-B (*V*)[12,16]. Pumiliotoxiny řady C jsou deriváty dekahydrochinolinu (pumiliotoxin 267C, *VI*) a pumiliotoxiny řady D jsou deriváty piperidinu (pumiliotoxin 241D, *VII*). Pumiliotoxiny se svou jedovatostí téměř vyrovnají batrachotoxinům. Pumiliotoxinů bylo již izolováno několik desítek[17]. Jejich biologický účinek lze charakterizovat jako kardiotoxický[18] a myotonický[19] a je zprostředkován jejich vazbou na napěťově řízené sodíkové kanály[19,20]. Byla připravena řada syntetických derivátů pumiliotoxinů zajímavých farmakologických vlastností, z nichž některé by mohly nalézt uplatnění v humánní medicíně[21]. Mnohé z těchto látek jsou velmi účinnými antagonisty nikotinových receptorů[22].



IV, R = H
V, R = OH

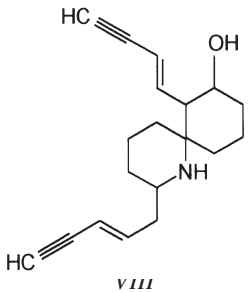


VI

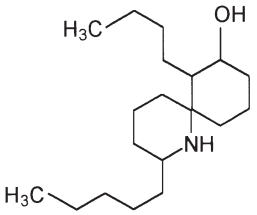


VII

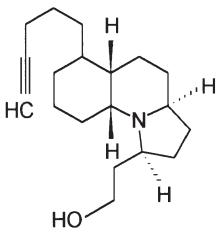
Obr. 2. **Vzorce pumiliotoxinu A (*VI*), pumiliotoxinu B (*V*), pumiliotoxinu 267C (*VI*) a pumiliotoxinu 241D (*VII*), hlavních toxických alkaloidů panamské žáby *Dendrobates pumilio***



VIII



IX

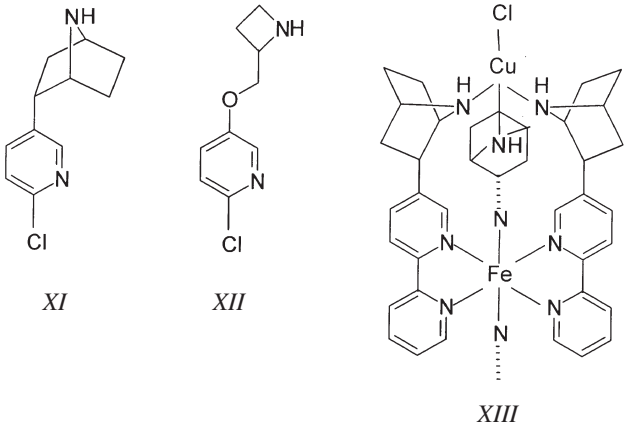


X

Obr. 3. **Vzorce histrionicotoxinu (*VIII*), perhydrohistrionicotoxinu (*IX*) a gephyrotoxinu (*X*), hlavních toxických alkaloidů z jedů kolumbijské žáby *Dendrobates histrionicus***

Histrionicotoxiny

Jinými typy žabích toxinů jsou histrionicotoxin (*VIII*) a perhydrohistrionicotoxin (*IX*), deriváty 1-azaspiro-[5,5]-undekanu (obr. 3), oba izolované z žáby *Dendrobates histrionicus*[23]. Oba alkaloidy se staly důležitým vědeckým nástrojem pro neurovědy při studiu mechanismu transsynaptického vedení nervového vzruchu[24]. Unikátní struktura azaspiro-[5,5]-undekanového skeletu se stala výzvou pro syntetiky a brzy byly připraveny oba opticky čisté alkaloidy i řada jejich derivátů[25-28].



XI *XII* *XIII*

Obr. 4. **Vzorce epibatidinu (*XI*), hlavního alkaloidu ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor*, synteticky připraveného analogu ABT-594 (*XII*) a (pyridylepipatidin)$_3$Cu(I) Fe(II) (*XIII*)**, syntenticky připraveného komplexního derivátu epibatidinu s jednomocnou mědí a dvojmocným železem

Histrionicotoxin i perhydrohistrionicotoxin jsou silnými nekompetitivními blokátory nikotinových receptorů a sodíkových, draslíkových a kalciových kanálů neuronálních membrán[29] a blokují tak vedení nervového vzruchu. Perhydrohistrionicotoxin, podobně jako synteticky připravený oktahydrohistrionicotoxin, mají silný lokálně anestetický účinek[30].

G e p h y r o t o x i n

V jedu žaby *Dendrobates histrionicus* byl také nalezen gephyrotoxin (*X*), alkaloid se strukturou indolizidinu[31] (obr. 3). Gephyrotoxin je relativně netoxický, má však řadu zajímavých farmakologických účinků, souvisejících s jeho působením na iontové kanály, spojené s receptory pro acetylcholin[32,33].

E p i b a t i d i n

V jedu ekvádorské žáby *Epipedobates tricolor,* byl nalezen zajímavý derivát 2-chlorpyridinu, nazvaný epibatidin (*XI*) (obr. 4). Jeho farmakologický výzkum prokázal, že látka je dvěstěkrát účinnějším analgetikem než morfin a že jeho analgetická aktivita není blokována naloxonem[34]. Epibatidin je velmi silným a specifickým agonistou centrálních nikotinových receptorů[35] a [^{3}H]-epibatidin[36,37] a zejména [^{125}I]-epibatidin, který je analogem epibatidinu, v němž je atom chloru nahrazen atomem radioaktivního jodu 125 (cit.[38]), jsou ceněny jako specifické radioligandy těchto receptorů, např. pro autoradiografii. Vysoká analgetická aktivita epibatidinu a jeho strukturní podobnost s nikotinem, probudila zájem farmakologů o agonisty nikotinových receptorů, jako o novou skupinu centrálně účinných analgetik a vrhla nové světlo na studium mechanismu vzniku bolesti. V laboratořích americké farmaceutické firmy Abbott byla připravena řada syntetických analogů epibatidinu, z nichž mnohé vykazovaly vysoký analgetický účinek, ale byly méně toxické než výchozí alkaloid[39,40]. Mezi nejúčinnější patří látka označená kodem ABT 594 (*XII*) (obr. 4), která je asi 70krát účinnější než morfin, ale nemá jeho nežádoucí účinky na depresi dýchání a také nevyvolává návyk[41].

Objasnění struktury epibatidinu vyprovokovalo řadu laboratoří k totální syntéze této relativně jednoduché látky[42-48] a blízká příbuznost epibatidinu k nikotinu vzbudila nový zájem o halogenpyridiny[49-53], jako látky zajímavých vlastností[54,55]. Například 2,2'-bipyridiny odvozené od epibatidinu (*XIII*) a podobně i bispyridinové deriváty nikotinu, poskytují stabilní cheláty s řadou kovů[56] a jsou i vhodnými činidly pro syntézu chirálních sloučenin. Chirální bispyridinové komplexy mohou být využity k přípravě definovaných dvourozměrných a třírozměrných struktur, jako jsou micelly, nanotrubičky či monomolekulární filmy[57,58].

Závěr

Jedovatý sekret žab čeledi *Dendrobatidae*, používaný jihoamerickými a středoamerickými indiány k výrobě šípového jedu, je zdrojem řady zajímavých chemických sloučenin, z nichž mnohé patří mezi nejtoxičtější známé látky. Jedná se o pestrou paletu látek, které svou strukturou a přítomností dusíkatých heterocyklů v molekule, připomínají rostlinné alkaloidy a jsou proto někdy označovány jako živočišné alkaloidy. Jsou nejen velmi toxické, ale vykazují i řadu zajímavých farmakologických účinků. Moderní separační a analytické metody ukazují, o jak pestrou skupinu látek se jedná a jak zajímavé chemické struktury zde příroda nabízí. Stávají se proto inspirací pro chemii a vzbuzují zájem organiků a farmaceutických chemiků. Zatím je vědecky prozkoumán jen malý počet druhů těchto zajímavých tvorů deštných pralesů Ameriky a lze proto očekávat, že brzy se výčet těchto látek rozšíří o další, neméně zajímavé sloučeniny. Zájem o ně se totiž v poslední době zvyšuje, protože mnohé druhy jsou ohroženy ničením deštných pralesů a hrozí tak nebezpečí, že vyhynou dříve, než bude moci být prozkoumána jejich biologie a poznány všechny účinné složky jejich jedů.

Autoři děkují panu Krauff Schwanhaeuserovi a slečně Victorii Marini za poskytnuté informace a materiály, kterými bylo možno obohatit tuto práci.

LITERATURA

1. Walls J. G.: *Poison Frogs of the Family Dendrobatidae. Jewels of the Rainforest*. Amazon Com., 1994.
2. Myers C. W., Paolillo A. O., Daly J. W.: Am. Mus. Novitates. *1997*, No. 3002.
3. Myers C. W., Daly J. W.: Am. Mus. Novitates *1980*, No. 2692.
4. Myers C. W., Daly J. W., Malkin B.: Bull. Am. Mus. Nat. Hist. *161*, 311 (1978).
5. Narahashi T.: Ann. N. Y. Acad. Sci. *479*, 133 (1986).
6. Daly J. W.: Fortschr. Chem. Org .Natur. *41*, 205 (1982).
7. Daly J. W., Secunda S. I., Garraffo H. M., Spande T. F., Wisniewski A., Nishihara C., Cover J. F. Jr.: Toxicon *30*, 887 (1992).
8. Albuquerque E. X., Daly J. W., Witkop B.: Science *172*, 995 (1971).
9. Franke S.: *Lehrbuch der Militärchemie*, 2 vyd. Militärverlag der DDR, Berlin 1977.
10. Warnick J. E., Albuquerque E. X., Onur R. Jansson S. E., Daly J., Tokuyama T., Witkop B.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *193*, 232 (1975).
11. Daly J. W., Witkop B.: Clin.Toxicol. *4*, 331 (1971).
12. Edwards M. W., Daly J. W., Myers C. W.: J. Nat. Prod. *51*, 1188 (1988).

13. Jain P., Garraffo H. M., Spande T. F., Yeh H. J., Daly J. W.: J. Nat. Prod. *58*, 100 (1995).
14. Daly J. W., Garraffo H. M., Pannell L. K., Spande T. F., Severini C., Erspamer V.: J. Nat. Prod. *53*, 315 (1990).
15. Daly J. W., Highet. R. J., Myers C. W.: Toxicon *22*, 905 (1984).
16. Daly J. W., Myers C. W., Whittaker N.: Toxicon *25*, 1023 (1987).
17. Daly J. W., Brown G. B., Mensah-Dwumah H., Myers C. W.: Toxicon *16*, 163 (1978).
18. Daly J. W,, McNeal E. T., Gusovsky F.: Biochim. Biophys. Acta *930*, 470 (1987).
19. Gusovsky F., Rossignol D. P., McNeal E. T., Daly J. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 1272 (1988).
20. Daly J. W., Gusovsky F., McNeal E. T., Secunda S., Bell M., Creveling C. R., Nishizawa Y., Overman L. E., Sharp M. J., Rossignol D. P.: Biochem. Pharmacol. *40*, 315 (1990).
21. Daly J. W., McNeal E. T., Overman L. E., Ellison D. H.: J. Med. Chem. *28*, 482 (1985).
22. Warnick J. E., Jessup P. J., Overman L. E., Eldefrawi M. E., Nimit Y., Daly J. W., Albuquerque E. X.: Mol. Pharmacol. *22*, 565 (1982).
23. Daly J. W., Karle I. L., Myers C. W., Tokuyama T., Waters J. A., Witkop B.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. *68*, 1870 (1971).
24. Codel G. A. (Ed.): *The Alkaloids Acad*, sv. 43, str. 185. Press, San Diego 1993.
25. Corey E. J., Arnett J. F., Widiger G. N.: J. Am. Chem. Soc. *97*, 430 (1975).
26. Evans D. A., Thomas E. W., Cheropeck R. E.: J. Am. Chem. Soc. *104*, 3695 (1982).
27. Winkler J. D., Hershberg P. M.: J. Am. Chem. Soc. *111*, 4852 (1982).
28. Thompson C. M.: Heterocycles *34*, 979 (1992).
29. Bartels-Bernal G., Diaz E., Cadena R., Ramos J., Daly J. W.: Cell. Mol. Neurobiol. *3*, 203 (1983).
30. Lovenberg T., Daly J. W.: Neurochem. Res *11*, 1609 (1986).
31. Spande T. F., Daly J. W., Hart D. J., Tsai Y. M., Macdonald T. L.: Experientia *37*, 1242 (1981).
32. Souccar C., Varanda W. A., Daly J. W., Albuquerque E. X.: Mol. Pharmacol. *25*, 384 (1984).
33. Aronstam R. S., Daly J. W., Spande T. F., Narayanan T. K., Albuquerque E. X.: Neurochem. Res. *11*, 1227 (1986).
34. Badio B., Daly J. W.: Mol. Pharmacol. *45*, 563 (1994).
35. Houghtling R. A., Dávila-García M. I., Hurt S. D., Kellar K. J.: Med. Chem. Res. *4*, 538 (1994).
36. London E. D., Scheffel U., Kimes A. S., Kellar K. J.: Eur. J. Pharmacol. *278*, R1 (1995).
37. Perry D. C., Kellar K. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *275*, 1030 (1995).
38. Dávila-García M. I., Musachio J. L., Perry D. C., Xiao Y., Horti A., London E. D., Dannals R. F., Kellar K. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *282*, 445 (1997).
39. Barlocco D., Cignarella G., Tondi D., Vianello P., Villa S., Bartolini A., Ghelardini C., Galeotti N., Anderson D. J., Kuntzweiler T. A., Colombo D., Thoma L.: J. Med. Chem. *41*, 674 (1998).
40. Bannon A. W., Decker M. W., Hollady M. W., Curon P., Donelly-Roberts D., Puttfarcken P. S., Bitner R. S., Diaz A., Dickenson A. H., Porsolt R. D., Williams M., Arneric S. P.: Science *279*, 77 (1998).
41. Decker M. W., Bannon A. W., Buckley M. J., Kim D. J. B., Holladay M. W., Ryther K. B., Lin N.-H., Wasicak J. T., Williams M., Arneric S. P.: Eur. J. Pharmacol. *346*, 23 (1998).
42. Pandey G., Bagul T. D., Lakshmaiah G.: Tetrahedron Lett. *35*, 7439 (1994).
43. Okabe K., Natsume M.: Chem. Pharm. Bull. *42*, 1432 (1994).
44. Dehmlow E. V.: J. Prakt. Chem. *337*, 167 (1995).
45. Xu R., Chu G., Bai D.: Tetrahedron Lett. *37*, 1463 (1996).
46. Bai D., Xu R., Zhu X.: Drugs Fut. *22*, 1210 (1997).
47. Giblin G. M. P., Jones C. D., Simpkins N. S.: Synlett *1997*, 589.
48. Aoyagi S., Tanaka R., Naruse M., Kibayashi C.: Tetrahedron Lett. *39*, 4513 (1998).
49. Chen Z., Trudell M. L.: Tetrahedron Lett. *35*, 9649 (1994).
50. Hiroya K., Uwai K., Ogawara K.: Chem. Pharm. Bull. *43*, 901 (1995).
51. Malpass J. R., Hemmings D. A., Wallis A. L.: Tetrahedron Lett. *37*, 3911 (1996).
52. Larsson A. L. E., Gatti R. G. P., Bäckvall J.-E.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 *1997*, 2873.
53. Pavri N. P., Trudell M. L: Tetrahedron Lett. *38*, 7993 (1997).
54. Zoltewicz J. A. Cruskie M. P. Jr.: Tetrahedron *51*, 3103 (1995).
55. Murata N., Sugihara T., Sakamoto T.: Synlett *1997*, 298.
56. Zoltewicz J. A., Cruskie M. P. Jr.: Tetrahedron *51*, 11393 (1995).
57. Karaborni S., Kesselink K., Hilbers P. A. J., Smit B., Karthäuser J., van Os N. M., Zana R.: Nature *266*, 254 (1994).
58. Castro M. J. L., Kovensky J., Cirelli A. F.: Tetrahedron Lett. *38*, 3995 (1997).

J. Patočka[a], M. C. Ardila[b], and M. V. Vásquez[c] *([a]Department of Toxicology, Military Medical Academy, Hradec Králové, [b]Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Columbia, Santafé de Bogotá, Colombia, [c]Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medelín, Colombia):* ***Dendrobatidae* Frog Poisons – Inspiration for Bioorganic Chemistry**

Poison dart frogs of family *Dendrobatidae* are colorful small frogs, which live in tropical rainforests of Central and South America. Their poison is used by American Indians in darts for hunting monkeys and other small animals. The poison of the frogs contains toxins which dull nerves and can produce heart and respiratory failure. The poison secreted by some species ranks among the most powerful animal poisons known. Chemically, it contains animal alkaloids with a wide range of pharmacological activities. More than one hundred alkaloids have been identified in extracts from frog skins. They include batrachotoxins (potent activators of sodium channels), pumiliotoxins (showing myotonic and cardiotonic activity), histrionicotoxins (noncompetitive blockers of nicotinic receptor channels and potassium channels), gephyrotoxin (blocking nicotinic acetylcholine receptor-ion channel complex), and epibatidine (extremely potent and selective nicotinic agonist with strong analgetic activity). Chemical structures of frog toxins are a good inspiration for bioorganic chemistry in seeking biologically active compounds.

CHEMICKÁ STRUKTURA ČERNÝCH UHLÍ

PAVEL STRAKA

Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České republiky, V Holešovičkách 41, 182 09 Praha 8, e-mail: straka @irsm.cas.cz

Došlo dne 2.VIII.1999

Klíčová slova: černé uhlí, strukturní modely

Obsah

1. Úvod
2. Problémy struktury uhlí
   2.1. Sumární vzorec a molekulová hmotnost
   2.2. Molekulová hmotnost a molekula uhlí
   2.3. Aromaticita a klastry
   2.4. Molekulární fáze
   2.5. Interakce přenosu náboje
   2.6. Vazba vody ve struktuře uhlí
3. Strukturní rysy černých uhlí
   3.1. Charakteristika vzorců
   3.2. Strukturní parametry černých uhlí

1. Úvod

Uhlí, zejména černé, se stane v nedaleké budoucnosti nejvýznamnějším zdrojem uhlíku na planetě. I když je energetické využití uhlí významné a termodynamická účinnost přeměny energie novými kogeneračními technologiemi značně zlepšena, zůstává skutečností, že nevratnou reakcí organické substance uhlí na CO_2 jsou ničeny cenné organické struktury, které mohou být využity podstatně lépe, nehledě na problém skleníkového efektu. Je proto namístě věnovat pozornost i neenergetickému využití uhlí, jehož základem je poznání jeho chemické struktury. Toto poznání je výchozím bodem všech způsobů pokročilého využití uhlí.

Uhlí je velmi složitá přírodní směs různých makromolekul aromatického charakteru, nízkomolekulárních organických sloučenin (s molekulovou hmotností do 500) a minerálních látek. Nové směry využití uhlí pokročilými technologiemi jsou do značné míry podmíněny zejména znalostí struktury organické substance uhlí, zahrnující makromolekulární a nízkomolekulární složku. Popis této organické substance je značně komplikovaný vzhledem k chemické i fyzikální heterogenitě uhelné hmoty. Schůdná cesta vede přes sledování mikroskopicky rozlišitelných částí uhelné hmoty – macerálových skupin – které dělíme na skupinu liptinitu, vitrinitu a inertinitu. Macerálové skupiny jsou chemicky i fyzikálně více homogenní a vystižení jejich chemické struktury je tak snazší. Liší se od sebe hustotou, optickými a fyzikálními vlastnostmi, aromaticitou a charakterem i obsahem funkčních skupin heteroatomů. Výrazně aromatický charakter má inertinit, o poznání méně aromatický je vitrinit; nejnižší aromaticitu vykazuje liptinit, který už obsahuje vyšší alifatický podíl. Macerálové skupiny jsou z původního uhlí separovatelné fyzikálně, na základě rozdílných hustot, a to rozplavením a centrifugací v organických kapalinách s vhodně volenými hustotami nebo kontinuální centrifugací. Získané macerálově obohacené frakce obsahují pak převážně liptinit, vitrinit či inertinit a lze je pak dále analyzovat a charakterizovat strukturními parametry. Tyto parametry umožňují koncipovat modely chemických struktur, vizualizovat je a vypočítat jejich energie. Energetické charakteristiky slouží, spolu s dalšími údaji, k posouzení reálnosti vytvořených modelů a ke srovnání s jinými modely.

Ke stanovení strukturních parametrů jsou používány metody nukleární magnetické rezonance v pevné fázi, rentgenová fotoelektronová spektrometrie, teplotně programovaná redukce za atmosférického tlaku, pokročilé metody infračervené spektrometrie a další instrumentální techniky. K interpretaci výsledků přispělo dosavadní zaměření výzkumu na úlohu heteroatomů, zejména kyslíku, ve struktuře uhlí[1-6], výzkum typů černých uhlí a macerálových skupin[7,8], chování uhlí při tepelném rozkladu[9,10], extrakci[11-14] a zkapalnění[15]. K výpočtům energetických charakteristik a nekovalentních interakcí jsou využívány metody počítačové chemie[16,17].

Cílem předkládané práce je přehledně podat problematiku chemické struktury černých uhlí resp. jejich macerálově obohacených frakcí, popsat strukturní rysy organické substance uhlí a srovnávacím způsobem charakterizovat související strukturní parametry.

2. Problémy struktury uhlí

2.1. Sumární vzorec a molekulová hmotnost

Výchozím bodem při určování chemické struktury macerálové frakce je stanovení sumárního vzorce na základě elementární analýzy a uvažované relativní molekulové hmotnosti (M_r). Tu je ovšem krajně obtížné stanovit, ale lze ji odhadnout z údajů o distribuci hodnot M_r uhelných makromolekul či jejich fragmentů a úvah popisujících především recentní, ale i historické modely uhelných struktur. Kritickým srovnáním odhadů plynoucích z různých přístupů je možné určit přinejmenším rozmezí molekulových hmotností vhodných pro strukturní představu.

Shinn[18] uvádí na základě analýzy produktů šetrného zkapalnění uhlí hodnotu M_r = 10023 pro model se sumárním vzorcem $C_{661}H_{561}O_{74}N_4S_6$, Lazarov a Marinov[19] pak 4600 pro strukturní model koksového uhlí sumárního vzorce $C_{327}H_{257}O_{17}N_8S$; Takanohashi a spol.[20] uvažovali M_r asi 10000 pro model středně prouhelněného čínského uhlí a podobně Nakamura a spol.[21] – 10580.

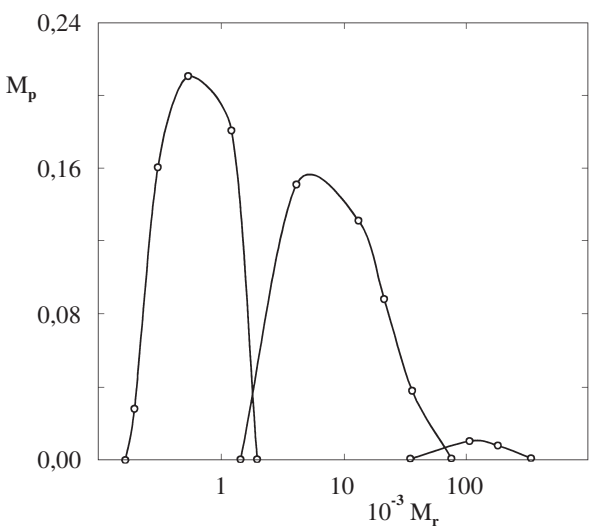
Pro klasické modely[22] popisující statisticky průměrné jednotky makromolekulární struktury uhlí byly vypočteny M_r v rozmezí 965–2913 a sumární vzorce $C_{69-184}H_{56-163}O_{5-21}N_{0-3}S_{0-5}$.

Významné jsou i údaje týkající se klastrů. Carlson[16] určil ve své studii M_r připadající na jeden klastr jako 185 pro Wiserův model[23], 189 pro Solomonův model[10] a 176 pro model Shinnův[18]. Z modelu Lazarova a Marinova[19] vyplývá hodnota M_r na klastr 242, z modelů Mazumdara a Ghoshe[24] pak 276–327. Téměř všichni autoři novějších a recentních strukturních modelů vycházejí z modelu Shinnova. Při konstrukci modelů struktur uhlí i jeho macerálových frakcí lze tedy v prvém přiblížení vyjít z molekulové hmotnosti nepříliš odlišné od 10 000 a uvažovat M_r/klastr v rozmezí asi 180–330. Molekulová hmotnost uhlí souvisí s jeho strukturou a s otázkou molekuly uhlí.

2.2. Molekulová hmotnost a molekula uhlí

Určení molekulové hmotnosti a struktura uhlí jsou dva úzce spjaté problémy. Není dosud zcela jasné, zda je možné hodnotu M_r u uhlí přesně stanovit. Pro úzkou spojitost molekulové hmotnosti se strukturou uhlí proberme tedy ve stručnosti základní představy o struktuře uhlí a možné přístupy k řešení tohoto problému.

Uhlí je zčásti makromolekulární, černá uhlí středního nebo vyššího stupně prouhelnění (obsah C v organické substanci) ze značné části makromolekulární. Makromolekulární látky jsou ve své struktuře buď lineárně nebo příčně vázané. Lineárně vázané makromolekuly má např. polyethylen nebo celulosa. Lineárně vázané makromolekulární látky jsou v zásadě rozpustné. Příčně vázané trojrozměrné molekuly vytvářející sítě mají např. fenolformaldehydové pryskyřice nebo 3D aromatické polyestery. Příčně vázané makromolekulární látky jsou v zásadě nerozpustné, taví se za současného rozkladu sítí a v rozpouštědlech botnají. Protože nebylo dosud nalezeno rozpouštědlo uhelné hmoty a chování uhlí při působení tepla a rozpouštědel odpovídá chování příčně vázaných makromolekulárních látek, je namístě uvažovat uhlí jako látku s příčně vázanými makromolekulami. Makromolekuly uhlí jsou tvořeny aromatickými a aromatickými-hydroaromatickými klastry spojenými v řetězce etherickými vazbami a methylenovými



Obr. 1. **Trimodální rozdělení molekulových hmotností strukturních fragmentů uhlí a molekul uhlí** (M_p = hmotnostní podíl)

skupinami. Příčné vazby jsou převážně nekovalentní, v menší míře kovalentní, v každém případě však s účastí vodíku[25,26]. Velký podíl nekovalentních vazeb výrazně odlišuje uhlí od syntetických polymerů, které byly často uvažovány jako makromolekulární analoga uhlí. Určitý počet aromatických makromolekul, vázaných převážně nekovalentními interakcemi vytváří makromolekulární asociát, který lze chápat jako molekulu uhlí. Tuto molekulu lze modelově charakterizovat buď jako statistický průměr různých makromolekul uhlí, nebo ji vyjádřit konečným počtem modelů makromolekul, nebo ji vyjádřit různými makromolekulami či makromolekulárními uhelnými oligomery, příčně vázanými do asociátu. Každý z těchto přístupů má své přednosti a nedostatky. Statistická průměrná molekula uhlí vystihuje pouze základní strukturní rysy s ohledem na jejich kvantitu. Takto jsou koncipovány klasické modely[22]. Statistické průměrné molekule lze připsat molekulovou hmotnost. Nedostatkem koncepce průměrné molekuly uhlí je, že reprezentující model často nerespektuje kvantitativní zastoupení struktur síry, pyrrolového a pyridinového dusíku, přesné rozdělení kyslíku do funkčních skupin, dále vazbu vody a odpovídající podíl nekovalentních a kovalentních příčných vazeb. Proto je třeba uvažovat i o druhém přístupu a vyjádřit makromolekuly uhlí několika modely, což provedli např. Mazumdar a Ghosh[24]. Charakteristika konečným počtem makromolekul již poskytuje větší prostor k vyjádření struktur včetně variability struktur aromatických. Také v tomto případě lze modelům připsat molekulovou hmotnost. V obou přístupech se však uvažuje molekulová hmotnost makromolekul či makromolekulárních uhelných oligomerů, ale nikoli jejich asociátů.

Třetí přístup naznačuje model Solomonův[10] a zřetelně naznačuje model Lazarova a Marinova[19], oba respektující nekovalentní vazby. V modelu[19] jsou už tyto vazby zastoupeny v měřítku makromolekulárního asociátu. Právě z tohoto modelu lze vyjít při úvahách o molekulové hmotnosti uhlí.

Určení molekulové hmotnosti uhlí lze provést pouze na základě experimentálních dat. Vzhledem k chemické i fyzikální heterogenitě uhlí je třeba nejprve uvažovat rozdělení molekulových hmotností uhelných oligomerů, fragmentů makromolekul a makromolekul, získané nejlépe po reduktivní alkylaci uhlí[27]. (Reduktivní alkylace vede ke štěpení uhelných makromolekul na typické fragmenty.) Nejvýznamnější výsledky poskytla reduktivní ethylace a butylace uhlí (C^{daf} 80 %), kterou provedli Sun a Burk[28] a jejíž kritické zhodnocení provedli Collins et al.[29] Získané fragmenty struktury uhlí poskytly trimodální rozdělení molekulových hmotností s maximy M_r okolo 500, 4000–10000 a 300000, přičemž výrazné výtěžky připadly složkám o M_r okolo 500 a 4000–10000 (obr. 1). Tento závěr poskytuje určité východisko k získání obrazu fyzikální povahy uhelných molekul. Hodnoty M_r do 500 lze podle poznatků o povaze molekulární fáze struktury uhlí (viz dále) připsat sloučeninám vázaným k makromolekulám donor-akceptorovými interakcemi. Významný podíl fragmentů uhelných makromolekul a makromolekul má hodnoty M_r v rozmezí 4000–10000, ale zřejmě existují uhelné makromolekuly s M_r i 10^5–10^6.

2.3. Aromaticita a klastry

Při konstrukci struktury uhlí či frakce je třeba vyjít ze tří základních rysů chemických struktur uhlí: aromaticity, veli-

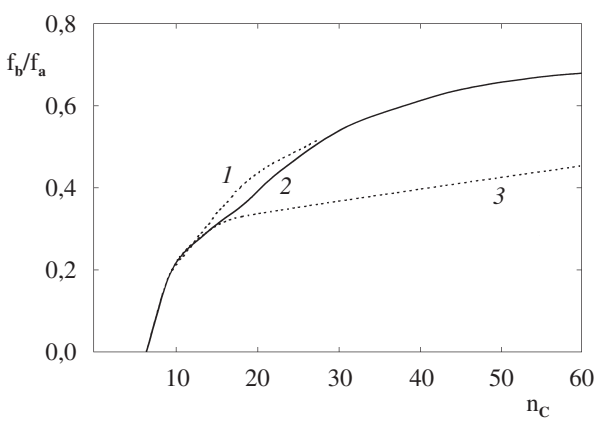
kosti a distribuce aromatických klastrů, dále z funkčních skupin heteroatomů a jejich distribuce a konečně z alifatických složek a jejich distribuce. Klíčovou úlohou je určení velikosti klastru, což je počet aromatických jader kondenzovaných do shluku typického pro danou strukturu.

Je-li aromaticita f_a a označíme-li podíl aromatických můstkových (uzlových, tj. společných alespoň dvěma benzenovým jádrům, neprotonizovaných a nesubstituovaných) atomů uhlíku na aromatických C jako f_b, pak molární zlomek aromatických můstkových atomů uhlíku je f_b/f_a. Protože molární zlomek můstkových aromatických atomů uhlíku závisí na počtu atomů uhlíku v aromatickém klastru[30] (obr. 2), lze z této závislosti určit velikost klastru, tj. počet aromatických jader v klastru. Určíme-li totiž poměr f_b/f_a a následně počet atomů C na klastr, pak porovnáním s modelovými aromatickými sloučeninami můžeme určit velikost klastru. Porovnání provádíme jednak s lineárně kondenzovanými aromáty (např. anthracen, fenanthren, naftacen, chrysen, benzofenanthren) a jednak s kruhově kondenzovanými (např. pyren, koronen).

V případě uhlí z ostravsko-karvinského revíru resp. jejich frakcí a dalších uhlí bylo měřením f_a a f_b pomocí ^{13}C CP/MAS NMR v pevné fázi a na základě závislosti na obr. 2 nalezeno, že obsahují klastry se 3–5 aromatickými kruhy[31]. Stejný výsledek byl zjištěn u amerických[30], čínských[20,21,32], bulharských[33] a polských[22] uhlí. Na obr. 2 představuje linie *1* funkci pro kruhově kondenzované modelové aromatické sloučeniny, linie *3* pak pro sloučeniny lineárně kondenzované. Linie *2* platí pro kombinaci obou typů modelových sloučenin. K určení počtu atomů C/klastr je nejlépe použít všechny tři funkce. Získá se tak rozmezí počtu atomů C/klastr, které slouží k určení velikosti klastrů (počtu aromatických kruhů ve shluku).

Aromatické klastry vytvářejí delší nebo kratší makromolekulární řetězce, které mohou být k sobě vázány příčnými vazbami, které jsou zčásti kovalentní, zčásti nekovalentní. Podle současných představ jsou příčné kovalentní vazby realizovány především methylenovými můstky. Nekovalentní vazby či interakce jsou uvažovány jako vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, π-π interakce aromatických jader a interakce přenosu náboje (charge-transfer interactions). Zásadní úlohu zde hrají van der Waalsovy síly[16].

S rostoucím prouhelněním a aromaticitou vystupují do popředí také π-π interakce. U černých uhlí lze odhadnout, že kovalentní vazby se podílejí na příčném vázání asi 10–30 % (cit.[27]). Výrazný podíl tedy připadá na vazby nekovalentní, vedle van der Waalsových sil i na vodíkové můstky[16].



Obr. 2. **Závislost molárního zlomku můstkových uhlíků f_b/f_a na počtu aromatických uhlíků v klastru n_C.** Linie *1* – kruhově kondenzované aromáty, *3* – lineárně kondenzované, *2* – kombinace obou typů aromatických sloučenin

2.4. Molekulární fáze

Až dosud byly úvahy zaměřeny na makromolekulární fázi chemické struktury frakcí, které ovšem vystihují pouze část skutečnosti, protože vedle této rigidní fáze obsahuje uhlí ještě fázi druhou, mobilní, molekulární, vázanou k fázi makromolekulární. Tato fáze se uplatňuje zejména u uhlí níže prouhelněných, tj. s obsahem C v organické substanci pod 82 hm.%.

Rozsáhlé studie botnání uhlí působením organických rozpouštědel a extrakce uhlí těmito rozpouštědly, včetně extrakcí za nadkritických podmínek, vedly k představě dvoufázového modelu struktury uhlí, který zahrnuje síť příčně vázaných makromolekul uzavírající v sobě směs relativně malých, mobilních molekul. Dvoufázový model byl vyvozen jednak na základě analogického chování polymerů (nerozpustné a botnající polymery obsahují příčně vázané polymerní řetězce, zatímco rozpustné polymery nikoli), jednak z výsledků extrakcí, kdy získané extrakty obsahovaly relativně malé molekuly. Zásadní otázkou je, jaký je podíl obou fází ve struktuře uhlí. Je zřejmé, že podíl molekulární fáze závisí na stupni prouhelnění a s ním spojeného množství vytvořených příčných vazeb mezi makromolekulami, přičemž s rostoucím prouhelněním roste počet příčných vazeb a klesá podíl molekulární fáze. Například při extrakci uhlí pyridinem[34] byl pozorován extrakční výtěžek 21,5 % u uhlí s obsahem C v organické substanci (C^{daf}) 72 %, 17 % u uhlí s C^{daf} 81,6 % a pouze 6 % u uhlí s C^{daf} 88 %. Pro uhlí s C^{daf} pod 82 % uvažuje Marzec[34] asi 30 % podíl molekulární fáze v organické substanci. Uvažujeme-li uhlí středního stupně prouhelnění (82– 92 % C^{daf}), pak za hranicí 82 % C^{daf} můžeme očekávat prudký pokles tohoto podílu, a to až na asi 18–6 %, jak dokládají studie[11,12] na základě extrakce pyridinem při 117 °C resp. 18– 22 °C.

Podstatné pro určení podílu molekulární fáze je provádění extrakcí za podmínek zaručujících, že nedojde k termickému štěpení vazeb C–C, C=C, vývinu CO, CO_2, H_2 a vzniku reakční vody. Extrakce vypovídající o molekulární fázi by podle[34] měly být proto prováděny při teplotách pod 180 °C, avšak řada závěrů svědčí o tom, že extrakce prováděné pod teplotou počátku plastického stavu uhlí, tj. pod 350 °C, poskytují původní látky, nikoli vzniklé tepelným rozkladem[35].

Dále je třeba uvážit, že molekuly mobilní fáze jsou zachyceny v pórech vytvořených trojrozměrnou makromolekulární sítí a vzhledem k omezené velikosti mikropórů je část nedostupná pro extrakci běžnými rozpouštědly při teplotách pod 100 °C. Tento jev byl pozorován např. u alkylnaftalenů a alkyl fenolů[36] a objasněn na základě porovnání produktů extrakce a zkapalnění sledovaných uhlí. Extrakce musí tedy být prováděny za mírných podmínek, přitom s dostatečnou účinností a získané údaje doplněny údaji o kapalných podílech získaných jinými metodami, např. zkapalňováním nebo pyrolýzou s vodní parou do 300 °C (cit.[37]), kdy vodní pára působí jako fyzikální, ale i chemický činitel vytlačující z pórů mobilní molekulovou fázi.

Konečně je nutno vzít v úvahu, že molekuly molekulové fáze jsou vázány k makromolekulám donor-akceptorovými vazbami[13], které jsou důsledkem zvýšené hustoty π elektronů

v heterocyklických kruzích s dusíkem a kyslíkem a snížené hustoty π elektronů v kondenzovaných aromatických systémech. Rozpouštědlo pak musí tyto vazby překonat vytvořením silnějších donor-akceptorových vazeb mezi ním a extrahovanými molekulami než byly původně v uhlí. Pyridin je proto význačným rozpouštědlem, že ruší donor-akceptorové interakce mezi molekulami mobilní fáze a makromolekulární sítí.

Donor-akceptorové interakce jsou podstatou interakcí přenosu náboje (charge-transfer interactions), které budou ještě dále zmíněny.

Účinkem pyridinu lze potlačit až rozrušit vodíkové můstky působící na OH skupinách. Rovněž methylací či acetylací uhlí, kdy OH skupiny jsou odstraněny a vodíkové můstky zcela eliminovány[38], dosáhneme stejného účinku. Rozrušení vodíkových můstků je příčinou botnání makromolekulární sítě uhlí.

Na základě uvedených skutečností lze pro odhad molekulové fáze středně prouhelněných uhlí uvažovat hodnoty extrakčních výtěžků při použití pyridinu, doplněné výtěžkem kapalné fáze při pyrolýze uhlí s vodní parou do 300 °C, které uvádí tabulka I. Z údajů v tabulce I vyplývá, že podíl molekulové fáze se pohybuje v širokém rozmezí 1–24 %, spíše však 6–24 %. Uvážíme-li, že látky této fáze se vyskytují nejen v otevřených, ale i v uzavřených pórech, pak je nutno ještě přihlédnout k výsledkům extrakcí po předehřevu uhlí na 350–400 °C, kdy se i tyto póry stávají přístupnými působení rozpouštědla. Ouchi[11] uvádí po předehřevu středně prouhelněných uhlí v autoklávu a následné extrakci pyridinem výtěžky 12,7–24,6 %, což je ve shodě s rozmezím podle Vahrmana a Wattse[39] 10–25 %.

Pro středně prouhelněná uhlí byly dále nalezeny výtěžky molekulární fáze přinejmenším 11 %, jak ukázala sdělení[39,40], pracující se šetrným tepelným rozkladem uhlí na tenké vrstvě (4 mm) do 300 °C a vakuovou destilací tepelně exponovaných uhlí do 300 °C. Hlavní podíl relativně malých molekul uvažované fáze obsahoval sloučeniny s molekulovou hmotností do 300. Obdobné výsledky byly dosaženy pyrolýzou s vodní parou do 300 °C (cit.[37]).

Tabulka I
Extrakční výtěžky při použití pyridinu, doplněné výtěžkem kapalné fáze při pyrolýze uhlí s vodní parou do 300 °C

C^{daf} [hm.%]	Podmínky	Extrakční výtěžek [hm.%]	Cit.
83	Soxhlet	22	15
84,8	extrakce třepáním	13,8	12
84,8	Soxhlet 18–22 °C	13,9	12
85,5	Soxhlet	24	15
87,5	Soxhlet	4	15
88,0	Soxhlet 117 °C	17,1	11
88,3	Soxhlet 117 °C	18,4	11
89,5	Soxhlet 117 °C	6,1	11
89,5	Soxhlet	1	15
89,3	Grafe 116 °C	6,4	15
89,3	Autokláv 2,45 Mpa	9,5	15
80	Pyrolýza s vodní parou do 300 °C	3	37

Lze tedy uzavřít, že molekulová fáze se podílí na organické části uhlí středně prouhelněných asi 6–25 %. U výše prouhelněných uhlí (C^{daf} nad 92 %) bude pak obsah molekulové fáze výrazně nižší. Minoritní až výrazně minoritní podíl této fáze vedl k představě jednofázového modelu uhlí, který uvažuje pouze makromolekulární fázi. Podle této představy je uhlí tvořeno sítí propletených makromolekul spojených pouze nekovalentními vazbami a vykazující viskoelastické vlastnosti[42,43]. Jednofázový model lze uplatnit už u středně prouhelněných uhlí, protože např. u uhlí z Dolu Paskov, ostravsko-karvinský revír, byl nalezen extrakční výtěžek pouze 6 % (cit.[14]).

Uvažovaná molekulová fáze obsahuje sloučeniny s molekulovou hmotností asi do 500 (cit.[39]). Obsahuje jednak kyslíkaté sloučeniny fenolického typu, včetně alkylfenolů, dále homology pyridinu a pyrrolu, dále alifatické uhlovodíky C_6–C_{26}, a to jak s přímým tak s rozvětveným retězcem, alicyklické uhlovodíky, zejména alkylované cyklopentany a cyklohexany, a aromatické uhlovodíky, zvláště alkylbenzeny a alkylnaftaleny. Byly však nalezeny i aromatické uhlovodíky se třemi až pěti kruhy, avšak alkylnaftaleny u vícejaderných aromátů zcela jasně převládaly. Superkritickou extrakcí uhlí ostravsko-karvinského revíru oxidem uhličitým[41] (30 MPa, 150 °C) byly nalezeny alkany C_{10}–C_{24} a cyklopentany.

2.5. Interakce přenosu náboje

Z nekovalentních interakcí, podstatných pro udržení trojrozměrné struktury uhlí a vzniku mikroporozity v uhlí, byly zmíněny vodíkové můstky a van der Waalsovy síly, dále pak π-π interakce aromatických klastrů a systémů. Zásadní důležitost vodíkových můstků a van der Waalsových sil doložil Carlson[16], značný význam π-π interakcí u uhlí středního prouhelnění pak Quinga a Larsen[44].

Ve struktuře uhlí se uplatňují ještě interakce přenosu náboje, diskutované u molekulární mobilní fáze a extrakcí. U uhlí s C^{daf} 84 a 87 % byly studovány Nishiokou, Gebhardem a Silbernagelem[45]. Tyto interakce, vázané na struktury s atomy O a N, působí nejen mezi makromolekulární sítí a molekulární fází, ale také jako příčné nekovalentní vazby mezi makromolekulami. Dokladem toho je působení aminů jakožto silnějšího elektron-donoru než pyridin na uhlí při extrakci. Aminy samy nejsou dobrými rozpouštědly pro středně prouhelněná uhlí, avšak ve směsi s pyridinem značně zvyšují extrakční výtěžek. Při extrakci uhlí o C^{daf} 84,1 % samotným pyridinem bylo dosaženo 15 % výtěžku, avšak 4,4–10 % přídavkem triethylaminu se zvýšil výtěžek extrakce na 23–24 %. To lze vysvětlit tak, že přídavkem aminu se rozrušily interakce přenosu náboje v síti a pyridin rozpustil uvolněné látky. Interakce přenosu náboje působí tedy se vší pravděpodobností jako dosti silné nekovalentní vazby.

2.6. Vazba vody ve struktuře uhlí

Voda se váže k uhlí jak fyzikální adsorpcí, tak chemisorpcí a může být vázána v mikropórech, mezo- i makropórech. Heterogenní povaha a porézní systém uhlí poskytují řadu možností interakcí vody s uhlím a jejich úplné poznání je zatím dosti vzdálené.

K organickým strukturám uhlí se voda váže především díky svému polárnímu charakteru, který má svůj původ ve

značné elektronegativitě kyslíku. Zatím lze říci, že jsou nejméně tři způsoby, jak se tato vazba realizuje. Spiro a Kosky[46] uvažují ve svém modelu nízko prouhelněného černého uhlí vodu vázanou na hydroxylové skupiny vodíkovými můstky. Stejnou vazbu lze předpokládat i u uhlí středně prouhelněných, protože i zde existují fenolické klastry schopné vázat vodu stejnými způsobem.

Další způsob vazby vody uvádějí Mu a Malhotra[47] ve své kinetické studii desorpce vody z amerického černého uhlí, sledovanou infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací. Voda se váže dosti silně na karbonylovou skupinu, a to buď vodíkovým můstkem jako H_2O nebo v podobě hydroxoniového iontu H_3O^+.

Je známo, že molekuly vody vytvářejí shluky, což prokazuje např. Carlon[48]. Tyto shluky jsou náhodně rozmístěny a jsou uloženy v mikropórech uhlí[47], kde se mohou vázat ke strukturám uhlí van der Waalsovými silami a vodíkovými můstky.

Na základě těchto poznatků byly v nově navrhovaných modelech liptinitové, inertinitové a vitrinitové frakce[49,50] vyjádřeny vazby molekuly vody prostřednictvím vodíkových můstků.

3. Strukturní rysy černých uhlí

Vzhledem k variabilitě klastrů a funkčních skupin se struktura černých uhlí vyjadřuje modely. Tvorba modelů představuje zvláštní problém, který vyžaduje samostatné sdělení. Protože základem modelování struktur je vystižení strukturních rysů pomocí strukturních parametrů, bude nejprve věnována pozornost těmto parametrům. Pro rozmanitost uhlí se obvykle volí vzorky z jedné lokality a získané parametry se srovnávají s literárními údaji. Získávání a výklad strukturních parametrů je nejlépe demonstrovat na příkladu, pro který byly vybrány parametry vzorků uhlí z ostravsko-karvinského revíru a jejich frakce[31]. Stanovení strukturních parametrů předchází charakteristika vzorků.

3.1. Charakteristika vzorků

Vzorky představují macerálově obohacené frakce separované rozplavením v organických kapalinách a centrifugací ze tří černých uhlí ostravsko-karvinského revíru. Uhlí pocházejí z Dolu 9. květen (vzorky Kv.1 a 2) a Dolu Fučík (vzorek F). K separaci byly použity směsi tetrachlormethanu a xylenu o různých hustotách[51] v rozmezí 1,21–1,50 g.cm^{-3}. Typické charakteristiky použitých uhlí a získaných frakcí obsahují tabulky II a III (cit.[31,49]).

Z tabulek II a III je patrné, že vybraná uhlí jsou středně prouhelněná. Taková uhlí jsou ve světových ložiskách hojně zastoupena, a proto vhodná k demonstraci. Z tabulky III vyplývá, že separované frakce byly liptinitické (č. 1 a 10), vitrinitické (č. 2, 5–7, 11 a 12) a inertinitické (č. 4, 8 a 9).

Tabulka II
Technická, elementární a petrografická analýza tří výchozích černých uhlí ostravsko-karvinského revíru[31]; W^a – obsah vody v analytickém vzorku, A^d – obsah popela v suchém vzorku, V^{daf} – obsah prchavé hořlaviny, S_t^d – obsah veškeré síry v suchém vzorku; H, C, S, N, O – elementární analýza organické substance (hmot.%)

Uhlí	W^a	A^d	S_t^d	V^{daf}	H	C	S	N	O
Kv.1	1,5	1,6	0,6	26,3	4,92	88,32	0,49	1,34	4,93
Kv.2	1,9	4,2	0,4	29,2	5,50	85,92	0,38	1,38	6,82
F	1,9	5,4	0,5	36,3	5,34	84,09	0,42	1,69	8,46

Tabulka III
Analýzy macerálově obohacených frakcí tří černých uhlí ostravsko-karvinského revíru[31]; d – zdánlivá hustota frakce (g.cm^{-3}), V, L a I – obsahy macerálových skupin vitrinitu, liptinitu a inertinitu (obj.%). Ostatní symboly jako v tabulce II

d	W^a	A^d	V^{daf}	H	C	S	N	O	V	L	I
Macerálové frakce uhlí Kv.1 (č. 1–4)											
1,21–1,24	1,9	0,8	32,5	5,86	87,82	0,39	1,29	4,64	11	78	11
1,24–1,27	1,5	0,4	28,2	5,07	87,53	0,34	1,43	5,63	57	13	30
1,27–1,33	1,2	0,9	26,1	4,84	88,54	0,40	1,33	4,89	37	12	51
1,33–1,45	1,6	6,7	23,5	4,47	87,88	0,21	1,22	6,22	24	8	68
Macerálové frakce uhlí Kv.2 (č. 5–9)											
1,21–1,24	3,6	3,8	31,5	5,86	86,36	0,32	1,45	6,22	62	25	13
1,24–1,27	2,3	1,8	31,0	5,53	86,41	0,31	1,42	6,33	67	17	16
1,27–1,33	1,6	1,5	29,1	5,19	86,41	0,34	1,41	6,39	71	8	21
1,33–1,45	1,9	5,1	29,2	5,13	86,38	0,34	1,25	6,90	37	7	56
+1,50	1,3	37,1	26,9	4,40	85,95	0,83	1,32	7,50	24	2	74
Macerálové frakce uhlí F (č. 10–13)											
1,21–1,24	1,6	1,3	41,0	6,35	83,72	0,55	1,63	7,75	26	52	22
1,24–1,27	1,6	1,4	40,2	5,64	83,66	0,55	1,71	8,44	52	26	22
1,27–1,33	1,9	2,9	36,2	5,35	84,23	0,45	1,69	8,28	61	11	28
1,33–1,45	1,7	9,9	33,8	5,08	84,49	0,52	1,54	8,37	40	12	48

3.2. Strukturní parametry černých uhlí

Strukturní parametry zahrnují charakteristiky aromatického systému, alifatické části a funkčních skupin heteroatomů.

Aromatický systém je charakterizován aromaticitou, velikostí klastrů, molárním zlomkem f_b/f_a, počtem aromatických C na klastr a počtem substituovaných míst na klastru (stupeň substituce). Tyto parametry jsou získány metodou ^{13}C CP/MAS NMR, a to kombinací integrální metody a techniky dipolar-dephasing (DD)[30]. Aromaticita souvisí s velikostí klastrů[52], což pro demonstrované frakce ukazuje tabulka IV (cit.[49]).

Z tabulky IV vyplývá, že liptinitické frakce (č. 1 a 10) obsahují tříjaderné, vitrinitické frakce (č. 2, 5–7, 11 a 12) tří- až čtyřjaderné klastry, ale i klastry pětijaderné a inertinitické frakce (č. 4, 8 a 9) čtyř- až pětijaderné klastry. Vitrinitickoinertinitické frakce (č. 3 a 13) obsahují tří- až čtyřjaderné klastry. (Petrografický rozbor je v tabulce III.)

Pro účely strukturní studie je třeba odlišit alifaticky vázaný uhlík od aromatického, což úzce souvisí s aromaticitou uhlí či frakce, a určit stupeň substituce. U sledovaných frakcí bylo nalezeno[50], že na klastr připadá většinou 4–5 substituentů.

S aromaticitou spojené parametry, molární zlomek můstkových aromatických atomů uhlíků (f_b/f_a), počet aromatických C na klastr (aromC/klastr), počet substituovaných míst na klastru (subst/klastr) a M_r připadající na klastr (M_r/klastr) uvádí tabulka V (cit.[50]).

Výsledky získané při studiu aromatické povahy organické substance uvažovaných frakcí byly porovnány s výsledky měření uvedených strukturních parametrů amerických středně prouhelněných uhlí Argonne Premium Coals, prezentovaných Solumnem, Pugmirem a Grantem[30]. Tito autoři uvádějí hodnoty f_b/f_a, počet aromatických C/klastr, počet substituovaných míst na klastru (subst/klastr) a M_r/klastr, které shrnuje tabulka VI.

Byl-li molární zlomek f_b/f_a frakcí uhlí OKR 0,29–0,36 (tab. V), pak srovnávací hodnoty (tab. VI) byly v rozmezí 0,29–0,40, což můžeme označit za dobrou shodu. Podobně lze jako dobrou shodu výsledků hodnotit počet aromatických C/klastr, který byl u uvažovaných frakcí 13–21 (tab. V) a u srovnávaných uhlí 14–20 (tab. VI). Počty substituovaných míst v klastru, které byly v obou seriích shodně 4–5, pouze ve dvou případech frakcí uhlí ostravsko-karvinského revíru byla nalezena hodnota 6. Molekulová hmotnost připadající na klastr byla u sledovaných frakcí 229–377 (tab. V) a u srovnávaných uhlí 299–316 (tab. VI). Užší rozmezí M_r/klastr u srovnávací serie může být zapříčiněno menším počtem srovnávacích vzorků a větším u serie uvažovaných frakcí. Sledované molekulové hmotnosti byly srovnatelné a obdobné. Vcelku byly hodnoty parametrů související s aromaticitou u obou serií shodné.

Dále je třeba charakterizovat a kvantifikovat funkční skupiny heteroatomů, z nichž nejdůležitější jsou skupiny kyslíku.

Kyslík se v struktuře černého uhlí vyskytuje jako etherický, hydroxylový a karbonylový. Obecně lze říci, že převládající formou je etherický kyslík, významný je podíl hydroxylového kyslíku; naproti tomu zastoupení karbonylového kyslíku je menšinové až velmi nízké[53,54], jak demonstruje tabulka VII. Stanovení funkčních skupin kyslíku v uhlí je vhodné provádět difuzně reflexní infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací a statistikou částečných nejmenších čtverců (DRIFTS-PLS)[2,55].

Tabulka IV
Aromaticita (f_a) a velikost aromatických klastrů v macerálových frakcích uhlí ostravsko-karvinského revíru[49]

Uhlí	Číslo frakce	f_a	Velikost klastru
Kv.1	1	0,70	3
	2	0,75	3–4
	3	0,78	3–4
	4	0,81	4–5
Kv.2	5	0,69	3–4
	6	0,71	3–4
	7	0,74	4–5
	8	0,74	4–5
	9	0,80	4–5
F	10	0,65	3
	11	0,69	3
	12	0,71	3
	13	0,74	3

Tabulka V
Parametry aromatických klastrů u frakcí uhlí ostravsko-karvinského revíru[50]. Symboly v textu

Uhlí	Frakce	f_b/f_a	Arom.C/klastr	Subst/klastr	M_r/klastr
Kv.1	1	0,31	13–14	5	257–274
	2	0,32	13–17	4	236–314
	3	0,33	13–18	4	229–308
	4	0,36	15–21	4	255–355
Kv.2	5	0,32	13–17	6	264–346
	6	0,32	13–17	5	252–334
	7	0,35	14–20	5	261–376
	8	0,35	14–20	5	261–377
	9	0,36	15–21	4	269–362
F	10	0,30	13–15	6	265–324
	11	0,29	13–14	5	253–291
	12	0,31	13–15	5	264–270
	13	0,30	13–15	4	254–285

Tabulka VI
Parametry aromatických klastrů uhlí Argonne Premium Coals[30]. Symboly v textu

Uhlí	f_b/f_a	Arom.C/klastr	Subst/klastr	M_r/klastr
Illinois No. 6	0,31	15	5	316
Pittsburgh No. 8	0,31	15	4	294
Stockston seam	0,29	14	4	275
Upper Freeport	0,36	18	5	302
Pocahontas	0,40	20	4	299

Tabulka VII
Rozdělení kyslíku v organické substanci frakcí černých uhlí ostravsko-karvinského revíru[53-55] (symboly v textu)

Uhlí	Frakce	O [hmot.%]	O_{-O-} [%]	O_{OH} [%]	O_{CO} [%]	% O celkem
Kv.1	1	4,64	52	47	1	100
	2	5,63	68	30	2	100
	3	4,89	64	35	1	100
	4	6,22	57	40	3	100
Kv.2	5	6,22	58	41	1	100
	6	6,33	58	41	1	100
	7	6,39	60	39	1	100
	8	6,90	62,3	37,3	0,4	100
	9	7,50	59	40	1	100
F	10	7,55	52	41	7	100
	11	8,44	56	37	7	100
	12	8,28	50	41	9	100
	13	8,37	49	40	11	100

V případě frakcí uhlí ostravsko-karvinského bylo nalezeno[2,53-55], že z celkového množství kyslíku je 49–68 % vázáno v etherických vazbách (O_{-O-}), 30–47 % v hydroxylových skupinách (O_{OH}) a 1–11 % v karbonylových skupinách (O_{CO}).

Dalším heteroatomem je dusík, který se ve struktuře uhlí vyskytuje ve formě pyrrolu a pyridonu, pyridinu, aromatických aminů, dále jako kvarterní (např. protonizovaná forma pyridinu, pyridinium) a oxidovaný (vazby N–O). Převládajícími formami jsou pyrrolová a pyridinová, přičemž pyrrolová forma je uváděna jako dominantní, nebo i výrazně dominantní. Stanovení pyrrolového (N_5) a pyridinového (N_6) dusíku u uhlí uvedených v tabulce II, provedená rentgenovou fotoelektronovou spektrometrií (XPS), ukázala[56], že poměr N_5/N_6 je 1,34–2,34. U amerických černých uhlí byl zjištěn tento poměr[5] v rozmezí 1,8–2,4. Obsah pyrrolové formy byl tedy převažující vzhledem k pyridinové nebo dvojnásobný. Převažující nebo i dominantní obsah pyrrolové formy byl pozorován také u britských černých uhlí[57]. Měření metodou XANES (X-ray absorption near-edge structure spectroscopy)[58] potvrzují převažující obsah této formy a dále prokazují i pyridonovou formu a přítomnost aromatických aminů jakožto minoritní složky.

Dalšími minoritními složkami jsou formy pyridinia a oxidovaného dusíku. Zatímco z celkového množství organicky vázaného dusíku je obsah pyrrolového dusíku 55–65 resp. 55–68 % a pyridinového 26–33 resp. 29–41 %, pak obsah N pyridinia[5,59] je pouze 3–14 resp. 0,6–0,8 % a oxidovaného N 0,4–5,1 %. Nejpravděpodobnější formou oxidovaného dusíku je pyridin-N-oxid.

Význam studia forem organického dusíku je nejen pro koncipování struktur uhlí, ale také v tom, že složení emisí oxidů dusíku při spalovacích procesech je dáno rozdělením dusíku do funkčních skupin, zejména do pyrrolové a pyridinové formy. Vztah mezi funkčními skupinami dusíku a složením oxidů dusíku není jednoduchý[6,60], ale základem je poměr obsahů N_5/N_6, z něhož lze složení oxidů dusíku předpovědět.

Dalším heteroatomem je síra, která vystupuje v organické substanci uhelné hmoty v podobě thiolů, organických sulfidů a disulfidů a thiofenických struktur[61].

Formy síry jsou sledovány v podstatě čtyřmi metodami. Vedle zmíněných metod XPS a XANES je to technika XAFS (sulfur K-edge X-ray absorption fine structure spectroscopy) a dále teplotně programovaná redukce forem organické síry za atmosférického tlaku[3] (AT-TPR).

Metodou XPS byla odlišena alifatická a aromatická resp. thiofenická síra[62]. Sledovaná americká, španělská, novozélandská a jugoslávská uhlí obsahovala z celkového množství organické síry 26–29 % alifaticky vázané síry a 64–70 % aromatické a thiofenické síry. Vyskytly se však vzorky obsahující 66 % alifatické síry a 34 % aromatické resp. thiofenické síry.

Metodou XANES[63] byl vedle podílu alifatické síry stanoven podíl aromatické S a podíl thiofenické S. Modelovou sloučeninou alifaticky vázané síry je v případě uhlí dibenzylsulfid nebo methylbenzylsulfid; u aromatické síry je to diarylsulfid a u thiofenické benzo- nebo dibenzothiofen. Obsah alifatické síry se pohyboval v rozmezí 13–33 % z celkové organické síry, obsah aromatické síry byl mezi 20–34 % a thiofenické mezi 41–60 %.

Studie technikou XAFS[4] byly zaměřeny na macerálové skupiny resp. frakce amerických černých uhlí. Ve sledovaných frakcích bylo nalezeno 13–32 % alifatické S a 62–70 % thiofenické S, přičemž obsah alifatické S byl u liptinitických (tj. méně aromatických) frakcí větší než u více aromatických frakcí vitrinitu a inertinitu.

Klíčovou metodou pro charakterizaci dominantních forem organické síry a forem jejich relativního obsahu je metoda AT-TPR, aplikovaná u vitrinitických frakcí polských uhlí[3]. Tato metoda prokázala, že u frakcí s 81 hmot.% C v organické substanci převládají arylalkylsulfidy; diarylsulfidy a thiofeny jsou v menšině. Naproti tomu frakce s 83–85 % C obsahují diarylsulfidy a hlavně jednoduché thiofeny. Vzroste-li obsah C na 88 %, převládnou thiofeny s několika připojenými aromatickými kruhy, tj. více aromatizované, a konečně při obsahu 90 % C zcela dominují multikondenzované aromatické klastry thiofenu.

U frakcí ostravsko-karvinských uhlí byly technikou XPS a porovnáním s frakcemi polských uhlí Hornoslezské pánve nalezeny alkylsulfidy typu dibenzylsulfidu a methylbenzylsulfidu (25–44 % z celkové organické síry), jednoduché thiofeny s diarylsulfidy (37–77 %) nebo více kondenzované thiofeny[59] (56–71 %). Obsah organické síry v uhelné substanci je většinou malý, např. 0,5–1 hmot.%.

Z uvedených údajů úhrnně vyplývá, že černá uhlí mají tyto strukturní rysy:

– tří- až pětijaderné aromatické klastry,
– buď zřetelně vyšší nebo srovnatelný podíl etherického kyslíku v porovnání s hydroxylovým, přičemž obsahy etherického a hydroxylového kyslíku jsou řádově vyšší než obsah kyslíku karbonylového,
– stejný nebo dvojnásobný nebo i vyšší podíl pyrrolového dusíku v porovnání s pyridinovým,
– malý podíl organicky vázané síry, která byla prokázána jednak jako thiofenická nebo diarylsulfidická, jednak jako alifaticky vázaná sulfidická, jejímž modelem je dibenzylsulfid.

Z uvedených poznatků a strukturních rysů lze vyjít při koncipování modelů struktur uhlí. Modely uhelných molekul resp. makromolekulárních asociátů budou předmětem následujícího sdělení.

Seznam symbolů

A^d	obsah popela v suchém vzorku
C_{arom}	množství aromatických uhlíků
C^{daf}	obsah uhlíku v organické substanci
d	zdánlivá hustota
f_a	aromaticita
f_b	podíl můstkových uhlíků
I	inertinit
Kv.1, Kv.2, F	vzorky uhlí
L	liptinit
M_c	molekulová hmotnost uhlí vztažená na atom uhlíku
M_r	relativní molekulová hmotnost
N_5	pyrrolový dusík
N_6	pyridinový dusík
n_C	počet atomů uhlíku v molekule uhlí
O_{celk}	celkový kyslík
O_{CO}	karbonylový kyslík
$O_{–O–}$	etherický kyslík
O_{OH}	hydroxylový kyslík
S_t^d	celková síra v suchém vzorku
V	vitrinit
V^{daf}	prchavá hořlavina
W^a	voda v analytickém vzorku

Zkratky

^{13}C CP/MAS NMR	nukleární magnetická rezonance v pevné fázi
AT-TPR	programově řízená redukce za atm. tlaku
DD	technika dipolar-dephasing
DRIFTS-PLS	difuzně reflexní infračevená spektrometrie s Fourierovou transformací a statistikou částečných nejmenších čtverců
XAFS	X-ray absorption fine structure spectroscopy
XANES	X-ray absorption near-edge structure spectroscopy
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou Akademie věd České Republiky jako grantový projekt č. A2046902.

LITERATURA

1. Straka P., Buchtele J., Machovič V.: Acta Montana, Ser. B, *1995 (5)*, 75.
2. Straka P., Endrýsová J.: Chem. Pap. *53(5)*, 283 (1999).
3. Maes I.: Fuel *76*, 391 (1997).
4. Huffman G. P.: Energy Fuels *5*, 574 (1991).
5. Kelemen S. R., Gorbaty M. L., Kwiatek P.: Energy Fuels *8*, 896 (1994).
6. Pels J. R.: Carbon *33*, 1641 (1995).
7. Buchtele J., Straka P.: *II. Seminarium Powierzchnia Wegla '93, Kraków 1993*, str. 19.
8. Straka P., Buchtele J.: *7th Int. Conf. on Coal Science, Banff – Alberta/Canada 1993*, str. 371.
9. Straka P.: Sborník geologických věd, Technologie – geochemie *24*, 153 (1989).
10. Solomon P. R.: Am. Chem. Soc. Symp. Ser. *169*, 61 (1981).
11. Ouchi K.: Fuel *62*, 1227 (1983).
12. Klotzkin M. P.: Fuel *64*, 1092 (1985).
13. Marzec A.: Fuel Proces. Technol. *2*, 35 (1979).
14. Šindler S., Včelák V., Buchtele J.: Sborník VŠCHT Praha *D 31*, 371 (1974).
15. Whitehurst D. D., Mitchell T. O., Farcasiu M.: *Coal Liquefaction.* Academic Press, New York 1980.
16. Carlson G. A.: *Intern. Conf. on Coal Science, Newcastle upon Tyne 1991*, str. 24.
17. Carlson G. A.: Energy Fuels *6*, 771 (1992).
18. Shinn J. H.: Fuel *63*, 1187 (1984).
19. Lazarov L., Marinov S. P.: Fuel Proces. Technol. *15*, 411 (1987).
20. Takanohashi T.: *8th Int. Conf. on Coal Science, Oviedo 1995*, str. 55.
21. Nakamura K.: Energy Fuels *9*, 1003 (1995).
22. Jasienko S.: *Chemiczne modele struktury wegla.* Politechnika Wroclawska, Wroclaw 1995.
23. Wiser W. H.: NATO ASI Ser. C *124*, 325 (1984).
24. Mazumdar B. K., Ghosh G.: *Intern. Conf. on Coal Science, Pittsburgh 1983*, str. 342.
25. Kovac J.: Macromolecules *11*, 362 (1978).
26. van Krevelen D. W.: *Coal – Typology, Physics, Chemistry, Constitution*, 3. vyd.. Elsevier, Amstredam 1993.
27. Gorbaty M. L.: Fuel *73*, 1819 (1994).
28. Sun J. Y., Burk E. H.: *Proceedings of a Workshop, University of Tennesee, Knoxville 1975*.
29. Collins C. J., Hombach H. P., Maxwell B. E., Benjamin B. M.: J. Am. Chem. Soc. *102*, 851 (1980); *103*, 1213 (1981).
30. Solumn M. S., Pugmire R. J., Grant D. M.: Energy Fuels *3*, 187 (1989).
31. Straka P., Endrýsová J., Zubková H.: Uhlí–Rudy–Geol. Pruzkum *5*, 99, (1998).
32. Fan Li, Yong-Fa Zhang, Ke-Chang Xie: *8th Intern. Conf. on Coal Science, Oviedo 1995*, str. 243.
33. Lazarov L., Simeonov M. F., Marinov S. P.: Fresenius' J. Anal. Chem. *319*, 552 (1984).
34. Marzec A.: Fuel Proces. Technol. *14*, 39 (1986).
35. van Krevelen D. W., v knize: *Coal – Typology, Physics, Chemistry, Constitution*, 3. vyd. Elsevier, Amsterdam 1993.
36. Mudamburi Z., Given P. H.: *Dependence of Liquefaction of Some American and British Coals.* Final Report, Part III, Rept. No. DOE/PC/40784-TI. US Dept. of Energy, Oak Ridge.
37. Razvigorova M.: Fuel *74*, 1333 (1995).
38. Larsen J. W., Green T. K., Kovacz J.: J. Org. Chem. *50*, 4729 (1985).
39. Vahrman M., Watts R. H.: Fuel *51*, 235 (1972).
40. Vahrman M., Watts R. H.: Fuel *51*, 130 (1972).
41. Straka P., Buchtele J.: *9th Intern. Conf. on Coal Science, Essen 1995*, str. 243.
42. Cody G. D., Davis A., Hatcher P. G.: Energy Fuels *7*, 455 (1993).
43. Cody G. D., Davis A., Hatcher P. G.: Energy Fuels *7*, 463 (1993).
44. Quinga E. M. Y., Larsen J. W.: Energy Fuels *1*, 300 (1987).
45. Nishioka M., Gebhard L. A., Silbernagel B. G.: Fuel *70*, 341 (1991).

46. Spiro C. L., Kosky P. G.: Fuel *61*, 1080 (1982).
47. Mu R., Malhotra V. M.: Fuel *70*, 1233 (1991).
48. Carlon H. R.: Infrared Phys. *19*, 549 (1979).
49. Straka P., Buchtele J., Náhunková J.: Acta Montana, Ser. B *No. 9 (112)*, 47 (1999).
50. Straka P., Buchtele J., Náhunková J.: *10th Intern. Conf. on Coal Science, Taiyuan 1999*, sv. I, str. 113.
51. Sýkorová I.: *Disertační práce.* Ústav geologie a geotechniky ČSAV, Praha 1982.
52. Tekely P., Nicole D., Delpuech J. J., v knize: *Advanced Methodologies in Coal Characterization*. Elsevier, Amsterdam 1990.
53. Straka P., Machovič V., Buchtele J., Endrýsová J.: Acta Montana Ser. B *No. 7 (105)*, 63 (1997).
54. Straka P., Sýkorová I., Brožová Z.: Uhlí–Rudy–Geol. Pruzkum *3*, 223 (1996).
55. Straka P., Machovič J., Buchtele J., Endrýsová J.: Chem. Listy *92*, 499 (1998).
56. Straka P., Marinov S., Tyuliev G.: Acta Montana, Ser. B, v tisku.
57. Burchill P., Welch L. S.: Fuel *68*, 100 (1989).
58. Mullins O. C., Kirtley S. M., van Elp, Cramer S. P.: Appl. Spectrosc. *47*, 1268 (1993).
59. Straka P.: Acta Montana, Ser. B, v tisku.
60. Cagniant D., Gruber R.: Energy Fuels *12*, 672 (1998).
61. Jasienko S.: *Chemia i fyzika wegla*. Politechnika Wroclawska, Wroclaw 1995.
62. Gorbaty M. L., Kelemen S. R., George G. N., Kwiatek P. J.: Fuel *71*, 1255 (1992).
63. George G. N., Gorbaty M. L., Kelemen S. R., Sansone M.: Energy Fuels *5*, 93 (1991).

P. Straka *(Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Chemical Structure of Bituminous Coals**

Problems of chemical structure of bituminous coals are summarized. The concept of coal as an aggregate of coal macromolecules or oligomer molecules linked by non-covalent bonds is discussed. For low-rank coals, a two-phase model is accepted, for high-rank coals, a one-phase model can be considered. Aromaticity and related parameters as well as oxygen, nitrogen and sulfur functionalities are quantified, compared with other data and their role in coal structure is expressed. Finally, structural features of bituminous coals are listed: the cluster size is 3–5 rings, ether and hydroxy oxygens predominate over carbonyl oxygen, pyrrole and pyridine nitrogen are main forms of the nitrogen content, diaryl sulfides, dibenzothiophene and higher-fused thiophenes are prevailing forms of organic sulfur, whereas dialkyl sulfides are minority components.

PURINOVÉ 8-*O*- A 8-*S*-CYKLONUKLEOSIDY – SYNTÉZA A VLASTNOSTI

ZLATKO JANEBA

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: janeba@uochb.cas.cz

Došlo dne 5.VIII. 1999

Klíčová slova: nukleosidy, nukleotidy, acyklické analogy nukleosidů, cyklizace

Obsah

1. Úvod
2. Purinové *O*-cyklonukleosidy
3. Purinové *S*-cyklonukleosidy
4. Purinové *Se*-cyklonukleosidy
5. Reakce purinových cyclonukleosidů
6. Transformace purinové báze v cyklonukleosidech
7. Fyzikální vlastnosti purinových cyclonukleosidů
8. Acyklické analogy purinových cyklonukleosidů a cyklonukleotidů
9. Polynukleotidy obsahující purinové cyklonukleosidy

1. Úvod

V oblasti chemie nukleosidů zaujímají význačné místo purinové deriváty modifikované v poloze C-8. Některé z nich mají významné biologické účinky[1], např. 8-aminoadenosin vykazuje výraznou inhibici nádorových buněk sarkomu 180 a rezistenci vůči adenosindeaminase[2]. 8-Aminoderiváty purinových nukleosidů přitahují zájem z důvodu jejich strukturní podobnosti se saxitoxinem, paralytickým toxinem vyskytujícím se u mořských obrněnek (*Dinophyceae*)[3,4]. 8-Aminoderiváty guaninu významě inhibují purinnukleosidfosforylasu, klíčový enzym katabolismu purinů[5,6]. 8-Merkaptoguanosin má výrazné imunomodulační účinky, 7-alkyl-8--oxoguanosin (loxoribin) je studován pro svůj aktivační vliv na proliferaci B-lymfocytů a aktivaci přirozených zabíječů (NK-buněk)[7,8].

Cyklonukleosidy se liší od běžných nukleosidů tím, že kromě glykosidické vazby navíc mají kovalentní vazbu (buď přímo vycházející z uhlíkového atomu nebo přes atom jiný, např. kyslík) mezi uhlíkovým atomem 2', 3' nebo 5' cukerné části a uhlíkem nebo dusíkem purinového (popř. pyrimidinového) skeletu.

Na tomto místě je potřeba zmínit se o nomenklatuře 8-cyklonukleosidů. Tak např. 8,5'-*O*-cykloadenosin (*I*, obr. 1), což je triviální název, může být pojmenován jako 8,5'-anhydro-9--(β-D-ribofuranosyl)-8-hydroxyadenin, nebo také (8*R*)-4-amino-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-8*r*,11*c*-epioxido-<1,3>oxazocino-<3,2-*e*>purin-9*c*,10*c*-diol. Z důvodu přehlednosti a srozumitelnosti používám v této práci směsi triviálního názvosloví a názvosloví odvozeného od cukrů, běžně používaného v chemii nukleových kyselin.

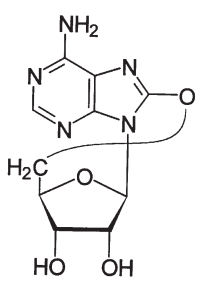
První cyklonukleosid byl připraven roku 1951 Lordem Toddem a jeho kolegy[9]. Následně se cyklonukleosidy staly středem zájmu výzkumu mnoha světových pracovišť. Obecně jsou považovány za univerzální meziprodukty při přípravě biologicky důležitých nukleosidů a pro svou rigidní strukturu také za velmi vhodný nástroj pro jejich konformační studie.

Cílem této práce je podat přehled o syntéze a využití cyklonukleosidů a jejich derivátů. Zaměřil jsem se pouze na purinové 8-cyklonukleosidy, které obsahují v poloze C-8 atom skupiny VI A periodické soustavy prvků, tj. kyslík, síru, popř. selen. Nezabývám se zde purinovými 8-*N*-cyklonukleosidy, jejichž chemie je také dosti bohatá (možnost další substituce na atomu dusíku *N*-cyklonukleosidu)[10-15]. Dále se nezabývám 8-*C*-cyklonukleosidy, u nichž je atom uhlíku cukerné části vázán přímo k uhlíku C-8 purinové báze[16-21].

2. Purinové *O*-cyklonukleosidy

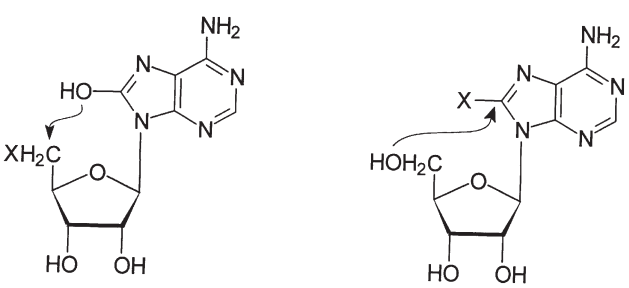
Sloučeniny, které zapadají do této kategorie zahrnují 8,2'-, 8,3'- a 8,5'-cyklonukleosidy odvozené od adenosinu, guanosinu a inosinu (popř. dalších derivátů purinu).

Obecně může k tvorbě *O*-cyklonukleosidu dojít dvěma způsoby (obr. 2). Buď hydroxyskupina na bázi v poloze C-8 atakuje elektrofilní uhlík cukerné části molekuly, nebo naopak hydroxyskupina na cukru atakuje elektrofilní uhlík báze.

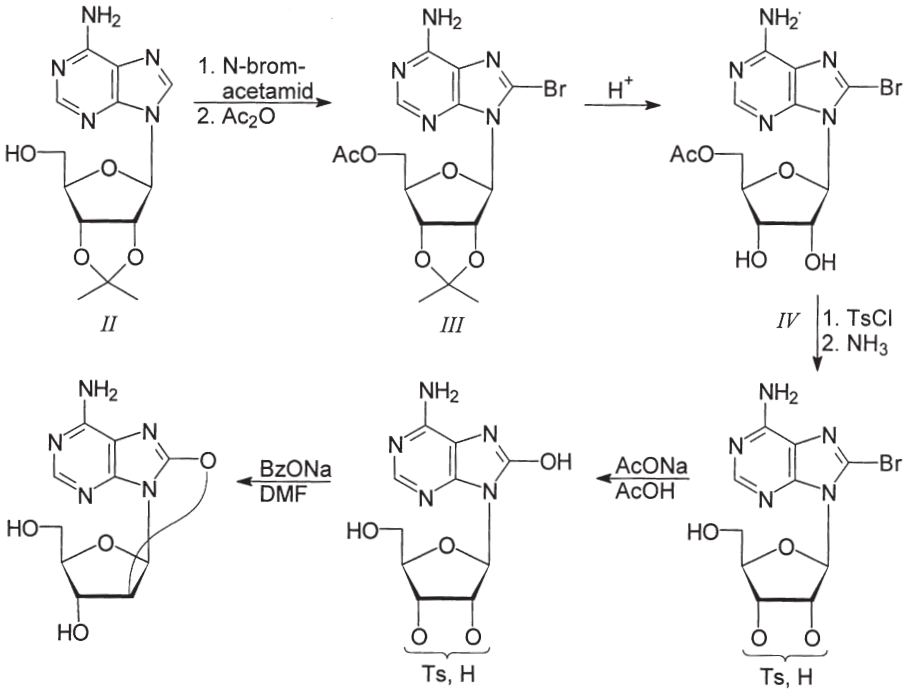


I

Obr. 1.

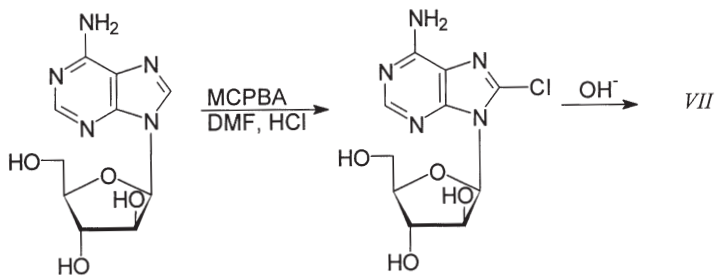


Obr. 2.



II *III* *IV* *V* *VI* *VII*

Schéma 1



VIII *IX* *VII*

Schéma 2

Významnou osobností chemie nukleosidů a nukleotidů je Japonec Morio Ikehara, který se také zabýval přípravou a chemickými i fyzikálními vlastnostmi cyklonukleosidů[22]. Jeho pracovní skupina v roce 1966 připravila 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin[23] (*VII*), první purinový cyklonukleosid obsahující *O*-anhydro vazbu (schéma 1). 2',3'-*O*-Isopropylidenadenosin (*II*) byl bromován *N*-bromacetamidem v chloroformu[24], a po acetylaci, kyselém odstranění isopropylidenové funkce, tosylaci a následné deacetylaci, byl bromderivát *V* převeden na hydroxyderivát *VI* reakcí s octanem sodným v kyselině octové[25]. Cyklonukleosid *VII* byl získán zahříváním 8-hydroxyderivátu *VI* s benzoátem sodným v DMF (cit.[26]).

Obecně je tedy při syntéze cyklonukleosidů prvním krokem halogenace (převážně bromace) nukleosidu. Bromace může být provedena u derivátů guanosinu bromem v kyselině octové v přítomnosti octanu sodného[24], u derivátů adenosinu *N*-bromacetamidem v chloroformu[24], nebo, v případě obou purinových nukleosidů směsí brom–dioxan v přítomnosti uhličitanu vápenatého[27,28]. Výtěžek bromace byl podstatně zvýšen použitím vodného acetátového pufru[29,30].

Chloraci purinových nukleosidů do polohy 8 lze provést za použití tetrabutylammonium jodtetrachloridu[31] nebo *terc*-butylhypochloritu[32], ačkoliv výtěžky jsou nízké. Lepšího výsledku bylo dosaženo použitím *m*-chlorperoxybenzoové kyseliny v DMF nebo DMA v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové[33]. Chlor derivát *IX* velmi snadno podléhá intramolekulární cyklizaci na 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin (*VII*) v přítomnosti báze nebo i adsorpcí na silikagel a následnou elucí (schéma 2).

8-Hydroxyadenosin, jako výchozí látka pro intramolekulární cyklizaci, může být připraven reakcí 8-bromadenosinu s octanem sodným v kyselině octové[25] nebo v acetanhydridu[34].

Pro počáteční potíže s cyklizací 8-hydroxy-9-(3-*O*-tosyl-β-D-ribofuranosyl)adeninu z důvodu velké sterické distorze[23] byl jako výchozí látka použit derivát 2'-deoxyadenosinu[34]. Jako dobře odstupující skupiny na cukerné části molekuly mohou být použity např. triisopropylbenzensulfonyl[35,36], *p*-methylbenzensulfonyl (tosyl)[28,37,38], cyklické karbonáty (2',3'-

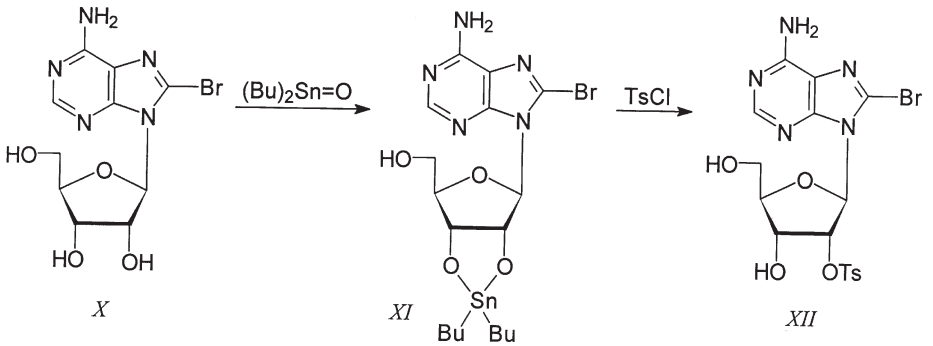


Schéma 3

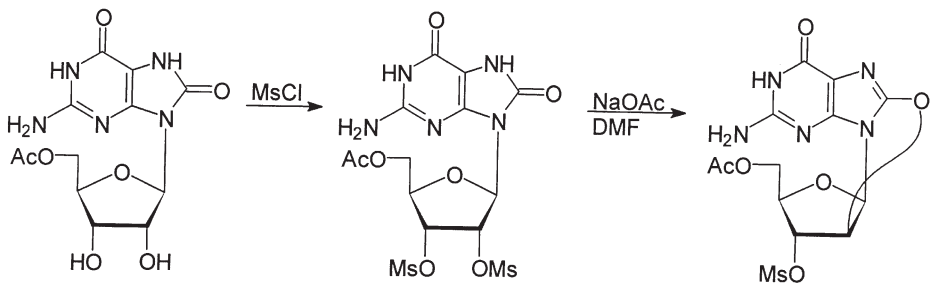


Schéma 4

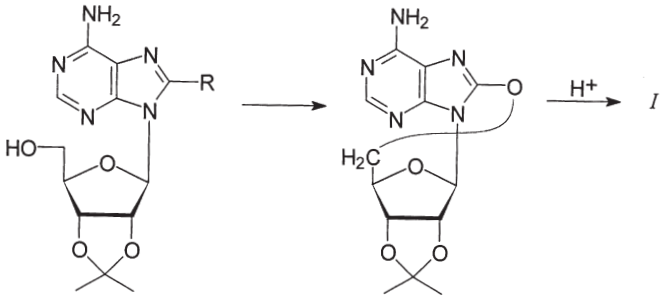
-karbonát)[39,40]. 8-Bromadenosin (*X*) (popř. 8-bromguanosin) může být tosylován na 2'-hydroxylu přes 2',3'-*O*-dibutylcín derivát *XI* (schéma 3) (cit.[41]). Následná cyklizace derivátu *XIII* na cyklonukleosid *VII* probíhá působením báze (např. hydroxidem sodným, amoniakem). Stejně lze tosylovat i 8-bromderivát 5'-deoxyadenosinu na směs 2'-tosyl- a 3'-tosylderivátu[42].

Při reakci 8-brom-9-(2,3,5-tri-*O*-acetyl-β-D-arabinofuranosyl)adeninu s poměrně bazickým nukleofilem, jako je methoxid sodný a amoniak, dochází k intramolekulární výměně bromu za vzniku 8,2'-anhydro-8-hydroxy-9-(β-D-arabinofuranosyl)adeninu[43]. Je-li k reakci použito méně bazických nukleofilů, např. thiomočoviny nebo azidu sodného, dojde k přímé výměně bromu za nukleofil za vzniku 8-thio- popř. 8-azidoderivátu. V případě 8-brom-9-(2,3,5-tri-*O*-acetyl-β-D-xylofuranosyl)adeninu dojde k přímé substituci atomu bromu příslušným nukleofilem (neutrálním i bazickým) aniž by došlo k intramolekulární reakci za vzniku 8,3'-cyklonukleosidu.

Syntéza prvního *O*-cyklonukleosidu guanosinu byla popsána v roce 1967 Ikeharou[44]. Z 9-(5-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-8-hydroxyguaninu (*XIV*) byl připraven 2',3'-di-*O*-mesylderivát *XV*, který zahříváním na 100 °C v DMF s octanem sodným poskytl derivát 8,2'-*O*-cykloguanosinu *XVI* (schéma 4). Z toho lze usuzovat, že 2'-*O*-mesylskupina podléhá cyklizaci snadněji než ta v poloze C-3'. Při pokusu získat tímto postupem derivát 8,5'-cykloguanosinu byl zahříváním 8-hydroxy-2',3'-*O*-isopropyliden-5'-*O*-mesylguanosinu získán N^3,5'-cyklonukleosid.

Jednoduchým způsobem přípravy 8,5'-*O*-cykloadenosinu (*I*) je cyklizace bromderivátu *XVII* hydridem sodným v bezvodém dioxanu[45,46] nebo kyanidem draselným v DMF (cit.[47]) a následné deblokování cukerné části 1 M vodným roztokem kyseliny sírové (schéma 5). Stejně lze cyklizovat 8-brom-2',3'-*O*-isopropylideninosin a 8-brom-2',3'-*O*-isopropylidenguanosin[48]. Pokus o cyklizaci nechráněného 8-bromadenosinu (*X*) stejným způsobem však nebyl úspěšný[49].

V roce 1992 byla japonskými autory popsána elegantní metoda přípravy derivátu 8,5'-*O*-cycloadenosinu *XVIII* oxidativní cyklizací 2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu (*II*) s octanem olovičitým (schéma 5) (cit.[50]). Kromě octanu olovičitého[51] mohou být k cyklizaci použita další oxidační činidla, jako chlorid měďnatý[52], *N*-halogensukcinimid[53] nebo ozařování 400 W vysokotlakou rtuťovou lampou (> 355 nm) v přítomnosti pyrimido[5,4-*g*]pteridintetraon *N*-oxidu[54,55]. Tato intra-



II R = H, $Pb(OAc)_4$/benzen
XVII R = Br, NaH/dioxan

Schéma 5

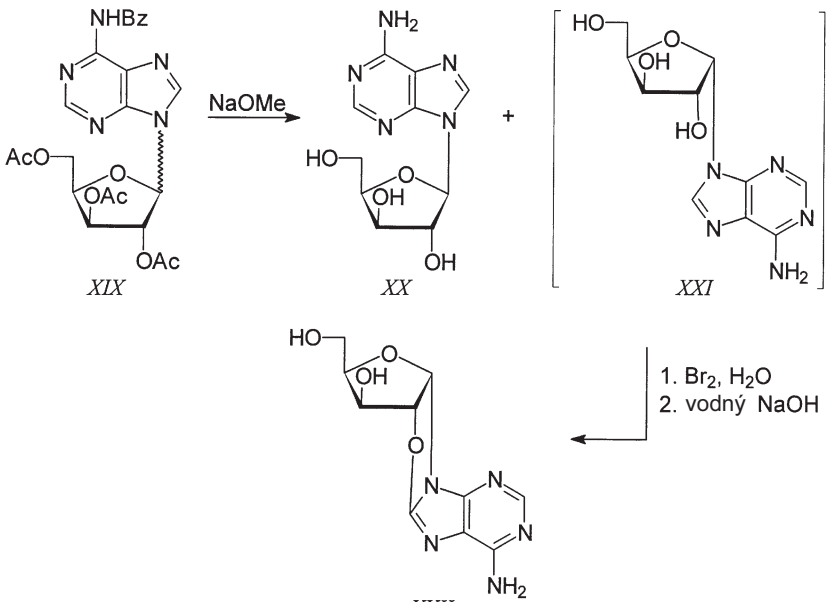


Schéma 6

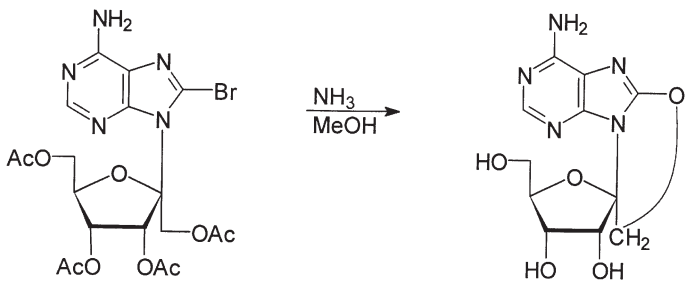


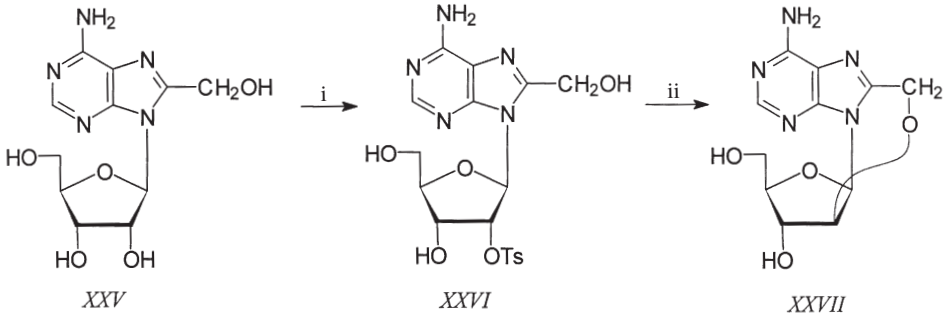
Schéma 7

molekulární reakce poskytuje novou metodu pro chemickou modifikaci derivátů adenosinu.

Pro hladkou konverzi 2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu (*II*) na derivát cykloadenosinu *XVIII* je potřeba použít 1,2 ekvivalentu octanu olovičitého. Výtěžek reakce provedené v refluxujícím suchém benzenu pod argonem byl 93 %. Nechráněný adenosin za stejných podmínek neposkytl cyklický produkt. Dále je zřejmý vliv N^6-substituentu na průběh reakce. Snadnost oxidativní cyklizace klesá v řadě 2',3'-*O*-isopropylidenderivátů N^6-benzoyladenosinu, adenosinu, N^6-methyladenosinu a N^6,N^6-dimethyladenosinu. Výrazný substituční efekt N^6-benzoylskupiny je vysvětlován zvýšením nukleofility dusíku N^7 v imidazolovém kruhu a tím jeho větší koordinační schopnosti vůči olovičitému iontu, jehož koordinace v N^7-poloze je prvním krokem oxidativní cyklizace.

V roce 1968 byla popsána syntéza α-cyklonukleosidu 8,2'-anhydro-8-hydroxy-9-(α-D-xylofuranosyl)adeninu (*XXII*) (cit.[56]), vycházející z 9-(α-D-xylofuranosyl)adeninu (*XXI*), bromací a cyklizací pomocí hydridu sodného (schéma 6) (cit.[57]).

Přes odpovídající 8-bromderivát *XXIII* byl připraven 8,1'-



i TsCl
ii *terc*-butoxid draselný, *terc*-butanol

Schéma 8

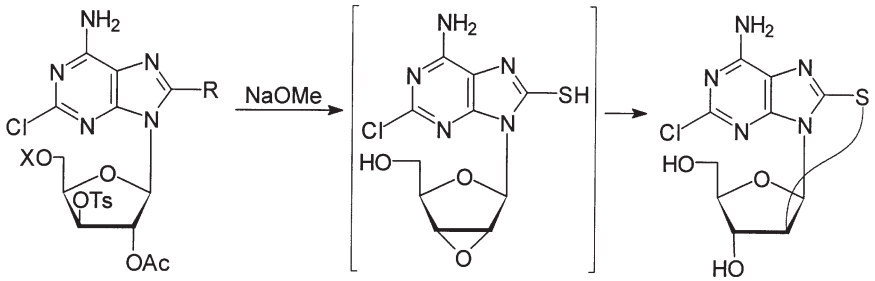


Schéma 9

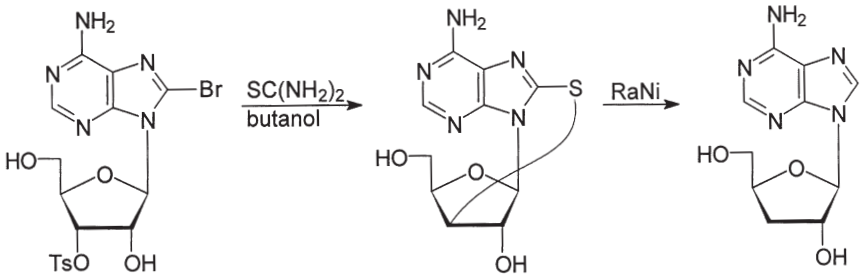


Schéma 10

-anhydro-8-hydroxy-9-(2-β-D-psik ofuranosyl)adenin (*XXIV*), což je v podstatě typ 8,1'-cyklonukleosidu (schéma 7) (cit.[58]).

O-Cyklonukleosidy odvozené od hypoxanthinu a 6-merkaptopurinu lze kromě derivatizace odpovídajících cykloadenosinů připravit cyklizací příslušných 2'- nebo 3'-TPS-derivátů (2,4,6-triisopropylbenzensulfonylderiváty) 8-hydroxynukleosidů v přítomnosti báze[59].

Reakcí 8-hydroxymethyl derivátu *XXVI* s *terc*-butoxidem draselným ve směsi *terc*-butanolu a DMF byl připraven 8,2'--anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxymethyladenin (*XXVII*, schéma 8) (cit.[60]).

V poslední době byly připraveny anhydroderiváty odvozené od karbocyklických analogů purinových a pyrimidinových nukleosidů[61]. Dále byly připraveny cyklonukleosidy, u nichž je pyrimidinový kruh purinového skeletu nahrazen substituovaným benzenovým jádrem[62].

3. Purinové *S*-cyklonukleosidy

S-cyklonukleosidy purinových bází jsou významnými prekursory v syntéze nukleosidových analogů a především deoxynukleosidů desulfurací Raneyovým niklem.

První cyklonukleosid tohoto typu byl připraven v roce 1963, a to také (jako v př. prvního *O*-cyklonukleosidu) v Japonsku[63]. Kondenzace báze a cukru Davollovou metodou[64] poskytla derivát *XXVIII*, který byl převeden na 8-thioderivát *XXIX* reakcí s thiomočovinou v n-butanolu (schéma 9). 8,2'--Anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-2-chlor-8-merkaptoadenin (*XXXI*) byl připraven z thioderivátu *XXIX* za refluxu v methanolu v přítomnosti methoxidu sodného. Desulfurace 8,2'--*S*-cyklonukleosidu *XXXI* Raneyovým niklem a následná hydrogenace nad palladiem na uhlí poskytla 2'-deoxyadenosin[65].

Tosylací 5'-*O*-acetyl-8-bromadenosinu byly po deacetyla-

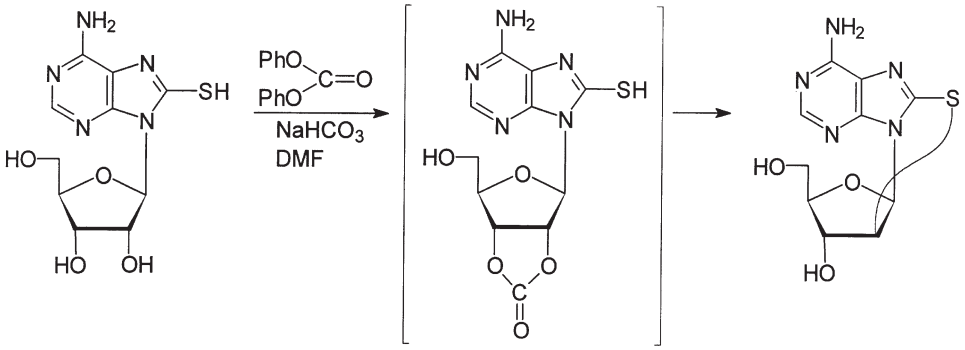


Schéma 11 *XXXV* *XXXVI* *XXXVII*

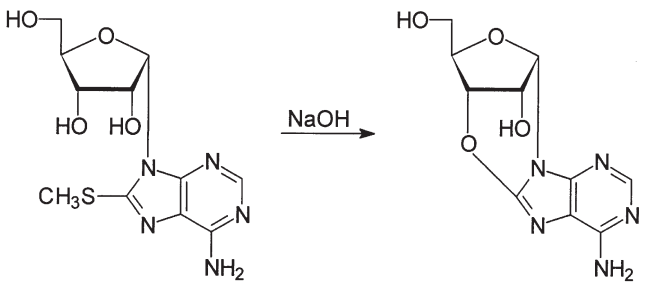


Schéma 12 *XXXVIII* *XXXIX*

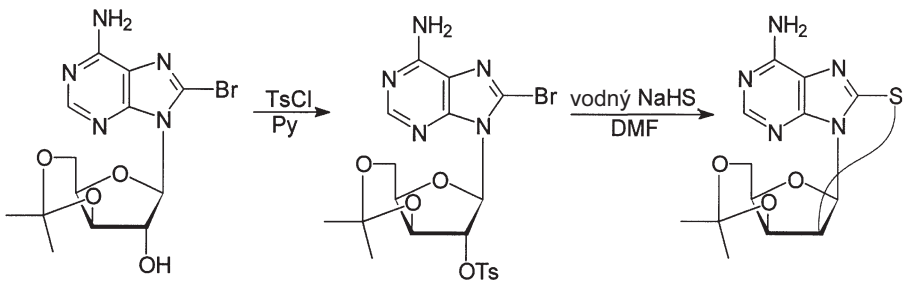


Schéma 13 *XL* *XLI* *XLII*

ci a dělení získány 2'-*O*-tosyl-, 3'-*O*-tosyl- a 2',3'-di-*O*-tosylderivát 8-bromadenosinu[66]. Reakce 3'-*O*-tosylderivátu *XXXII* s thiomočovinou v butanolu (popř. s hydrogensulfidem sodným v DMF (cit.[67])) poskytla derivát *XXXIII* a následná desulfurace 3'-deoxyadenosin (Kordycepin, *XXXIV*, schéma 10), v případě 2'-*O*-tosyl- a 2',3'-di-*O*-tosylderivátu byl získán 2'-deoxyadenosin. Vyjde-li se z derivátu 5'-deoxyadenosinu, lze takto připravit 2',5'-dideoxyadenosin a 3',5'-dideoxyadenosin[42]. Jako dobře odstupující skupinu lze také použít 2,4,6--triisopropylbenzensulfonyl (TPS)[68]. Ta byla použita i v případě cyklizací N^6-dimethylderivátů adenosinu[36].

K syntéze *S*-cyklonukleosidů lze použít také cyklické 2',3'-karbonáty. 8-Merkaptoadenosin (*XXXV*) poskytne zahříváním s difenylkarbonátem a hydrogenuhličitanem sodným v DMF 8,2'-*S*-cykloadenosin (*XXXVII*, schéma 11) (cit.[39]), nebo lze nejprve připravit cyklický 2',3'-karbonát 8-bromadenosinu a ten následně cyklizovat thiomočovinou v butanolu[69]. Stejně lze postupovat i v případě 2',3'-*O*-sulfinylderivátů 8-bromadenosinu[70].

Difenylkarbonát, jako cyklizační činidlo, byl použit k cyklizaci dalších nukleosidů, obsahujících jako purinovou bázi 8-merkaptoguanin, 6,8-dimerkaptopurin, 2-amino-6,8-dimerkaptopurin, 8-merkaptoxanthin a 8-merkaptohypoxanthin[71-73].

8-Methylthioderivát α-ribosidu *XXXVIII* poskytl působením methoxidu sodného nebo hydroxidu sodného 8,3'-cyklonukleosid *XXXIX* za odštěpení methanthiolu (schéma 12). Příslušné β-ribosidy za totožných podmínek cyklonukleosidy netvoří[74].

Bromací a následným chráněním 9-(β-D-xylofuranosyl)-adeninu byl připraven 3',5'-*O*-isopropylidenderivát *XL*, který po tosylaci poskytl reakcí s hydrogensulfidem sodným 8,2'--anhydro-9-(3,5-*O*-isopropyliden-β-D-xylofuranosyl)-8-merkaptoadenin (*XLII*, schéma 13) (cit.[57]).

Adenosin 5'-monofosfát (AMP) a jeho 8-bromderivát *XLIII* jsou v alkalickém prostředí přednostně tosylovány do 2' polohy[75,76]. V případě bromderivátu *XLIII* lze tosylací a následnou reakcí se sirovodíkem v pyridinu, popř. s hydrogensulfidem sodným ve směsi voda–DMF připravit 8,2'-*S*-cyklonukleotid *XLV*, po jehož desulfuraci se získá 2'-deoxyadenosin 5'-monofosfát (*XLVI*, schéma 14).

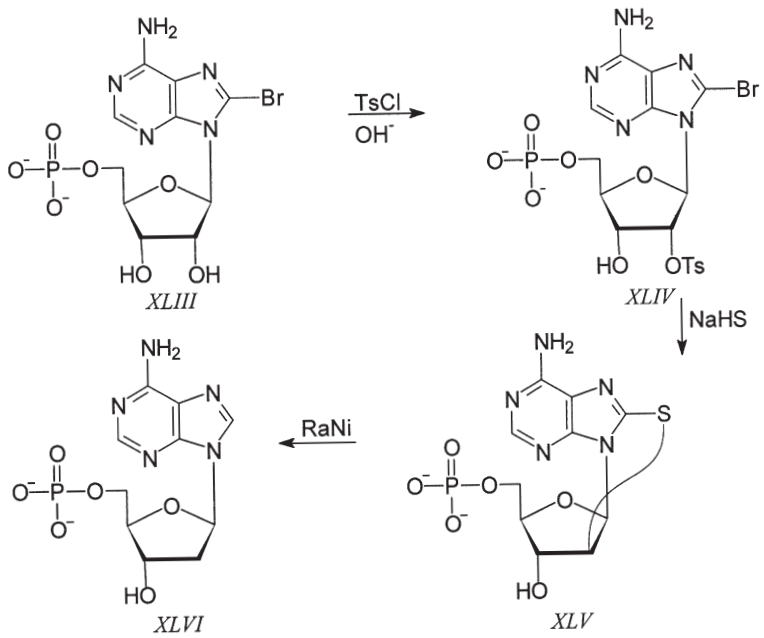


Schéma 14

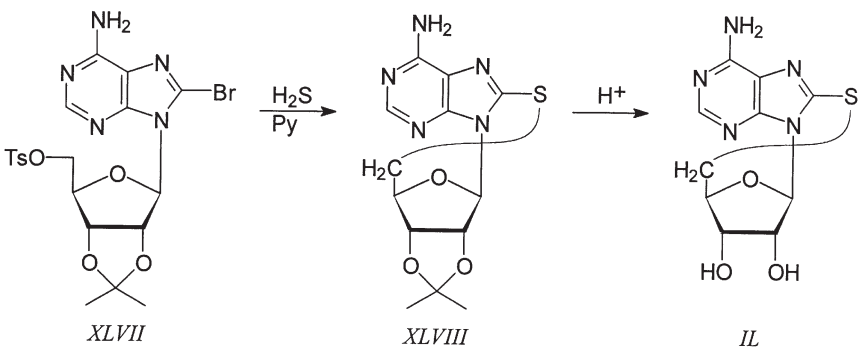


Schéma 15

Podobným způsobem byl připraven 5'-deoxyguanosin[27]. 8-Bromguanosin byl mesylchloridem v pyridinu převeden na 2',5'-di-*O*-mesylderivát, ten reakcí s thiomočovinou poskytl 8,5'-*S*-cyklonukleosid, který po desulfuraci Raneyovým niklem a po alkalickém štěpení 2'-mesylové skupiny dal 5'-deoxyguanosin. Vhodnější výchozí látkou pro cyklizaci se jeví 8-brom-2',3'-*O*-isopropylidenguanosin[77].

Z 8-brom-9-(2-mesitylensulfonyl-β-D-ribofuranosyl)guaninu lze reakcí s hydrogensulfidem sodným připravit příslušný 8,2'-*S*-cyklonukleosid a jeho následnou desulfurací 2'-deoxyguanosin[78].

Pro přípravu 8,5'-*S*-cykloadenosinu (*IL*) byl jako výchozí látka připraven 8-bromderivát *XLVII* (schéma 15) (cit.[79]). Ten byl rozpuštěn v pyridinu a sirovodík byl probubláván tímto roztokem za laboratorní teploty. Získaný cyklonukleosid *XLVIII* poskytl zahříváním v 98 % kyselině mravenčí 8,5'-*S*-cykloadenosin (*IL*), jehož desulfurací byl připraven 5'-deoxyadenosin. K cyklizaci lze použít také směs pyridinu a vodného roztoku hydrogensulfidu sodného za chlazení[80]. Také lze nejprve reakcí brom derivátu *XVII* s hydrogensulfidem sodným v ethanolu připravit 8-merkaptoderivát, který následně za podmínek tosylace poskytne příslušný cyklický derivát *XLVIII* (cit.[81]).

8,5'-*S*-Cyklonukleosidy je možno také připravit tak, že se nejprve vytvoří 8,5'-*S*-anhydro vazba reakcí 8-merkaptoadeninu (*L*), resp. jeho sodné nebo draselné soli s vhodně chráněným cukrem (např. derivát *LI*), a teprve pak se vytvoří N^9-glykosidická vazba[82,83]. Takto byl připraven i cyklonukleosid *LIV* (schéma 16). Tímto postupem se zamezí vzniku N^3,5'-cyklických derivátů adeninu, které se jinak tvoří poměrně snadno[9,44,84,85].

Obecně může být hydroxylová skupina nahrazena širokou řadou nukleofilů za podmínek reakce dle Mitsunoba[86]. 8,5'--Anhydro-9-(2,3-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-8-merkaptoadenosin (*XLVIII*, 68 %) byl připraven přikapáním 1 ekvivalentu trifenylfosfinu a diethylazodicarboxylátu (DEAD) v suchém DMF k roztoku 8-merkaptoderivátu *LV* v DMF (schéma 17) (cit.[87]). Jelikož aminy za těchto podmínek tvoří *N*-fosfinfosfa-λ^5-azeny (cit.[88]), reaguje vzniklý cyklonukleosid následně s přebytkem trifenylfosfinu na *N*-[8,5'-anhydro-2',3'-*O*-isopropyliden-8-merkaptopurin-6-yl]trifenylfosfa-λ^5--azen (*LVI*). Ten vzniká ve vysokém výtěžku (87 %), použijí-li se 2 ekvivalenty trifenylfosfinu a diethylazodicarboxylátu.

8,2'-*S*-Cykloadenosin (*XXXVII*) lze připravit reakcí 3',5'--*O*-(tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)derivátu *LVII* s trifenylfosfinem a diethylazodicarboxylátem (DEAD) v THF za pod-

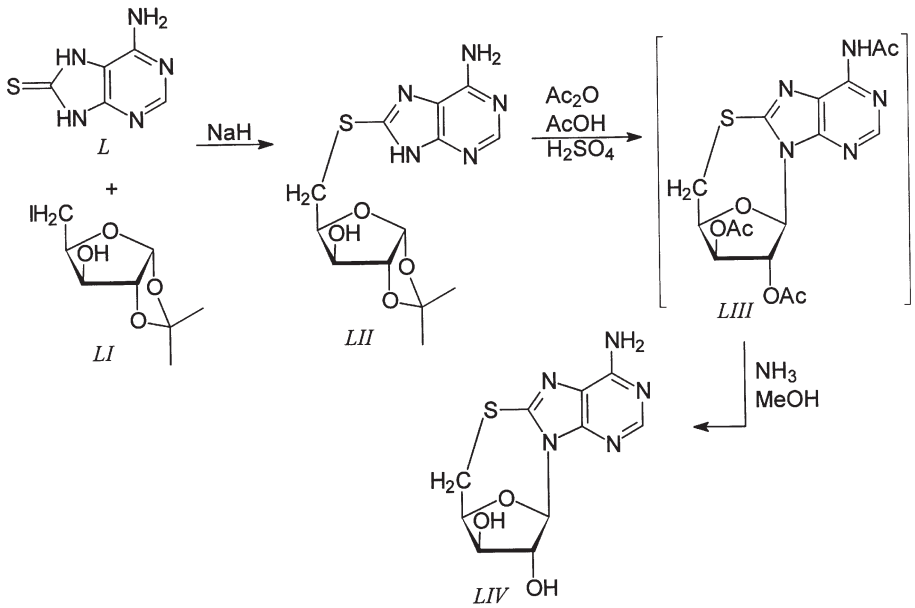
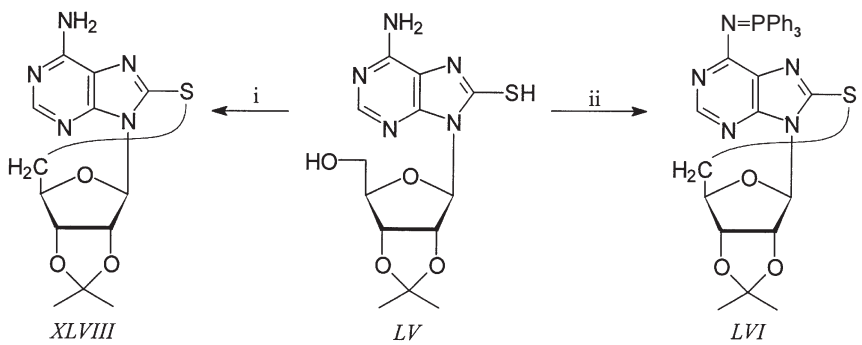


Schéma 16



i DEAD a PPh_3 (1 ekvivalent), DMF
ii DEAD a PPh_3 (2 ekvivalent), DMF

Schéma 17

mínek dle Mitsunoba[89] a následným odchráněním tetrabutylammonium fluoridem (TBAF) (schéma 18) (cit.[89]).

4. Purinové *Se*-cyklonukleosidy

Chemie purinů substituovaných v poloze 8 atomem selenu není příliš bohatá. Přes analogické prvky chemie síry a selenu je třeba se sloučeninami obsahujícími selen zacházet velmi opatrně z důvodu jejich značné toxicity. Jako první cyklonukleosid obsahující atom selenu byl připraven 2,2'-cyklo-2-selenocytidin[90].

8-Selenoadenosin (*LIX*) může být připraven reakcí 8-bromderivátu *X* s diselenidem sodným Na_2Se_2 v ethanolu v přítomnosti ethoxidu sodného[91] nebo se selenomočovinou v absolutním ethanolu (schéma 19) (cit.[92]). 8-Selenoadenosin (*LIX*) reakcí s 2-acetoxyisobutyrylchloridem v acetonitrilu za laboratorní teploty a následnou reakcí s methanolickým roztokem chlorovodíku poskytl 8,2'-*Se*-cykloadenosin (*LX*) v 54 % výtěžku[92].

5. Reakce purinových nukleosidů

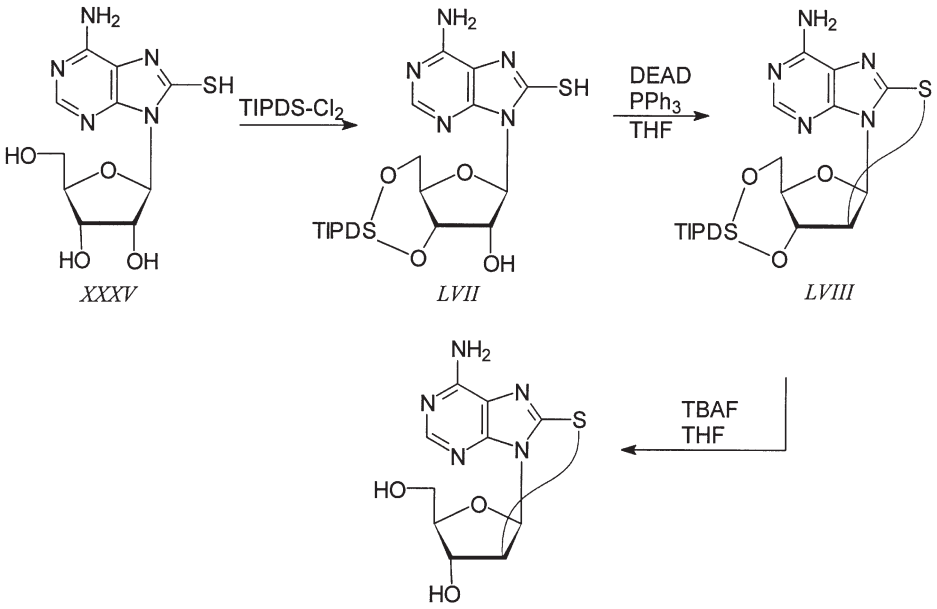
Jak již z výše uvedeného částečně vyplynulo, cyklonukleosidy mohou být výhodně použity jako meziprodukty k přípravě různě modifikovaných derivátů nukleosidů a nukleotidů, např. transformace ribonukleosidů na deoxynukleosidy nebo arabinonukleosidy atd.

S-Cyklonukleosidy mohou být snadno desulfurovány použitím Raneyova niklu na odpovídající deoxynukleosidy[93]. Na základě těchto pozorování byl vysloven i předpoklad o možné transformaci ribonukleosidů na příslušné deoxyderiváty v živých buňkách[94].

Desulfurace tedy poskytuje alternativní syntézu přírodního antibiotika Kordycepinu (3'-deoxyadenosinu, *XXXIV*) (cit.[68,95,96]), připraveného několika jinými postupy[97-100].

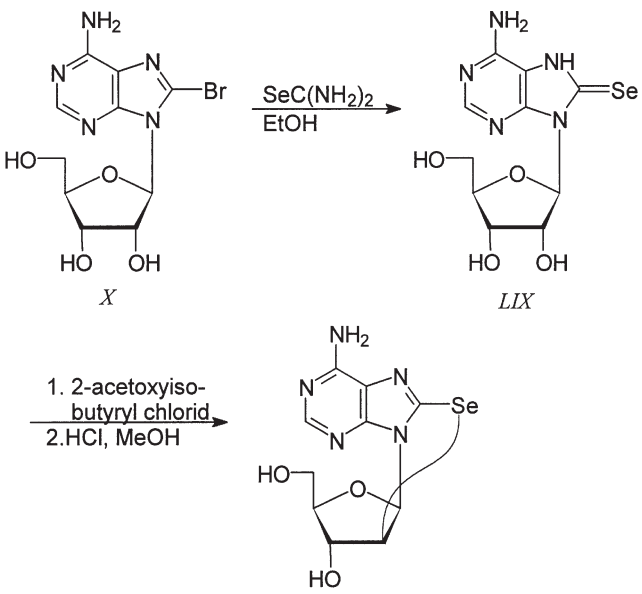
Použije-li se jako výchozí látka 2'-deoxyadenosin, lze připravit 8,3'-*S*-cykloderivát, který po desulfuraci poskytne 2',3'-dideoxyadenosin[28]. Reakce lze provádět i s adenosin-5'--monofosfátem[75].

Purinové *S*-cyklonukleosidy jsou stálé vůči mírné kyselé



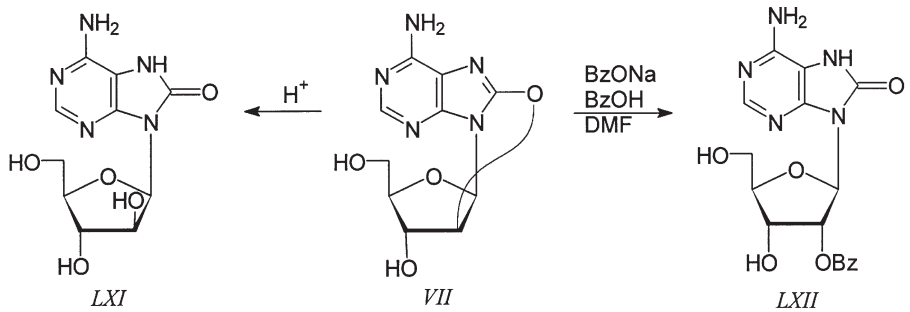
XXXV *LVII* *LVIII* *XXXVII*

Schéma 18



X *LIX* *LX*

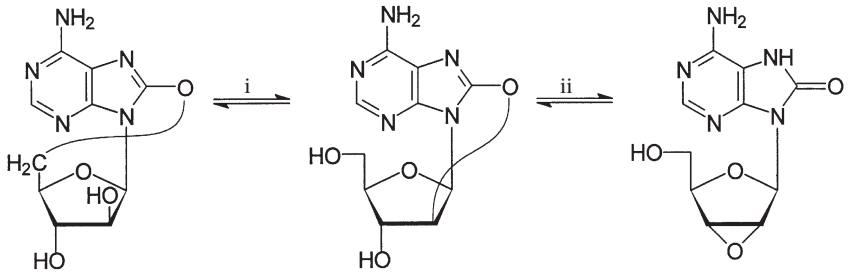
Schéma 19



LXI *VII* *LXII*

Schéma 20

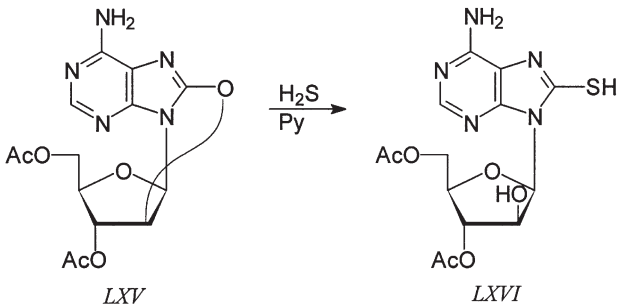
i bazické hydrolýze[65,96,101], kdežto silná kyselá nebo bazická hydrolýza vede ke štepení jak *S*-anhydro vazby, tak i glykosidické vazby, popř. i k destrukci purinového kruhu. Naproti tomu ke štěpení *O*-anhydro vazby purinových nukleosidů



LXIII *VII* *LXIV*

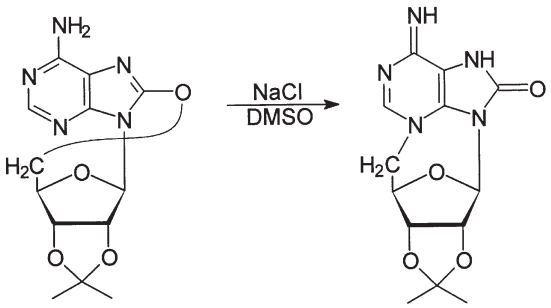
i 0,01 M vodný NaOH
ii 1,25 M vodný NaOH

Schéma 21



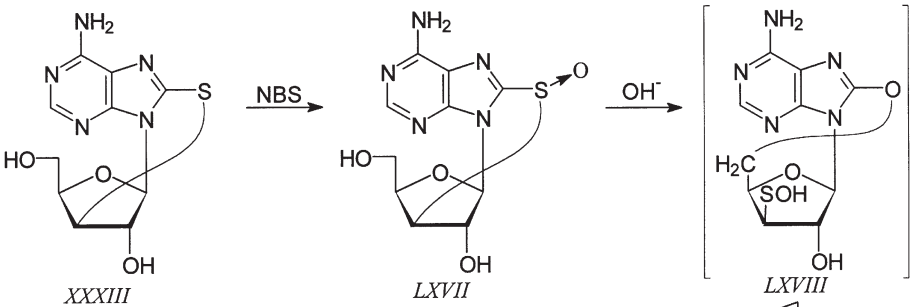
LXV *LXVI*

Schéma 22

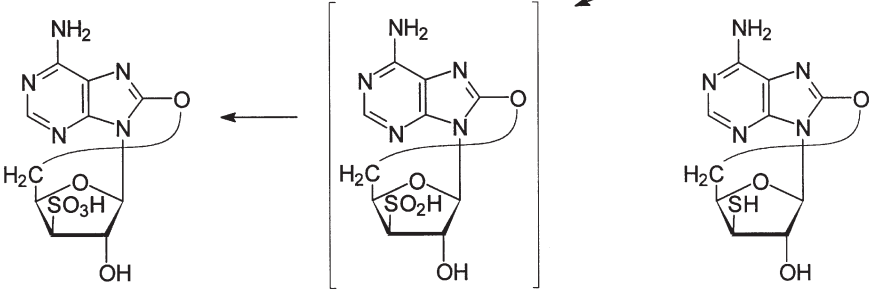


XVIII *LXXII*

Schéma 24



XXXIII *LXVII* *LXVIII*



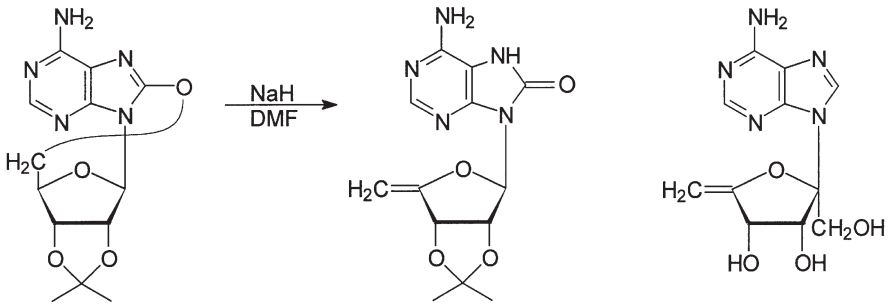
LXXI *LXX* *LXIX*

Schéma 23

dochází snadno za mírných podmínek[17,22,25,27]. Např. kyselá hydrolýza 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu (*VII*) poskytne 8-hydroxyderivát arabinofuranosyladeninu *LXI*, reakcí s benzoátem sodným v DMF se získá derivát 8-hydroxyadenosinu (*LXII*, schéma 20). Tedy kysele katalyzovaná reakce zachovává konfiguraci na C-2' uhlíku, atakem benzoátovým aniontem dochází k inverzi konfigurace.

V případě *S*- a *N*-cyklonukleosidů dochází při kyselé hydrolýze převážně ke štěpení *N*-glykosidické vazby, zatímco u *O*-cyklonukleosidů jsou štěpení *N*-glykosidické vazby a 5',8--anhydro vazby reakcemi konkurenčními[102].

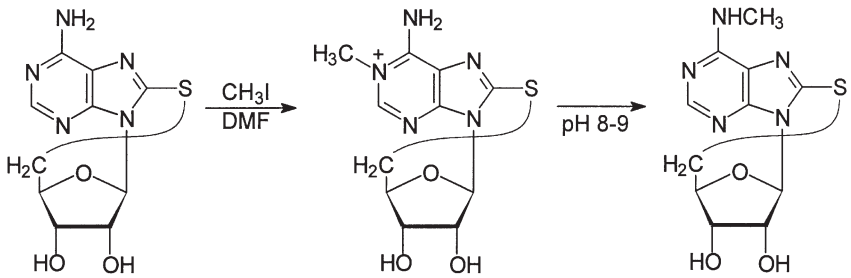
Zahříváním 8,2'- (*VII*) nebo 8,5'-anhydro-9-(β-D-arabino-



XVIII *LXXIII* *LXXIV*

Angustmycin A

Schéma 25



IL *LXXV* *LXXVI*

Schéma 26

furanosyl)-8-hydroxyadeninu (*LXIII*) ve vodném 0,01 M roztoku hydroxidu sodného dochází k vytvoření rovnovážné směsi obou, tj. směsi 8,2'- a 8,5'-cyklonukleosidů (*VII*:*LXIII*, 3:2, schéma 21) (cit.[103]). 8,2'-Cykloadenosin (*VII*) působením 1,25 M roztoku hydroxidu sodného ve směsi DMSO a voda poskytuje 2',3'-anhydroderivát *LXIV* (cit.[104]). Za mírně alkalických podmínek lze opět získat výchozí 8,2'-cykloadenosin (*VII*).

Při zahřívání ochráněného 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu *LXV* v pyridinu s přebytkem sirovodíku byl připraven 8-merkaptoderivát arabinofuranosyladeninu *LXVI* (schéma 22) (cit.[105]), při jeho zahřívání ve směsi pyridinu a kapalného amoniaku v autoklávu vzniká směs 8-amino-9-(β-D-arabinofuranosyl)adeninu a 8,5'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninu[106,107]. 8,2'- a 8,3'-*O*-Cyklonukleosidy adeninu mohou být tosylovány na 5'-hydroxylu a tyto tosylderiváty poskytnou zahříváním s hydrogensulfidem sodným v DMF příslušné 8,5'-*S*-cyklonukleosidy[108].

Je-li 8,2'-*O*-cykloadenosin zahříván s různými aminy popř. s hydrazinem, poskytne příslušné 8-amino, popř. 8-hydrazino deriváty 9-(β-D-arabinofuranosyl)adeninu[38,109].

Byla také popsána přeměna *S*- na *O*-cyklonukleosid, konkrétně 8,3'-anhydro-8-merkapto-9-(β-D-xylofuranosyl)adeninu (*XXXIII*) na 8,5'-*O*-cyklonukleosidy *LXIX* a *LXXI* přes sulfoxidový meziprodukt *LXVII* (schéma 23) (cit.[110]). Oxidace cyklonukleosidů na cyklické 8-sulfoxidy se provádí *N*-bromsukcinimidem nebo kyselinou peroxymravenčí[111]. Štěpení *S*-anhydro vazby cyklonukleosidu může také probíhat přes sulfoniový meziprodukt[112].

Při zahřívání ochráněného 8,5'-*O*-cykloadenosinu *XVIII* s chloridem sodným v DMSO na 130–140 °C pod dusíkem dojde k přesmyku na N^3,5'-cyklonukleosid *LXXII* (schéma 24) (cit.[85]).

Reakce 8,5'-anhydro-8-hydroxy-9-(2,3-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)adeninu (*XVIII*) s přebytkem hydridu sodného v DMF poskytne sloučeninu *LXXIII* (schéma 25), která obsahuje exocyklickou dvojnou vazbou[22]. Tato sloučenina se strukturně podobá antibiotiku angustmycinu A (decoyinin, *LXXIV*) (cit.[113,114]).

Podobně jako byly při tvorbě internukleotidové vazby použity pyrimidinové cyklonukleosidy[115-119], bylo v roce 1968 popsáno využití derivátu 8,5'-cyklonukleosidu k přípravě dinukleosidfosfátu[46]. Dochází k ataku nukleosidfosfátového aniontu na uhlík C-5' cyklonukleosidu. Tak byl za refluxu 2',3'-*O*-isopropylidenderivátu 8,5'-*O*-cycloadenosinu s tri-n-butylammonium-3'-uridylátem v DMF připraven uridyl-(3'-5')-8-hydroxy-2',3'-*O*-isopropylidenadenosin.

Metoda pro fosforylaci přirozených ribonukleosidů, vyvinutá v roce 1969 Yoshikawou[120], byla využita k syntéze 5'-mono a 5'-difosfátů 8,2'-*S*-cyklonukleosidů použitých pro enzymové studie[121]. Chemickou fosforylací byly dále připraveny 5'-monofosfáty 8,2'- a 8,3'-*O*-cyklonukleosidů, taktéž použité ke studiu substrátové specifity některých enzymů[122,123].

6. Transformace purinové báze v cyklonukleosidech

Reakcí 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxy-6-merkaptopurinu s methyljodidem lze připravit příslušný cyklonukleosid 6-methylmerkaptopurinu a ten desulfurací Raneyovým niklem převést na cyklonukleosid purinu[59].

Cykloinosiny a jejich deriváty mohou být kromě přímé cyklizace připraveny také deaminací příslušných cykloadenosinů kyselinou dusitou v 80 % kyselině octové při 40 °C

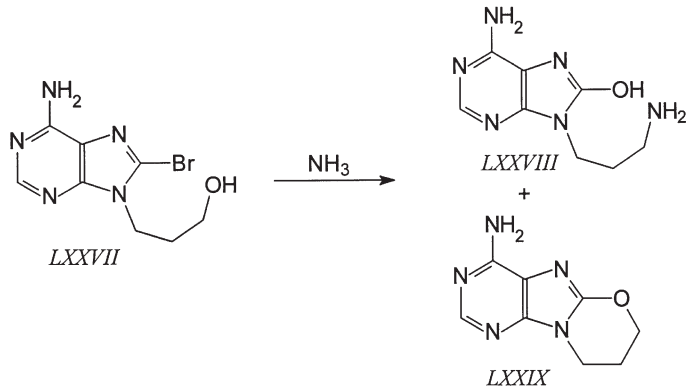


Schéma 27

(cit.[46,59]). Podobně byly deaminací 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-merkaptoadeninu, 8,3'-anhydro-8-merkapto-9-(β-D-xylofuranosyl)adeninu a 8,5'-anhydro-8-merkapto--9-(β-D-ribofuranosyl)adeninu s dusitanem barnatým v kyselině octové získány odpovídající *S*-cykloinosiny. Ty byly dále transformovány na příslušné 8-*S*-cyklonukleosidy 6-merkaptopurinribosidu pomocí sulfidu fosforečného v pyridinu[124], popř. na *S*-cyklonukleosidy odvozené od nebularinu [9-(β-D--ribofuranosyl)purinu] buď cestou zahrnující katalytickou redukci 6-chlorderivátů, nebo oxidativní desulfurací 6-thioderivátů[125].

K modifikaci cyklonukleosidů lze využít i Dimrothova přesmyku[126]. 8,5'-*S*-Cykloadenosin (*IL*) byl nejdříve methylován do polohy N^1 adeninu přebytkem methyljodidu v DMF za laboratorní teploty a získaný methylderivát *LXXV* za podmínek Dimrothova přesmyku (vodný roztok o pH 8–9) poskytl N^6-methylderivát 8,5'-*S*-cykloadenosinu *LXXVI* (schéma 26) (cit.[101]).

Oxidací 8,2'-, 8,3'- a 8,5'-*S*-cykloadenosinu kyselinou monoperoxyftalovou byly připraveny příslušné N^1-oxidy cykloadenosinu[127].

7. Fyzikální vlastnosti purinových cyklonukleosidů

Byly studovány chiroptické vlastnosti cyklonukleosidů[128-130]. U β-cyklonukleosidů odvozených od adeninu vzrůstá hodnota rotační síly v řadě 8,2'- < 8,3'- < 8,5'- jak u *O*-cyklonukleosidů, tak i u jejich *S*-analogů[131]. Všechny tyto látky vykazují v absorpčním maximu pozitivní Cottonův efekt. U α-cyklonukleosidů platí totéž, pokud jde o hodnoty rotační síly, ale Cottonův efekt je negativní.

8,5'-Anhydro-9-(2,3-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)--8-merkaptoadenin (*XLVIII*) byl krystalován ze směsi butanol–voda a poskytl bezbarvé jehlicovité krystaly, hexagonální, patřící do $P6_3$ prostorové grupy[132]. Atom síry je lokalizován na protilehlé straně atomu kyslíku furanosy (na straně 2'- a 3'-vodíkových atomů). Tento *S*-cykloadenosin má také fixovánu *anti* konformaci a torzní úhel cukr – báze je kolem 60°.

Hmotová spektra purinových 8-cyklonukleosidů jsou charakteristická nejen přítomností intenzivního píku molekulového iontu, ale také píků odpovídajících 8-hydroxy- popř. 8-merkaptoadeninu a jejich protonovaných forem[133].

8. Acyklické analogy purinových cyklonukleosidů a cyklonukleotidů

Analogy nukleosidů, které mají cukerný zbytek nahrazen řetězcem nesoucím hydroxylové funkce, tzv. acyklické analogy nukleosidů, přitahují velký zájem proto, že se v této skupině vyskytují sloučeniny s vysokým biologickým účinkem, např. virostatika acyclovir (Zovirax)[134,135] nebo ganciclovir (Cytovene)[136]. Pro svůj protivirový účinek i další efekty na proliferujících systémech byl studován další ze skupiny acyklických analogů, 9-(*S*)-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (DHPA) (cit.[137]).

Většina nukleofilních reakcí v imidazolovém kruhu adeninové báze substituované bromem v poloze C-8 provedených u derivátů s blokovanými hydroxylovými funkcemi probíhá stejně jako u nukleosidů, tj. se vznikem sloučenin substituovaných v poloze C-8 příslušným nukleofilem. Tak probíhají i reakce s amoniakem za vzniku 8-aminoderivátu. Ukázalo se však, že u látek s volnými hydroxyskupinami má tato reakce anomální průběh. Reakce s amoniakem nebo primárním aminem probíhá za vzniku 8-hydroxyadeninového derivátu nesoucího amino (popř. substituovanou amino) skupinu na postranním řetězci[138,139]. Tato reakce je spojena se vznikem acyklického analogu nukleosidu, který se otevře nukleofilním atakem ze strany acyklického řetězce a poskytne 8-hydroxyderivát s nukleofilní skupinou na postranním řetězci. Tak byla např. amonolýzou 9-(3-hydroxypropyl)-8-bromadeninu (*LXXVII*) získána směs 8-hydroxyderivátu *LXXVIII* a cyklického derivátu *LXXIX* (schéma 27) (cit.[139]).

Jako model pro intramolekulární cyklizace acyklických analogů cyklonukleosidů byla zvolena skupina 9-(2,3,4-trihydroxybutyl)derivátů 8-bromadeninu *LXXXI* (schéma 28), specificky blokovaných v polohách 2 a 3 postranního řetězce tvorbou 1,3-dioxolanu (isopropylidenderivátu). K cyklizacím byla použita různá činidla, jako vodný amoniak, *terc*-butoxid draselný, hydrid sodný a 1,8-diazabicyklo(5,4,0)undec-7-en (DBU) (cit.[140]). Podobně jako u nukleosidů lze také přímo cyklizovat 9-(2,3,4-trihydroxybutyl)adeniny *LXXX* pomocí octanu olovičitého v benzenu nebo toluenu[50]. Byly studovány chiroptické vlastnosti všech čtyř opticky aktivních stereoizomerů *LXXXII*.

Pro své farmakochemické účinky byla studována skupina acyklických analogů *S*-cyklonukleosidů, kde atom síry je do polohy 8 purinové baze vázán přes alkylový můstek[141].

Bylo připraveno množství derivátů, u nichž je N^9-poloha (popř. N^7) purinové báze spojena s atomem kyslíku, síry nebo

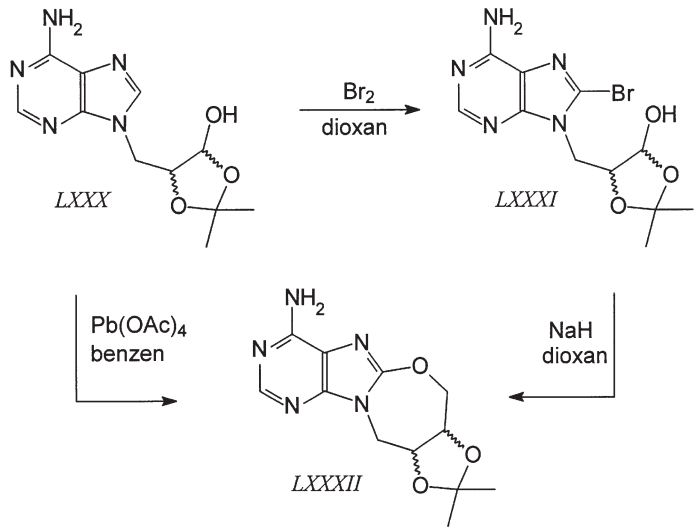


Schéma 28

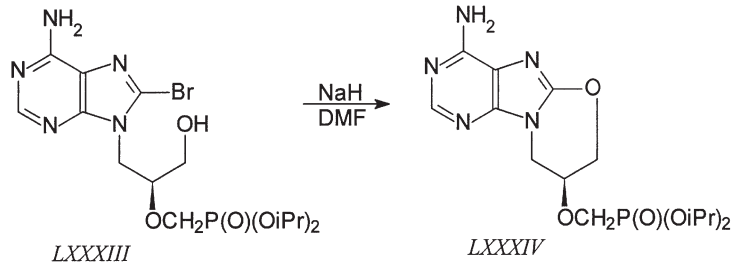


Schéma 29

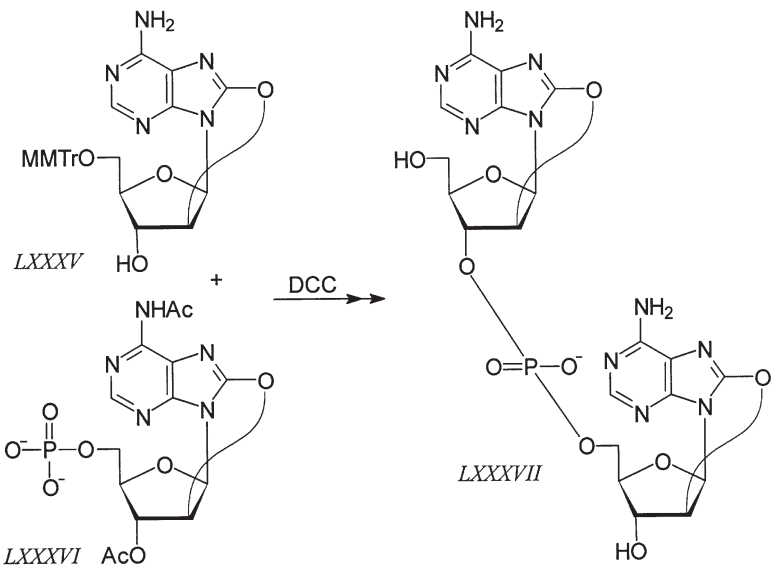


Schéma 30

i dusíku v poloze C-8 spojena alkylem, který nenese žádnou hydroxyskupinu[142-146,8]. Takové sloučeniny však již nelze považovat za analogy nukleosidů v pravém slova smyslu, neboť i případná jediná hydroxyskupina v řadě *O*-cyklických látek je vázána anhydro vazbou.

Bylo připraveno mnoho acyklických analogů nukleotidů. Dvě výrazné skupiny látek byly detailně studovány pro své antivirové *in vitro* a *in vivo* účinky: *N*-(2-fosfonomethoxyethyl) (PME) a (*S*)-*N*-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl) (HPMP) deriváty heterocyklických bází[147,148]. Z diisopropylesteru (*S*)-8-brom-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adeninu *LXXXIII* byl reakcí s hydridem sodným v DMF připraven příslušný cyklický HPMPA derivát *LXXXIV* (schéma 29) (cit.[149]).

9. Polynukleotidy obsahující purinové cyklonukleosidy

Podle úmluvy se polynukleotidové sekvence kreslí svým 5'-koncem vlevo, 3'-koncem vpravo. Triplet adenylyl-3',5'-uridylyl-3',5'-guanosin může být zkráceně zapsán jako ApUpG (nebo jen AUG) (cit.[150]). Strategie chemické syntézy oligonukleotidů je podobná syntéze polypeptidů. Vhodně chráněný nukleotid je připojen k rostoucímu konci oligonukleotidového řetězce, odstraní se chránící skupina a děj se opakuje.

Tak například dinukleosidmonofosfát *O*-cykloadenosinu, 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadeninfosforyl-(3',5')-8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin (*LXXXVII*, zkráceně $A^{O}pA^{O}$, horní index O značí, že se jedná o *O*-cyklonukleosid), byl připraven z 5'-monomethoxytritylderivátu 8,2'-*O*-cykloadenosinu *LXXXV* a vhodně ochráněného 8,2'-anhydro-9-(β-D-arabinofuranosyl)-8-hydroxyadenin-5'-fosfátu *LXXXVI* za použití *N*,*N*'-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) jako kondenzačního činidla (schéma 30) (cit.[151]).

Byla připravena a studována řada dalších dinukleosidfosfátů obsahujících 8,2'-*O*-cykloadenosin[152], 8,2'-*S*-cykloadenosin[153,154] (jeho desulfurací Ra-Ni lze připravit dinukleosidfosfát odvozený od 2'-deoxyadenosinu[155]), dinukleosidfosfáty $A^{S}pU^{O}$ a $U^{O}pA^{S}$ (horní index S značí, že se jedná o *S*-cyklonukleosid)[156], dinukleosidfosfáty obsahující 8,2'-*S*-cykloadenosin a 8,2'-*S*-cykloinosin[157] a mnoho dalších[158] a byly studovány jejich chemické a fyzikální vlastnosti[159].

Syntetizována byla dále řada trinukleotidů a dalších oligo- a polynukleotidů[160,169] obsahujících cyklonukleosidy a bylo studováno jejich tvoření komplexů s různými polynukleotidy[161-164].

Již bylo zmíněno, že konformace molekuly v purinových cyklonukleosidech je do značné míry fixována. Totéž platí o cyklonukleosidech tvořících součást oligonukleotidového řetězce. To umožňuje studovat vztah mezi konformací a biologickou funkcí. Např. byly připraveny analogy tripletu AUG, který je rozeznáván jako iniciační nebo vnitřní kodon aminokyseliny methioninu při proteosyntéze[165], kde adenosin byl nahrazen 8,2'-*O*-cykloadenosinem[166], 8,5'-*O*-cykloadenosinem[167], 8,2'-*S*-cykloadenosinem, 8,5'-*S*-cykloadenosinem (popř. formycinem a dalšími nukleosidy s modifikovanou adeninovou bází[168]). Tyto analogy se liší torzními úhly modifikovaných adeninových bází kolem glykosidické vazby, čehož bylo využito při studiu simulace vazby Met-tRNA k ribosomu[169].

LITERATURA

1. Doskočil J., Holý A.: Collect. Czech. Chem. Commun. *42*, 370 (1977).
2. Bloch A., Mihich E., Nichol C. A., Robins R. K., Whistler R. H.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. *7*, 7 (1966).
3. Rapoport H.: Science *151*, 860 (1966).
4. Scheuer P. J.: Acc. Chem. Res. *10*, 33 (1977).
5. Shewach D. S., Chern J.-W., Pillote K. E., Townsend L. B., Daddona P. E.: Cancer Research *46*, 519 (1986).
6. Sircar J. C., Kostlan C. R., Pinter G. W., Suto M. J., Bobovski T. P., Capiris T., Schwender C. F., Dong M. K., Scott M. E., Bennett M. K.: Agents Action *21*, 253 (1987).
7. Bonnet P. A., Robins R. K.: J. Med. Chem. *36*, 635 (1993).
8. Reitz A. B., Goodman M. G., Pope A. L., Argentieri D. C., Bell S. C., Burr L. E., Chourmouzis E., Come J., Goodman J. H., Klaubert D. H., Maryanoff B. E., McDonell M. E., Rampulla M. S., Schott M. R., Chen R.: J. Med. Chem. *37*, 3561 (1994).
9. Clark V. M., Todd A. R., Zussman J.: J. Chem. Soc. *1951*, 2952.
10. Kaneko M., Shimizu B.: Tetrahedron Lett. *33*, 3113 (1971).
11. Ogilvie K. K., Slotin L. A., Westmore J. B., Lin D. C. K.: J. Heterocycl. Chem. *9*, 1179 (1972).
12. Sasaki T., Minamoto K., Itoh H.: J. Org. Chem. *43*, 2320 (1978).
13. Sasaki T., Minamoto K., Itoh H.: Tetrahedron *36*, 3509 (1980).
14. Belmont P., Alarcon K., Demeunynck M., Lhomme J.: Bioorg. Med. Chem. Lett. *9*, 233 (1999).
15. Minamoto K., Fujiki Y., Shiomi N., Uda Y., Sasaki T.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. I *1985*, 2337.
16. Harper P. J., Hampton A.: J. Org. Chem. *37*, 795 (1972).
17. Duong K. N. V., Gaudemer A., Johnson M. D., Quillivic R., Zylber J.: Tetrahedron Lett. *1975*, 2997.
18. Matsuda A.: Nucleic Acid Res., Special Issue *2*, s13 (1976).
19. Matsuda A., Tezuka M., Ueda T.: Tetrahedron *34*, 2449 (1978).
20. Gani D., Johnson A. W.: J. Chem. Soc., Perk. Trans. 1 *1982*, 1197.
21. Romieu A., Gasparutto D., Cadet J.: Chem. Res. Toxicol. *12*, 412 (1999).
22. Ikehara M.: Acc. Chem. Res. *2*, 47 (1969).
23. Ikehara M., Tada H., Muneyama K., Kaneko M.: J. Am. Chem. Soc. *88*, 3165 (1966).
24. Holmes R. E., Robins R. K.: J. Am. Chem. Soc. *86*, 1242 (1964).
25. Ikehara M., Tada H., Muneyama K.: Chem. Pharm. Bull. *13*, 1140 (1965).
26. Ikehara M., Tada H., Kaneko M.: Tetrahedron *24*, 3489 (1968).
27. Ikehara M., Muneyama K.: Chem. Pharm. Bull. *13*, 639 (1965).
28. .Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. *18*, 2441 (1970).
29. Ikehara M., Uesugi S., Kaneko M.: Chem. Commun. *1968*, 7.
30. Ikehara M., Kaneko M.: Tetrahedron *26*, 4251 (1970).
31. Brentnall H. J., Hutchinsosn D. W.: Tetrahedron Lett. *25*, 2595 (1972).
32. Ikehara M., Ogiso Y., Maruyama T.: Chem. Pharm. Bull. *25*, 575 (1977).
33. Ryu E. K., MacCoss M.: J. Org. Chem. *46*, 2819 (1981).
34. Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 1261 (1967).
35. Ikehara M., Kaneko M.: Chem. Pharm. Bull. *18*, 2401 (1970).
36. Ikehara M., Morisawa H.: Chem. Pharm. Bull. *19*, 2593 (1971).
37. Mian A. M., Harris R., Sidwell R. W., Robins R. K., Khwaja T. A.: J. Med. Chem. *17*, 259 (1974).
38. Kaneko M., Kimura M., Nishimura T., Shimizu B.: Chem. Pharm. Bull. *25*, 2482 (1977).
39. Ogilvie K. K., Slotin L.: J. Org. Chem. *36*, 2556 (1971).
40. Ikehara M., Tezuka S.: Tetrahedron Lett. *12*, 1169 (1972).
41. Ikehara M., Maruyama T.: Tetrahedron *31*, 1369 (1975).
42. Ikehara M., Miki H., Hasegawa A.: Chem. Pharm. Bull. *27*, 2647 (1979).

43. Reist E. J., Calkins D. F., Fisher L. V., Goodman L.: J. Org. Chem. *33*, 1600 (1968).
44. Ikehara M., Muneyama K.: J. Org. Chem. *32*, 3039 (1967).
45. Ikehara M., Kaneko M.: J. Am. Chem. Soc. *90*, 497 (1968).
46. Nagpal K. L., Dhar M. M.: Tetrahedron Lett. *1*, 47 (1968).
47. Naka T., Honjo M.: Chem. Pharm. Bull. *24*, 2052 (1976).
48. Srivastava P. C., Nagpal K. L., Dhar M. M.: Indian J. Chem. *7*, 1 (1969).
49. Ikehara M., Kaneko M., Okano R.: Tetrahedron *26*, 5675 (1970).
50. Kitade Y., Makino T., Hirota K., Maki Y.: Nucleosides Nucleotides *11*, 365 (1992).
51. Kameyama K., Sako M., Hirota K., Maki Y.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. *1984*, 1658.
52. Kitade Y., Nakanishi R., Sako M., Hirota K., Maki Y.: Chem. Pharm. Bull. *39*, 1902 (1991).
53. Maki Y., Sako M., Saito T., Hirota K.: Heterocycles *27*, 347 (1988).
54. Sako M., Shimada K., Hirota K., Maki Y.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. *1986*, 1704.
55. Sako M., Makino T., Kitade Y., Hirota K., Maki Y.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 *1992*, 1801.
56. Ikehara M., Kaneko M., Nakahara Y.: Tetrahedron Lett. *45*, 4707 (1968).
57. Ikehara M., Nakahara Y., Yamada S.: Chem. Pharm. Bull. *19*, 538 (1971).
58. Zavgorodny S. G.: Tetrahedron Lett. *31*, 3003 (1981).
59. Ikehara M., Muraoka M.: Chem. Pharm. Bull. *24*, 672 (1976).
60. Ueda T., Nomoto Y., Matsuda A.: Chem. Pharm. Bull. *33*, 3263 (1985).
61. Urata H., Miyagoshi H., Yumoto T., Akagi M.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 *1999*, 1833.
62. Zou R., Drach J. C., Townsend L. B.: J. Med. Chem. *40*, 811 (1997).
63. Ikehara M., Tada H.: J. Am. Chem. Soc. *85*, 2344 (1963).
64. Davoll J., Lowy B. A.: J. Am. Chem Soc. *73*, 1650 (1951).
65. Ikehara M., Tada H.: J. Am. Chem. Soc. *87*, 606 (1965).
66. Ikehara M., Tada H.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 94 (1967).
67. Ikehara M., Maruyama T., Miki H.: J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides *4*, 409 (1977).
68. Ikehara M., Kaneko M.: Tetrahedron *26*, 4251 (1970).
69. Ogilvie K. K., Slotin L.: J. Chem. Soc. D. *16*, 890 (1971).
70. Sowa T., Tsunoda K., Iizuka K., Sako K.: Ger. Offen. 2, 351, 555; Chem. Abstr. *81*, 25909 (1974).
71. Kaneko M., Kimura M., Shimizu B.: Chem. Pharm. Bull. *20*, 635 (1972).
72. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: Can. J. Chem. *50*, 2253 (1972).
73. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: J. Heterocyclic Chem. *9*, 1179 (1972).
74. Rokos H., Hakspiel B., Harzer G.: Nucleic Acid Res., Special Issue *1*, s13 (1975).
75. Ikehara M., Uesugi S.: Tetrahedron Lett. *10*, 713 (1970).
76. Ikehara M., Uesugi S.: Tetrahedron *28*, 3687 (1972).
77. Ikehara M., Muneyama K.: J. Org. Chem. *32*, 3042 (1967).
78. Ogilvie K. K., Slotin L., Westmore J. B., Lin D.: Can. J. Chem. *50*, 1100 (1972).
79. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M.: Chem. Pharm. Bull. *16*, 1151 (1968).
80. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M.: Tetrahedron *26*, 5757 (1970).
81. Nagpal K. L., Srivastava P. C., Dhar M. M.: Indian J. Chem. *9*, 183 (1971).
82. Mizuno Y., Kaneko Ch., Oikawa Y., Ikeda T., Itoh T.: J. Am. Chem. Soc. *94*, 4737 (1972).
83. Mizuno Y., Kaneko Ch., Oikawa Y.: J. Org. Chem. *39*, 1440 (1974).
84. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G.: J. Am. Chem. Soc. *86*, 2093 (1964).
85. Ikehara M., Tanaka S.: Tetrahedron Lett. *6*, 497 (1974).
86. Mitsunobu O.: Synthesis *1981*, 1.
87. Chern J.-W., Kuo Ch.-Ch., Chang M.-J., Liu L.-T.: Nucleosides Nucleotides *12*, 941 (1993)
88. Bittner S., Assaf Y., Krief P., Pomerantz M., Ziemnicka B. T., Smith C. G.: J. Org. Chem. *50*, 1712 (1985).
89. Tenenaka K., Tsuji T., Muraoka M.: Nucleosides Nucleotides *17*, 869 (1998).
90. Wise D. S., Townsend L. B.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. *24*, 271 (1979).
91. Engels J., Jäger A.: Arch. Pharm. (Weinheim Ger.) *4*, 368 (1982).
92. Wise D. S., Milne G. H., Townsend L. B.: Heterocycles *15*, 345 (1981).
93. Ikehara M., Tada H.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 94 (1967).
94. Ikehara M., Tada H., Nomura A.: Nature *202*, 900 (1964).
95. Ikehara M., Tada H., v knize: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., ed.), sv. I, str. 188. Wiley, New York 1968.
96. Ikehara M., Yano J.: Nucleic Acids Res. *1*, 1783 (1974).
97. Todd A. R., Ulbricht T. L. V.: J. Chem. Soc. *1960*, 3275.
98. Lee W. W., Benitez A., Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R.: J. Am. Chem. Soc. *83*, 1906 (1961).
99. Walton E., Nutt R. F., Jenkins S. R., Holley F. W.: J. Am. Chem. Soc. *86*, 2952 (1964).
100. Murray D. H., Prokop J., v knize: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* (Zorbach W. W., Tipson R. S., ed.), sv. I, str. 193. Wiley, New York 1968.
101. Ikehara M., Matsuda Y.: Chem. Pharm. Bull. *22*, 1313 (1974).
102. Karpeisky A., Zavgorodny S., Hotokka M., Oivanen M., Lönnberg H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 *1994*, 741.
103. Ikehara M., Kaneko M., Ogiso Y.: Tetrahedron Lett. *53*, 4673 (1970).
104. Chattopadhyaya J. B., Reese C. B.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. *21*, 860 (1976).
105. Ikehara M., Maruyama T., Miki H.: Tetrahedron *34*, 1133 (1978).
106. Ikehara M., Ogiso Y.: Tetrahedron *28*, 3695 (1972).
107. Kaneko M., Kimura M., Shimizu B., Yano J., Ikehara M.: Chem. Pharm. Bull. *25*, 1892 (1977).
108. Ikehara M., Ogiso Y.: Chem. Pharm. Bull. *23*, 1114 (1975).
109. Chattopadhyaya J. B., Reese C. B.: Nucleic Acids Res., Spec. Issue *4*, s67 (1978).
110. Ikehara M., Ogiso Y., Matsuda Y., Morii T.: Tetrahedron Lett. *31*, 2965 (1971).
111. Ikehara M., Ogiso Y., Morii T.: Tetrahedron *32*, 43 (1976).
112. Ikehara M., Ogiso Y.: J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides *2*, 121 (1975).
113. Yüntsen H., Yonehara H., Ui H.: J. Antibiotics *7*, 113 (1954).

114. Hoeksema H., Slomp G. S., van Tamelen E. E.: Tetrahedron Lett. *27*, 1787 (1964).
115. Žemlička J., Smrt J.: Tetrahedron Lett. *31*, 2081 (1964).
116. Nagyvary J., Roth J. S.: Tetrahedron Lett. *11*, 617 (1965).
117. Agarwal K. L., Dhar M. M.: Tetrahedron Lett. *1965*, 2541.
118. Mizuno Y., Sasaki T., Kanai T., Igarashi H.: J. Org. Chem. *30*, 1533 (1965).
119. Mizuno Y., Sasaki T.: Tetrahedron Lett. *50*, 4579 (1965).
120. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T.: Bull. Chem. Soc. Jpn. *42*, 3505 (1969).
121. Ogilvie K. K., Slotin L. A.: Can. J. Chem. *51*, 2397 (1973).
122. Hampton A., Sasaki T.: Biochemistry *12*, 2188 (1973).
123. Khwaja T. A., Boswell K. H., Robins R. K., Miller J. P.: Biochemistry *14*, 4238 (1975).
124. Ikehara M., Muraoka M.: Chem. Pharm. Bull. *20*, 550 (1972).
125. Ikehara M., Muraoka M.: J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides *4*, 1 (1977).
126. Fujii T., Itaya T.: Heterocycles *48*, 359 (1998).
127. Ikehara M., Ogiso Y.: Chem. Pharm. Bull. *23*, 2534 (1975).
128. Ikehara M., Kaneko M., Muneyama K., Tanaka H.: Tetrahedron Lett. *1967*, 3977.
129. Elder D. L., Bunnenberg E., Djerassi C., Ikehara M., Voelter W.: Tetrahedron Lett. *10*, 727 (1970).
130. Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K.: Biochemistry *11*, 830 (1972).
131. Ikehara M., Kaneko M., Nakahara Y., Yamada S., Uesugi S.: Chem. Pharm. Bull. *19*, 1381 (1971).
132. Tomita K., Nishida T., Fujiwara T., Ikehara M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *41*, 1043 (1970).
133. Ikeda M., Tamura Y., Ikehara M.: J. Heterocyclic Chem. *7*, 1377 (1970).
134. Schaeffer H. J., Beauchamp L., De Miranda P., Elion G. B., Bauer D. J., Collins P.: Nature *272*, 583 (1978).
135. Chu Ch. K., Cutler S. J.: J. Heterocycl. Chem. *23*, 289 (1986).
136. Martin J. C., Dvorak Ch. A., Smee D. F., Matthews T. K., Verheyden J. P. H.: J. Med. Chem. *26*, 759 (1983).
137. De Clercq E., Descamps J., De Somer P.: Science *200*, 563 (1978).
138. Holý A.: Collect. Czech. Chem. Commun. *48*, 1910 (1983).
139. Holý A., Kohoutová J., Merta A., Votruba I.: Collect. Czech. Chem. Commun. *51*, 459 (1986).
140. Janeba Z., Holý A., Votavová H., Masojídková M.: Collect. Czech. Chem. Commun. *61*, 442 (1996).
141. Hideg K., Hankovszky O., Palosi E., Hajos G., Szporny L.: Ger. Offen. 2 429 290; Chem. Abstr. *82*, 156 307 (1975).
142. Balsiger R. W., Fikes A. L., Johnston T. P., Montgomery J. A. : J. Org. Chem. *26*, 3446 (1961).
143. Uno H., Irie A., Hino K.: Chem. Pharm. Bull. *21*, 34 (1973).
144. Hino K., Irie A., Uno H.: Chem. Pharm. Bull. *23*, 1696 (1975).
145. Maruyama T., Sato Y., Horii T., Shiota H., Nitta K., Shirasaka T., Mitsuya H., Honjo M.: Chem. Pharm. Bull. *38*, 2719 (1990).
146. Madre M., Geita L., Zhuk R., Koomen G.-J.: Chin. Pharm. J. *47*, 469 (1995).
147. De Clercq E., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A.: Antiviral Res. *8*, 261 (1987).
148. Balzarini J., Naesens L., Herdewijn P., Rosenberg I., Holý A., Pauwels R., Baba M., Johns D. G., De Clercq E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *86*, 332 (1989).
149. Janeba Z., Holý A.: *XXII. Conference of Organic Chemists on Advances in Organic Chemistry, Častá – Papiernička 1997*.
150. IUPAC–IUB combined commission: J. Biol. Chem. *241*, 531 (1966).
151. Ikehara M., Uesugi S., Yano J.: J. Am. Chem. Soc. *96*, 4966 (1974).
152. Ikehara M., Uesugi S., Yano J.: Nature, New Biol. *240*, 16 (1972).
153. Ikehara M., Uesugi S., Yasumoto M.: J. Am. Chem. Soc. *92*, 4735 (1970).
154. Ikehara M., Tezuka T.: Nucleic Acids Res. *2*, 1539 (1975).
155. Uesugi S., Yasumoto M., Ikehara M., Fang K. N., Ts'o P. O. P.: J. Am. Chem. Soc. *94*, 5480 (1972).
156. Ikehara M., Uesugi S., Shida T.: Chem. Pharm. Bull. *28*, 189 (1980).
157. Uesugi S., Shida T., Ikehara M.: Chem. Pharm. Bull. *28*, 3621 (1980).
158. Uesugi S., Yano J., Yano E., Ikehara M.: J. Am. Chem. Soc. *99*, 2313 (1977).
159. Dhingra M. M., Sarma R. H., Uesugi S., Ikehara M.: J. Am. Chem. Soc. *100*, 4669 (1978).
160. Ikehara M., Uesugi S.: J. Am. Chem. Soc. *94*, 9189 (1972).
161. Ikehara M., Tezuka T.: J. Am. Chem. Soc. *95*, 4055 (1973).
162. Ikehara M., Tezuka T.: Nucleic Acids Res. *1*, 479 (1974).
163. Ikehara M., Tezuka T.: Nucleic Acids Res. *1*, 907 (1974).
164. Uesugi S., Tezuka T., Ikehara M.: J. Am. Chem. Soc. *98*, 969 (1976).
165. Lucas-Lenard J., Lipman F.: Ann. Rev. Biochem. *40*, 409 (1971).
166. Ikehara M., Nagura T., Ohtsuka E.: Chem. Pharm. Bull. *22*, 2578 (1974).
167. Ikehara M., Nagura T., Ohtsuka E.: Chem. Pharm. Bull. *22*, 123 (1974).
168. Uesugi S., Nagura T., Ohtsuka E., Ikehara M.: Chem. Pharm. Bull. *24*, 1884 (1976).
169. Ohtsuka E., Nagura T., Shimokawa K., Nishikawa S., Ikehara M.: Biochim. Biophys. Acta *383*, 236 (1975).

Z. Janeba *(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):*
Purine 8-*O*- and 8-*S*-cyclonucleosides – Synthesis and Properties

8-Cyclonucleosides derived from purine bases can be prepared by a number of reactions starting from appropriately modified nucleosides or their 8-substituted (most frequently bromo, hydroxy and sulfanyl) derivatives. The 8-cyclonucleosides are compounds suitable for studying configurations and conformations of purine nucleosides, also useful as intermediates in the synthesis of many biologically interesting compounds. Although the interest in 8-cyclonucleosides culminated in the sixties and seventies, many papers return to them at present and utilize them in various syntheses.

KOLAGEN – VLASTNOSTI, MODIFIKACE A APLIKACE

PETRA PETERKOVÁ[a] a LUBOMÍR LAPČÍK, Jr.[b]

[a]Ústav fyzikální a spotřební chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, e-mail: peterkova@fch.vutbr.cz, [b]Ústav fyziky a materiálového inženýrství, Fakulta technologická, Vysoké učení technické v Brně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín, e-mail: lapcik@zlin.vutbr.cz

Došlo dne 10.VI.1999

Klíčová slova: kolagen, vlastnosti, modifikace, využití

Obsah

1. Úvod
2. Makromolekulární charakter
   2.1. Struktura a složení
   2.2. Biosyntéza
   2.3. Nebílkovinné komponenty
   2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti
      2.4.1. Polyelektrolytický charakter
      2.4.2. Botnání
      2.4.3. Denaturace a renaturace
      2.4.4. Hydrotermální stabilita
      2.4.5. Hydratace kolagenu
      2.4.6. Přeměna na želatinu
   2.5. Roztok kolagenu
3. Degradace
   3.1. Hydrolytická degradace
   3.2. Enzymatická degradace
   3.3. Oxidační štěpení
4. Chemická modifikace
   4.1. Reakce s monofunkčními reagenty
      4.1.1. Acylace
      4.1.2. Esterifikace
      4.1.3. Deaminace
      4.1.4. Deguanidinace
   4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu
      4.2.1. Aldehydová kondenzace
      4.2.2. Oxidace jodistanem
   4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace
5. Biomedicínské aplikace

1. Úvod

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů s výjimkou jednobuněčných a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je hlavní složkou pojivových tkání, kterým zajišťuje správnou funkci, zejména v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi[1]. To je dáno jeho specifickou strukturou, charakteristickou vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen představuje 25–30 % všech bílkovin v těle. Tvoří hlavní organickou složku kůže, kostí, chrupavek, šlach a vaziva. Je rovněž významnou součástí cévních stěn, bazálních membrán a rohovek. Má opěrnou a ochrannou funkci a patří, zejména jako složka mezibuněčné hmoty, ke klíčovým proteinům životních pochodů ve zdravém i v nemocném organismu.

Kolagen je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Je proto snaha neustále zdokonalovat preparáty z něho vyráběné a hledat nové možnosti jejich zpracování a využití. Kromě toho, že je kolagen hlavní surovinou kožedělného průmyslu pro výrobu usní (ročně se zpracují asi 4 mil. tun kolagenu[2]), využívá se v řadě dalších oborů. Přehled využití je uveden v tabulce I. Četné aplikace vyplývají z „fyziologické blízkosti“ nebo dokonce identitě aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem, resorbovatelnosti a schopnosti zadržovat vodu.

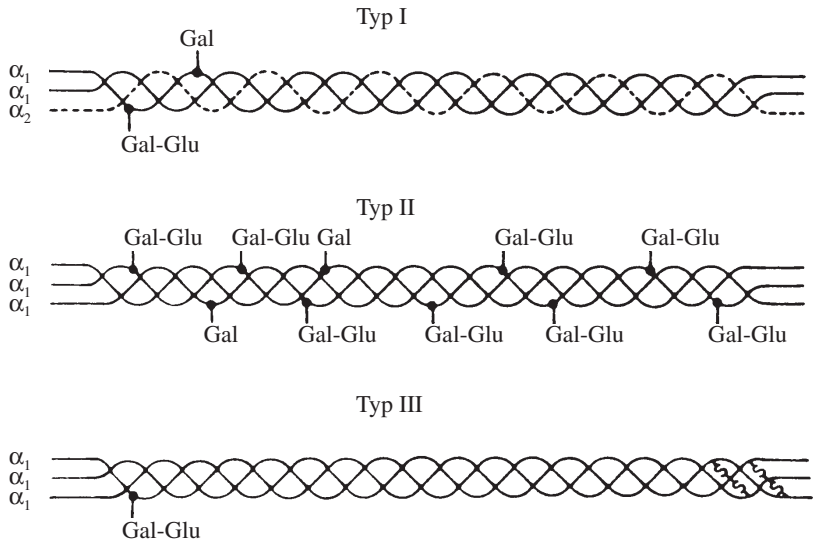
2. Makromolekulární charakter

2.1. Struktura a složení

Charakteristickou vlastností molekuly kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální (spirálovitá) struktura. Tři kolagenové polypeptidové makromolekuly, nazývané α-řetězce (z nichž každý obsahuje kolem 1000 aminokyselinových zbytků (AMK) a měří asi 280 nm), se společně stáčejí do pravidelné pravotočivé superšroubovice (obr. 1). Úplná otáčka trojité spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Superšroubovice tak tvoří kolagenovou molekulu s délkou asi 300 nm a průměrem 1,5 nm. α-Řetězce jsou spirálovitě stočeny ve směru od N-kon-

Tabulka I
Strukturní hierarchie kolagenu a přiřazené obory použití

Strukturní rovina	Obor použití / produkty
Pletivo vláken/plocha	výroba usní, krytí ran, náhrada pokožky (kožní implantáty), náhrada cév
Vlákna	střívka z kolagenových past, obalové fólie, membrány, hemostyptika, prášek na rány
Fibrily	biokompatibilní plastové nebo keramické materiály, kostní a čelistní chirurgie
Makromolekuly	nativní kolagen, atelokolagen, desamidokolagen pro kosmetiku a medicínu
Polypeptidy	želatina, klíh, hydrolyzáty kolagenu, expandéry plasmy, kapsule, želatinační prostředky, tensidy, emulgátory, zahušťovadla, krmiva, hnojiva



Obr. 1. **Schéma tří typů kolagenu**. Je patrné rozdílné zastoupení jednotlivých typů polypeptidových řetězců a různý stupeň glykosylace. Disulfidové síťování je naznačeno jen u typu III (převzato z cit.[20] s laskavým svolením Wiley & Sons, Inc., Copyright 1987)

cové skupiny k C-koncové skupině a jsou levotočivé. Molekuly jsou extrémně bohaté na glycin (26 až 28 %) a prolin (nad 15 %). Z prostorových důvodů leží glycinové zbytky uvnitř trojité spirály (jsou dostatečně malé pro obsazení vnitřního prostoru) a tím umožňují, aby se tři α-řetězce těsně semkly do konečného kolagenového superhelixu. Prolin, díky své kruhové struktuře, umožňuje vytvořit levotočivou konformaci každého α-řetězce, s třemi AMK zbytky na otáčku[3]. Přehled proteinogenních AMK shrnuje tabulka II.

Polypeptidový řetězec tvoří opakující se jednotky tripeptidů: $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, kde X a Y jsou jakékoliv AMK, zpravidla je jednou z nich prolin. Oblasti, tvořené AMK s nízkou molární hmotností, je možno považovat za krystalické, vysoce orientované úseky. Naopak oblasti s nashromážděnými výšemolekulárními polárními AMK (např. Asp, Glu, Lys, Arg) nemají přísně uspořádanou stavbu, jsou méně orientované až amorfní. Pro jejich konformační volnost a přítomnost polárních skupin je lze považovat za reaktivní místa kolagenové molekuly[4]. Toto rozložení polárních a nepolárních AMK má vztah k příčnému pruhování kolagenových fibril, pozorovanému elektronovým mikroskopem.

Tabulka II
Průměrné zastoupení aminokyselin v kolagenu z hovězích kůží[a]

Aminokyselina	Hodnota	Aminokyselina	Hodnota
Hydroxyprolin	116,0	Methionin	6,5
Kyselina asparagová	44,0	Isoleucin	10,0
Threonin	15,0	Leucin	24,0
Serin	36,0	Tyrosin	2,0
Kyselina glutamová	70,0	Fenylalanin	12,0
Prolin	122,0	Hydroxylysin	6,5
Glycin	321,0	Lysin	30,0
Alanin	105,0	Histidin	4,5
Valin	20,0	Arginin	47,0

[a] Data vyjádřena jako AMK zbytky/1000 zbytků

Existuje několik typů kolagenů, navzájem se lišících především složením AMK (tabulka III).

2.2. Biosyntéza

Kolagen je vylučován zejména buňkami pojivových tkání. Samotné kolagenové polypeptidové řetězce jsou syntetizovány na hraniční membráně ribosomů (jednotlivé AMK se spojují do řetězů kondenzací za odštěpení vody) a následně transportovány do buněčné dutiny endoplasmatického retikula[3] (ER) jako velké prekursory, nazývané pro α-řetězce. Tyto prekursory obsahují jednak krátké aminoluminální „signální peptidy“, nutné pro transport vylučovaných proteinů přes membránu ER, a také další AMK, nazývané propeptidy, vyskytující se na aminovém a karboxylovém konci. V buněčné dutině ER jsou prolin a lysin hydroxylovány na hydroxyprolin (Hyp) a hydroxylysin (Hyl). Každý pro α-řetězec se spojuje se dvěma dalšími prostřednictvím H-vazeb, vzniká trojšroubovicová struktura zvaná prokolagen. Vodíková vazba vzniká mezi kyslíkem karbonylové skupiny jedné peptidové vazby a vodíkem iminoskupiny druhé peptidové vazby. Vylučované fibrilární kolageny (kromě typu I) jsou v mimobuněčném prostoru převedeny, odstraněním propeptidů, na kolagenové molekuly. Kolageny jsou vylučovány s nehelikálními prodlouženími na obou koncích[5]. Těmto odštěpitelným částem polypeptidů, extrémně bohatým na aromatickou AMK tyrosin, se říká telopeptidy.

4-Hydroxyprolinové a 5-hydroxylysinové zbytky jsou zřídka přítomny v jiných proteinech. Hydroxylové skupiny hydroxyprolinu tvoří meziřetězcové H-vazby pomáhající stabilizovat trojřetězcový helix[6] (okolnosti zabraňující hydroxylaci prolinu, jako nedostatek kyseliny askorbové, inhibují tvorbu prokolagenu). Z posledních studií však vyplývá, že více než H-můstky má na stabilitu molekuly vliv indukční efekt Hyp v Y-pozici[7]. Hydroxylované lysinové zbytky jsou nezastupitelné při neobvyklé glykosylaci lysinu a jsou rozhodující

Tabulka III
Typy a charakteristika známých kolagenů

Typ	Řetězce	Charakteristika	Výskyt
I	α_1(I), α_2(I)	nejčastější výskyt, málo hydroxylysinu	kosti, šlachy, kůže, zubovina, vazivo, děloha, cévy
I Trimer	α_1(I)	vyšší obsah 3- a 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu	nádorové útvary a zanícená ložiska
II	α_1(II)	častý výskyt, relativně bohatý na hydroxylysin a karbohydráty	chrupavky, sklivec oka
III	α_1(III)	bohatý na hydroxylysin obsahující mezivláknové disulfidické vazby	kůže, cévy, děloha, retikulin
IV	α_1(IV), α_2(IV)	bohatý na hydroxylysin, obsahuje rozsáhlé globulární regiony	bazální membrány
V	α_1(V), α_2(V), α_3(V)	stejný jako typ IV	spojovací tkáně
VI	α_1(VI), α_2(VI), α_3(VI)	mikrofibrily	spojovací tkáně
VII		dlouhé řetězce	zpevňující fibrily
VIII	α_1(VIII)	šroubovice zařazené za sebou	některé endotelické buňky
IX	α_1(IX), α_2(IX), α_3(IX)	vedlejší protein chrupavek, nese glykosaminoglykany	chrupavky
X	α_1(X)	krátké řetězce	hypertrofické chrupavky

pro rozsáhlé síťování kolagenových molekul, které se tvoří během shromažďování kolagenu v mimobuněčném prostoru. Zbytky hydroxylysinu s navázanými sacharidy se podílí na tvorbě intra- a intermolekulárního kovalentního příčného síťování[2].

Kolageny jsou neustále, i když pomalu, degradovány specifickými mimobuněčnými enzymy, tzv. kolagenasami. Po vyloučení jsou propeptidy prokolagenových molekul odstraněny specifickými proteolytickými enzymy mimo buňku. Tyto přeměňují prokolagenové molekuly na molekuly kolagenu, také nazývaného tropokolagen (1,5 nm v průměru), které se spojují v mimobuněčném prostoru za tvorby rozměrnějších kolagenových fibril (10–300 nm v průměru). Hnací silou tvorby fibril je do jisté míry tendence kolagenu k samoseskupování. Propeptidy mají alespoň dvě funkce: *1*) usměrňují vnitrobuněčnou tvorbu trojřetězcových kolagenových molekul, *2*) protože jsou odstraněny až po sekreci, zabraňují nitrobuněčné tvorbě velkých kolagenových fibril, která by mohla být pro buňku fatální. Při pozorování izolovaných kolagenových fibril v elektronovém mikroskopu se ukazuje těsné uspořádání kolagenových molekul ve fibrilách a posunutí sousedních molekul o 67 nm, což je téměř 1/4 jejich délky. Tak vznikají, mezi po sobě jdoucími molekulami v řadě, mezery[8] o velikosti 35 nm. Toto uspořádání pravděpodobně zajišťuje agregátům velkou pevnost v tahu. Také rýhovaná struktura kolagenových molekul, viditelná v elektronovém mikroskopu, je dána posunem molekul a vznikem mezer.

Po vytvoření kolagenových fibril v mimobuněčném prostoru následuje jejich vnitřní zpevnění zesíťováním, tj. tvorbou kovalentních vazeb mezi lysinovými zbytky základních kolagenových molekul. Síťování probíhá v několika krocích: *1*) lysinové a hydroxylysinové zbytky jsou deaminovány mimobuněčnými enzymy (lysyloxidasami), čímž se zvyšuje reaktivita tvorbou aldehydových skupin, *2*) vzniklé aldehydy spontánně reagují s jinými lysinovými, nebo hydroxylysinovými zbytky za tvorby kovalentních vazeb; některé z těchto vazeb jsou nestabilní a dále modifikovány tvoří stabilnější zesíťování; většinou zesíťování vzniká mezi krátkými nehelikálními konci molekul kolagenu.

Organizace kolagenových fibril v mezibuněčné hmotě je přizpůsobena potřebám tkáně. Fibrily mají různé průměry a jsou v různých tkáních odlišně organizovány. V savčí kůži např. jsou „tkány" tak, aby odolávaly napětí ve všech směrech. Ve šlachách jsou organizovány do paralelních svazků podél hlavní osy napětí působícího na šlachu[3]. U dospělé kosti a rohovky vytvářejí pravidelně vrstvené struktury podobné překližce, přičemž jednotlivé vrstvy jsou na sebe kolmé. Pojivové tkáně samy určují velikost a uspořádání kolagenových fibril. Buňky mohou provést expresi jednoho nebo více genů pro různé typy fibrilárních prokolagenových molekul a mohou také regulovat jejich rozmístění po sekreci. Nakonec je stupeň zesíťování kolagenu větší nebo menší podle požadované pevnosti v tahu.

Syntéza kolagenových fibril a jejich shromažďování se dají stručně popsat v následujících krocích: *1*) procesy probíhající uvnitř buňky: syntéza pro α-řetězce, hydroxylace a výběr prolinů a lysinů, glykosylace vybraných hydroxylysinů, tvorba trojhelikální formace ze tří pro α-řetězců; *2*) sekrece přes plazmatickou membránu: prokolagenová molekula; *3*) procesy vně buňky: rozštěpení propeptidů, vznik kolagenových molekul, jejich shromažďování do fibril, agregace kolagenových fibril do kolagenových vláken.

2.3. Nebílkovinné komponenty

Povrch kolagenových fibril hraje důležitou roli ve stavbě a funkci pojivových tkání. Jackson[6] pozoroval, že chondroitin sulfát a jiné glykosaminoglykany (GAG), vázané solnými můstky nebo vodíkovými vazbami, se podílejí na stabilizaci kolagenu ve šlachách. Vysoce čištěný kolagen i po nedegradující extrakci obsahuje malá množství jednoduchých sacharidů, a to pentos a hexos. Hörmann[9] zjistil, že hexosou přítomnou v kolagenu rozpustném v kyselém prostředí je glukosa (3,8 jednotek na 1000 AMK zbytků), zatímco v nerozpustném

kolagenu se vyskytuje jak glukosa tak i galaktosa (celkem 3,5 jednotky na kolagenové vlákno). Rozpustné frakce dále obsahují mannosu, fukosu, rhamnosu a ribosu. Sacharidické složky se vážou prostřednictvím hydroxylysinového zbytku.

2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti

2.4.1. Polyelektrolytický charakter

Kolagen, podobně jako i jiné bílkoviny, má charakter amfoterního polyelektrolytu[4]. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. To znamená, že část skupin postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj kolagenové molekuly se mění se změnou pH; v silně kyselé oblasti má kladný náboj, v silně alkalické oblasti záporný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií se mění v rozsahu pH 4,5 až 8,0. Většina fyzikálně chemických vlastností vykazuje v této oblasti extrémní hodnoty. Jako izoiontový bod je označována hodnota pH, při níž počet protonů připojených ke skupinám $–NH_2$ bílkoviny se rovná počtu protonů oddisociovaných ze skupin –COOH. Proto se bílkovina čistí dialýzou, aby neobsahovala žádné jiné ionty. Hodnota pH se potom charakterizuje jako izoiontový bod.

2.4.2. Botnání

Z fyzikálně chemického hlediska patří kolagen k přechodným koloidním soustavám – gelům. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu omezeně botná (exotermní proces); přitom dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody obsažené v nabotnalém kolagenu tvoří tzv. botnací voda, kterou lze mechanickým účinkem odstranit, druhou část tvoří voda hydratační, koloidně vázaná, odstranitelná jen sušením.

Z hlediska mechanismu lze rozlišit botnání osmotické (nábojové) a lyotropní. Při osmotickém botnání proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem následkem gradientu osmotického tlaku. Ten je dán rozdílem koncentrací všech pohyblivých iontů ve vnitřní fázi (gelu) a ve vnější fázi (roztoku). Po určité době se ustaví rovnováha – tzv. Donnanova membránová rovnováha, kdy botnací tlak je právě vykompenzován pevností makromolekulární sítě[4]. Rozrušení stabilizujících vazeb (působením extrémní hodnoty pH nebo lyotropních činidel) sníží protitlak pevné fáze proti průniku vody a rovnováhy se dosáhne při vyšším stupni nabotnání (lyotropní botnání). Sloučeniny způsobující tento druh botnání mají schopnost štěpit vodíkové vazby a v extrémním případě až rozpouštět kolagen.

2.4.3. Denaturace a renaturace

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní nativní vlastnosti – denaturují. Denaturací kolagenu vzniká želatina. Orechovič a Spikiter zjistili, že produktem denaturační reakce vodného roztoku tropokolagenu jsou dva štěpy lišící se molekulovou hmotností, a označili je jako komponenty α a β (viz[10]). Komponentu β lze dále rozštěpit na dvě komponenty α. Vznikají tedy tři štěpy odpovídající trojité spirále molekuly kolagenu. Mechanismus denaturace tropokolagenu je dvoustupňový proces. Nejdříve nastane zborcení trojité spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou jednotlivé řetězce navzájem ještě spojeny. V druhém stupni se tato klubka rozpadávají na tři frakce: frakci α tvořící jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci β tvořící dva dosud spojené řetězce a frakci γ, kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok tropokolagenu stát delší dobu při nízké teplotě, probíhá zčásti proces renaturace, tj. zpětná rekonstrukce spirálové konfigurace.

2.4.4. Hydrotermální stabilita

Při zahřívání kolagenových vláken ve vodě dochází k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Tato termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění T_s. Příčinou smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a rovněž intramolekulárních vazeb (kdy nastává denaturace kolagenu), které udržují trojité spirály v nativním kolagenovém vlákně v nataženém stavu. T_s kolagenu se považuje za tání kolagenu v krystalických oblastech. Rovněž lyotropní činidla, štěpící vodíkové vazby, způsobují kontrakci kolagenového vlákna a snižují hodnoty T_s. K určení stability trojhelikální struktury se využívá obvykle měření teploty T_d, tj. denaturační teploty přechodu kolagen – želatina (viz odst. 2.4.6), který jako fázová přeměna prvního řádu má kladné a výrazné ΔH. Hodnoty obou teplot lze v určitém rozsahu zvýšit zesíťováním kolagenu[11]; tak např. u kolagenu vyčiněného glutaraldehydem jsou nacházeny hodnoty T_s kolem 70 °C, naproti tomu u nativního kolagenu 37 °C.

2.4.5. Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center schopných vázat vodu elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami: *1*) polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků, *2*) dusík a kyslík peptidické vazby[12]. Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého minimálního množství vody, tvořícího přibližně 20 % jeho hmotnosti. V plně hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců protofibril, typické pro suchý stav, čímž se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu. Vzdálenost mezi sousedními polypeptidovými řetězci suchého kolagenu je 1 nm, hydratací se tato vzdálenost zvyšuje na 1,5 až 1,6 nm.

2.4.6. Přeměna na želatinu

Zahříváním kolagenu ve vodném prostředí vzniká želatina. Z hlediska teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři pochody: *1*) štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvarterní struktury, *2*) denaturace na úrovni terciární struktury, *3*) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni. Zásah do struktury polypeptidového řetězce má charakter degradace, depolymerace a je jevem nežádoucím: čím méně těchto vazeb je rozštěpeno, tím lepší fyzikálně chemické vlastnosti želatina má.

Typickou vlastností želatiny je přechod sol–gel. Gel želatiny jeví tixotropii, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Je to přeměna inverzní, nikoli však vratná:

$$\text{gel} \xrightarrow{34\,^{\circ}\text{C}} \text{sol} \qquad \text{sol} \xrightarrow{28\,^{\circ}\text{C}} \text{gel}$$

Z hlediska složení AMK je možné želatinu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Jsou odstraněny nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidy a tuky[13]. U želatiny připravené alkalicky dochází k poklesu koncentrace argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku. Kysele připravená želatina se proto více blíží AMK složení kolagenu.

2.5. Roztok kolagenu

Již na počátku století bylo zjištěno, že některé kolageny lze rozpustit ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové. Fyzikálně chemické studie rozpustných kolagenů (rozptyl světla, osmometrie, viskozimetrie, dvojlom světla) umožnily blíže charakterizovat tropokolagen[14]. V dostatečně nízké koncentraci existuje rozpustný kolagen ve zředěných roztocích organických kyselin ve formě protáhlých tenkých tyčinek[15] o délce 280 nm, průměru 1,6 nm a relativní molekulové hmotnosti podle různých autorů od 265 000 do 300 000. Později byla popsána další třída rozpustných kolagenů[15-17] získaných extrakcí ve studených, slabě alkalických roztocích solí nebo neutrálních roztocích solí s hypertonickou a fyziologickou iontovou silou. V nativní formě je možné rozpustit jen agregační formy kolagenu, které ještě neobsahují intermolekulární příčné kovalentní vazby[1]. Nerozpustný kolagen z tkání starších jedinců lze rozpustit po předchozí úpravě, při níž se rozštěpí část intermolekulárních příčných vazeb a nastane částečná nebo celková chemická nebo tepelná denaturace. Rozpustnost kolagenu také závisí na stupni zralosti tkáně. Z tkání mladých jedinců je možné rozpustit 10 až 15 % kolagenu; stárnutím vaziva rozpustnost klesá[4]. Poslední výzkumy ukazují, že pro použití kolagenu jako biomateriálu je alkalická úprava účinnější než kyselá, protože pozitivně ovlivňuje termální stabilitu kolagenu a znemožňuje tvorbu fibril při neutrálním pH ve fyziologických podmínkách[18].

3. Degradace

3.1. Hydrolytická degradace

Kolagen v roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Rychlost tohoto procesu je závislá na teplotě, pH systému a v menší míře na vnitřním tlaku roztoku a povaze dalších rozpouštědel, které mohou být přítomny. S teplotou rychlost hydrolýzy roste. Při neutrálním pH postupuje degradace pomaleji, s pohybem na obě strany rychlost roste. Kromě hydrolýzy příčných kovalentních, převážně esterových vazeb, probíhá současně štěpení peptidických vazeb v polypeptidovém řetězci. Při alkalické hydrolýze je toto štěpení mírnější; štěpí se sedmnáctkrát méně peptidů než esterových vazeb[4]. Při kyselé hydrolýze je štěpení obou typů vazeb přibližně stejné.

3.2. Enzymatická degradace

Některé studie ukázaly, že nativní kolagen je vůči působení běžných proteolytických enzymů odolný, s výjimkou určitých enzymů bakteriálního nebo hmyzího původu, tzv. kolagenas, které specificky štěpí peptidové řetězce nativního kolagenu[19]. Patří mezi ně např. enzymy izolované z bakterií *Clostridium perfringens* a *Cl. histolyticum*. Jiná situace však nastává při vyšší teplotě, kdy se v roztoku rozpadá sekundární struktura kolagenu. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší počet konformací s přibližně stejnou energií a nemá stálou orientaci. Tehdy mohou peptidové segmenty přizpůsobit svou orientaci aktivnímu centru enzymu a stát se tak přístupné téměř všem proteolytickým enzymům. Ty přednostně hydrolyzují vazby s aromatickými zbytky, některé, jako trypsin, štěpí peptidové vazby, estery a amidy[19].

3.3. Oxidační štěpení

Oxidační štěpení je složitější než hydrolytická degradace. Studium vlivu oxidačních činidel, jako je např. peroxid vodíku, jodistan sodný, bromnan sodný a železokyanatan sodný, ukázalo, že se jejich reakce s kolagenem navzájem značně liší. Degradace je založena na ataku příslušného činidla na sacharidy obsažené v kolagenu[22]. Štěpení kyselinou jodistou je doprovázeno mírným úbytkem volných aminoskupin (van Slykova analýza) a prudkým poklesem obsahu hexosy. Ztráta aminoskupin odpovídá sníženému obsahu hydroxylysinu v kysele rozpustném kolagenu.

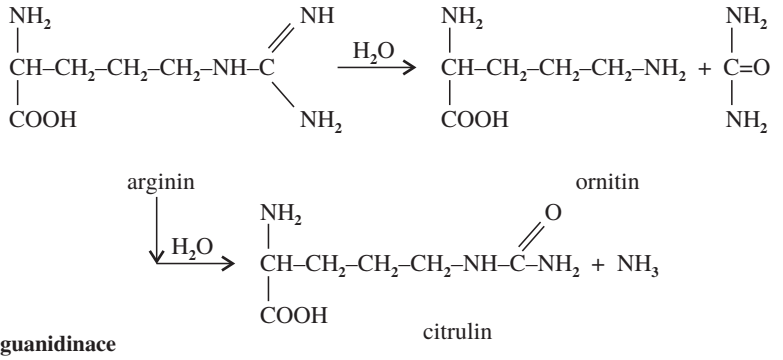
4. Chemická modifikace

S výjimkou reakcí thiolových skupin se k modifikaci vlastností a chování kolagenu používá celá řada reakcí, které je možné rozdělit do následujících kategorií: *1*) přímá reakce bočních funkčních skupin s monofunkčními reagenty nebo *2*) s polyfunkčními reagenty, vedoucí k polymerizaci; *3*) oxidační nebo redukční reakce měnící povahu řetězců (rozštěpení peptidických vazeb nebo odbourání sacharidů asociovaných s kolagenem); *4*) omezená enzymatická degradace, která nechává strukturu hlavního řetězce neporušenou. Vyjma těch případů, kdy je degradace žádoucí, jsou reakční podmínky voleny tak, aby hydrolytická degradace během chemické modifikace byla minimální.

4.1. Reakce s monofunkčními reagenty

4.1.1. Acylace

Úplnou acetylací aminoskupin kolagenu acetanhydridem vzniká vícenásobný *N*-acetylderivát a příslušný počet molekul kyseliny octové[19]. Reakce je doprovázena částečnou (77 %) acetylací hydroxylových skupin. Úplné acetylace lze dosáhnout s použitím směsi anhydridu kyseliny octové a ethylacetátu s přídavkem malého množství kyseliny mravenčí jako katalyzátoru. Selektivní *N*- a *O*-acetylace je možná pouze jednostranně. Např. při kompletní *N*-acetylaci želatiny acetanhydridem, při pH 9,5–10,5 ve vodném roztoku při 0 °C, se dosahuje pouze 2 % *O*-acetylace[22]. Je nutno pamatovat na skutečnost, že po acetylaci na bázi anhydrid kyseliny octové – silná kyselina dochází k degradaci hlavního polymerního řetězce. Další možnou vedlejší reakcí je transesterifikace, která následně způsobuje síťování kolagenu.



Obr. 2. **Reakční schéma deguanidinace**

4.1.2. Esterifikace

Ať už se jedná o esterifikaci dimethylsulfátem, bezvodým methanolem, nebo jinými činidly, je teplota smrštění esterifikovaného kolagenu totožná s hodnotami T_s naměřenými u nativní formy, ale vždy se podstatně mění průběh křivek botnání kolagenu[22]. Esterifikovaný kolagen na rozdíl od nativní formy nevykazuje v oblasti pH 6–9 minimum, ale prochází maximem. V silně kyselé (pH 2) a silně alkalické (pH 11) oblasti jsou hodnoty T_s shodné. I přes vysokou schopnost botnat zůstává esterifikovaný kolagen nerozpustný a, jak ukazují měření T_s, zachovává si svoji strukturní integritu. To naznačuje, že původní intermolekulární síťování není ovlivněno reakčními podmínkami. Vysoký stupeň nabotnání po esterifikaci je částečně přisuzován polyelektrolytovému efektu, jelikož síť kolagenových vláken je převedena na kationtovou formu s hustotou náboje nejméně jeden kationtový boční řetězec na každých 10 aminokyselinových zbytků.

4.1.3. Deaminace

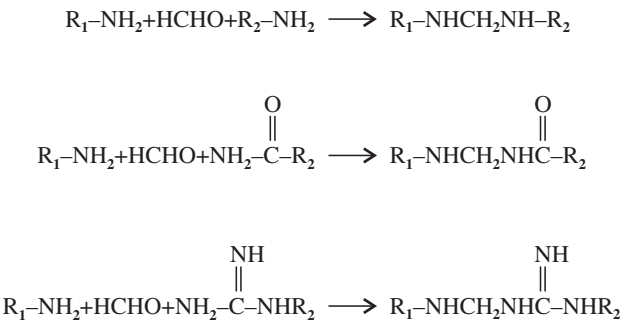
Deaminace vede k přeměně volných aminoskupin na hydroxylové skupiny. Pro dosažení kompletní deaminace se užívá směs obsahující dusitan sodný a ledovou kyselinu octovou[8]. Deaminovaný kolagen si zachovává původní T_s, ale stejně jako u esterifikace se mění křivky botnání. Kyselé botnání je sníženo v míře odpovídající poklesu kladného náboje sítě. V rozmezí pH 4–7 je objem absorbované vody identický u nativního i deaminovaného kolagenu. Avšak v alkalické oblasti dochází k podstatnému nárůstu objemu rozpouštědla, což je pozoruhodné vzhledem k Donnanově rovnováze a elektrostatickému efektu. Dochází zřejmě k poklesu vnitřní koheze mezi vlákny.

4.1.4. Deguanidinace

Arginin může být deguanidinován alkáliemi za vzniku ornitinu a močoviny, nebo také citrulinu a amoniaku (obr. 2). Reakce probíhá pomalu a je významná jen v pozdějším stupni alkalické degradace kolagenu[23].

4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu

Síťovaný kolagen má vyšší modul pružnosti (Youngův modul), větší odolnost vůči působení proteas a nižší stupeň nabotnání než protein nezesíťovaný[24,25]. Jelikož je výhodné,



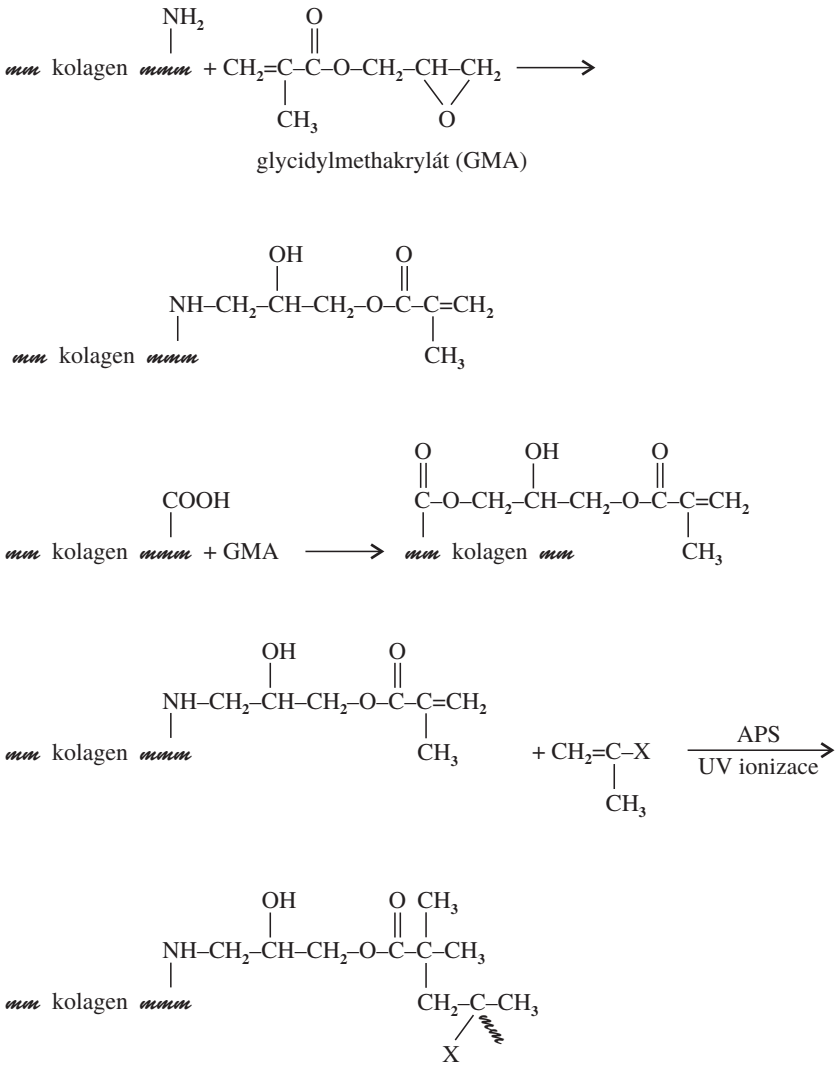
Obr. 3. **Aldehydová kondenzace**

aby kolagenové preparáty měly co možná nejlepší chemické, fyzikální i materiálové vlastnosti a minimální reaktivitu s vodou, v jejímž prostředí se obvykle nacházejí, jsou síťovací techniky často využívány. Zesíťování kolagenu může být docíleno jednak chemickou úpravou, např. s aldehydy, jako je formaldehyd, akrolein, glutaraldehyd, glyoxal, dále s kyselinami (kyselinou chromovou), oxidačními činidly (jodistany), jednak fyzikálními vlivy, např. gama zářením, UV zářením a jinými[26].

4.2.1. Aldehydová kondenzace

Schopnost aldehydů stabilizovat a síťovat AMK a proteiny byla potvrzena již v 50. letech na příkladu derivátů aminokyselin připravených reakcí s formaldehydem, které vedly ke vzniku aminomethylol derivátů primárních aminoskupin, s následnou kondenzací se sekundárními aminy, amidy, nebo guanidinovými skupinami za tvorby methylenových můstků[1] (obr. 3).

Síťování je docíleno s mono- i bifunkčními aldehydy, jejich reakce se však značně liší. Dialdehydové škroby a alifatické dialdehydy, jako je glutaraldehyd (GTA), modifikují kolagen tvorbou můstků za vzniku dvojité Schiffovy báze[27,28] (R_1–C–N=C–$(C)_n$–C=N–C–R_2). GTA reaguje přednostně s ε-aminoskupinami lysinových zbytků řetězců, ale byly získány také reakce s N-koncovými aminoskupinami peptidů, SH skupinami cysteinu a imidazolovými kruhy histidinu[29]. Ze spektrální charakteristiky a relativní molekulové hmotnosti reakčních produktů je patrné, že GTA reaguje s ε-NH_2 skupinami za tvorby málo stabilního aminu s molární hmotností přibližně 200 g.mol^{-1} a absorpcí při 300 nm (cit.[30]). V přítomnosti nadbytku GTA nastává rychlá konverze na výšemolekulární meziprodukt, který silně absorbuje při 265 nm. Stabilita



Obr. 4. **Syntéza kopolymeru kolagen-glycidylmethakrylát**

vzniklé Schiffovy báze ukazuje, že takto fixovaný kolagen je mnohem více odolný vůči kyselé nebo vysokoteplotní hydrolýze než produkt modifikovaný za stejných podmínek, ale pomocí formaldehydu. Při nízké koncentraci tvoří GTA intramolekulární síťování, při vyšší vznikají dlouhé polymerní řetězce způsobující intermolekulární fixaci.

4.2.2. Oxidace jodistanem

Tato metoda propůjčuje kolagenu požadované biologické a/nebo fyzikální vlastnosti, jako jsou mechanická pevnost, biostabilita, antiimunogenicita a další, a eliminuje tak nutnost použití GTA jako síťujícího činidla. Hydroxylová skupina vzácnější aminokyseliny vyskytující se v polypeptidových řetězcích kolagenu, 5-hydroxylysinu, může být oxidována jodistanem[31] za vzniku aldehydové skupiny, která reaguje se sousedními aminoskupinami lysinových zbytků a tvoří tak síť. Vznikající iminové skupiny jsou pak redukovány mírným redukčním činidlem, jako je např. hydridoboritan sodný nebo aminoborany.

4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace

Jedním z důvodů pro imobilizaci kolagenu na povrchu syntetických polymerních materiálů je zvýšení biokompatibility medicínských implantátů s měkkými tkáněmi a snížení rizika tvorby nádorových útvarů utvářejících se v lidském těle po implantaci polymerních náhrad. Jako příklad slouží potažení porézního polyethylenu (PE) kolagenem vázaným k povrchu chemicky, přes kovalentní vazbu[32]. Plazmatickou úpravou a následným naroubováním kyseliny akrylové byly na povrch PE zavedeny karboxylové skupiny. Poté mohl být na povrchu materiálu imobilizován kolagen prostřednictvím amidové vazby vznikající reakcí mezi karboxylovými skupinami a aminoskupinami molekul kolagenu. Tímto způsobem je vrstva kolagenu pevně fixována na modifikovaný povrch polyolefinu, aniž by docházelo k jejímu oddělování v přítomnosti vlhkosti. Množství navázaného kolagenu bylo stanoveno ninhydrinovou metodou, která poskytla hodnotu 1,5 $\mu g.cm^{-2}$.

Jinou možností ukotvení je modifikace kolagenu roubova-

cí polymerací s akrylovými monomery. Jako příklad může sloužit dvoustupňová výroba kopolymerů kolagenu s glycidylmethakrylátem[2] (obr. 4).

Oxidační metodu pro ukotvení biomolekul k povrchu substrátů vyvinul Keogh[31]. Metoda spočívá v oxidaci 2-aminoalkoholových skupin jednoho materiálu jodistanem za tvorby aldehydových skupin, reagujících v dalším kroku s aminoskupinami druhého materiálu za vzniku iminové vazby, která dále po redukci poskytuje aminová vazebná spojení, schematicky:

$$RCH(O) + -NH_2 \rightarrow -N=CHR$$

$$\text{redukční činidlo} + -N=CHR \rightarrow -NH-CH_2-R$$

Materiálem obsahujícím 2-aminoalkoholovou nebo aminovou skupinu může být biomolekula nebo povrch polyolefinu. IO_4^- se používá buď ve formě kyseliny jodisté nebo jejích solí (Na, K a jiné alkalické kovy). V případě oxidace biomolekul je reakce vedena ve vodném pufru při pH 4–9 (6–8 pro pH senzitivní biomolekuly) a teplotě 4–37 °C. Polyolefiny mohou být snadno aminovány plazmochemickou úpravou s NH_3.

5. Biomedicínské aplikace

Použití kolagenu má svůj původ ve „fyziologické blízkosti“ nebo dokonce identitě aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem „příjemce“, v jeho resorbovatelnosti, která se dá řídit síťovacími reakcemi, a ve vysoké absorpční schopnosti, která je podporovaná značným vnitřním povrchem (několik m^2/cm^3) a snadno přístupnými reakčními skupinami. Výhodou je, že se dá vyrobit velmi čistý, což platí zejména pro rozpustné kolageny. Ukazuje se, že použití kolagenu má více předností. Jako nespecifický polymer, nacházející se ve stejné formě u různých druhů savců, vykazuje velmi nízkou antigenitu, nevyvolává tvorbu protilátek organismu[2]. Při působení specifických enzymů na molekuly kolagenu se odstraní telopeptidy z konců řetězců a antigenita se potlačí ještě více. Kolagen může být i nosičem léčiv nebo stimulujících látek, které se lokálně dostávají do rány a postupně se během hojení uvolňují[33]. O tuto skupinu biomateriálů je proto v současnosti mimořádný zájem. Nevýhodou systémů na bázi kolagenu je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Proto je nutné kompozitní systémy stabilizovat, např. přídavkem různých typů zhášečů nebo lapačů reaktivních radikálových meziproduktů enzymatických reakcí.

Je účelné seřadit množství kolagenových lékařských preparátů nezávisle na výchozím materiálu a výrobním postupu podle druhů a použití (tabulka IV).

Ze střev stočená šicí vlákna („catgut“) patří již staletí k chirurgickému náčiní. Přes rostoucí význam syntetických šicích vláken, např. na bázi polyamidu, polyesteru nebo polymerů kyseliny mléčné, která nejsou absorbovatelná nebo jsou zpožděně resorbovatelná, fyziologicky jsou absolutně indiferentní a většinou levnější, má catgut své pevné místo na operačním sále. Jeho resorbovatelnost se řídí zesíťováním solemi chromu.

Kolagenové plochy se v medicíně používají buď jako přírodní vlákenné pletivo (kožní štípenky), jako netkané textilie nebo fixované pěny, přičemž cesta k oběma posledně jmenovaným kategoriím vede buď přes mechanické rozmělnění vlákenného pletiva nebo přes rekonstituci z roztoku. Kožní štípenky, zbavené nekolagenových součástí do značné míry alkalickou, kyselou nebo enzymatickou úpravou, vysušené zmrazením a sterilizované radiačně-chemicky, se používají k zakrytí ran, především popálenin[34]. Rovněž disperze kolagenových vláken formované do membrán se hodí k dočasnému zakrytí rány. V kolagenových membránách mohou být inkorporovány i baktericidní přísady a látky, které podporují růst kostí. Práškový kolagen byl zpracován do spreje, který lze nastříkat na rány jako bandáž. Membrány z atelokolagenu (kolagen enzymaticky zbavený koncových rozvětvených částí molekul, tzv. telopeptidů) se používají nejen na zakrývání ran, ale i k opravě cév, náhradě šlach a pro pěstování buněčných kultur *in vitro*. Obávanému vysušení ran zakrytých kolagenem je možno zabránit mj. kombinací s plastovou fólií, která pokrývá povrch a je prodyšná (např. Goretex nebo Poromeriks). Netkané textilie z kolagenu se užívají pro zastavení krvácení. Hemostyptika na bázi kolagenu dnes patří k základnímu vybavení při hojení operačních ran, patří sem např. výrobky firmy HYPRO, Otrokovice. Resorbovatelnost kolagenu se dá řídit síťujícími reakcemi, např. reakcí s již zmiňovaným glutaraldehydem. Houbovité resorbovatelné polymery, např. na bázi kyseliny mléčné, je možné plnit atelokolagenem z vepřové kůže a používat jako náhradu pokožky[35].

I když v současné době stále více převládají syntetické cévní a orgánové protézy, přesto se vždy uvažuje kombinace s rozpustným kolagenem, aby se optimálně redukovala propustnost cév, podnítil růst buněk a zlepšila biokompatibilita protéz s živou tkání. Navrhují se nové látkové kombinace: např. vytlačované teflonové hadice s velkou pórovitostí mohou být opatřeny „vnitřním vyložením“ směsí chitosanu a kolagenu, nebo roubovací polymerace kolagenu na polytereftalátové protézy pomocí kyseliny akrylové[2]. Kolagenová vlákna kombinovaná s fosforečnanem vápenatým se s výhodou používají jako náhrada kostí a zubů[36,37]. Přídavek zydermu (vstřikovaného kolagenu) k fosforečnanu vápenatému podporuje lé-

Tabulka IV
Kolagenové medicínské preparáty podle druhu a oboru použití

Výrobky	Použití
Šicí vlákna – catgut	chirurgický šicí materiál zakrývání ran/léčení ran
Kolagenová vlákna – z roztoků – ze suspenzí – z membrán	zastavování krvácení (hemostatika) náhrada pokožky náhrada cév/vykládání cév
Kolagenové plochy přirozená pokožka membrány, bandáže netkané textilie pěny/ houby	orgánové implantáty plniva pro implantáty
Cévy/orgány	vazivové opravy lepení tkání proliferace buněk
Kolagenové prášky, lepidla, pudry a spreje	péče o pleť

čení kostí více než pouhá výplň z hydroxyapatitu. Jako příklad může sloužit kompozitní materiál obsahující hydroxyapatit a atelokolagen, určený na výplně různých kostních defektů[38], vyvinutý na Chemickotechnologické fakultě STU v Bratislavě pod názvem BIOVAK. Atelokolagen v kompozitu vyvolá rychlejší prorůstání implantátu novou kostí a potlačuje tvorbu fibrózní vrstvy na jejich rozhraní. Další aplikační výhodou takového kompozitu je jeho tvarovatelnost při současném zachování kompaktnosti.

Nejnovější vývoj léčení ran se týká použití mikrokapslí (fibrilovaný kolagen v podobě koacervátu), upravených roztoky polysacharidů a růstovými buněčnými faktory. Zájem si zasluhuje výroba kolagenových částic v rozsahu mikro- a nanometrů, které jsou „napuštěny“ účinnou látkou a dají se vstřikovat. V chirurgii získává stále větší význam lepení místo šití. K tradičním fibrinovým lepidlům se nyní přidružují kolagenová lepidla, která se připravují reakcí kolagenu s kyselinou antrachinon-1,5-disulfonovou a anhydridem kyseliny glutarové. Značná pozornost je u medicínských aplikací kolagenu věnována také zábraně alergických reakcí. Aktuální je již zmiňované potahování syntetických polymerních náhrad a příprava kontaktních čoček v kombinaci s polyakryláty[39].

Autoři považují za milou povinnost poděkovat za finanční podporu tohoto výzkumu MŠMT ČR (granty VS 96108, CZT 90015, CZ 690019).

LITERATURA

1. Blažej A., Deyl Z., Adam M., Galatík A., Michlík I., Smejkal P.: *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. VEDA, Bratislava 1978.
2. Reich G.: Leder *46*, 2 (1995).
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of the Cell*, 2. vyd., str. 808. Garland Publishing, New York 1989.
4. Mládek M.: *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*, str. 33. SNTL, Praha 1971.
5. Jackson D. S.: Biochem. J. *56*, 699 (1954).
6. Bella J., Brodsky B, Berman H. M.: Structure *3*, 893 (1995).
7. Nagarajan V., Kamitori S., Okuyama K.: J. Biochem. (Tokyo) *125*, 310 (1999).
8. Vodrážka Z., Krechl J.: *Bioorganická chemie*, str. 38. SNTL, Praha 1991.
9. Hörmann H.: Leder *11*, 173 (1960).
10. Morawetz H.: *Chování makromolekul v roztoku*, str. 352. Academia, Praha 1971.
11. Anselme K., Petite H., Herbage D.: Matrix *12*, 264 (1992).
12. Gustavson K. H.: *The Chemistry and Reactivity of Collagen.* Academic Press, New York 1956.
13. Babel W.: Chem. Unserer Zeit *2*, 86 (1996).
14. Boedtker H., Doty P.: J. Am. Chem. Soc. *78*, 4267 (1956).
15. Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *37*, 286 (1951).
16. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *41*, 1 (1955).
17. Jackson D. S., Fessler J. F.: Nature *176*, 169 (1955).
18. Hattori S., Adachi E., Ebihara T., Shirai T., Someki I., Irie S.: J. Biochem. (Tokyo) *125*, 676 (1999).
19. Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 83/00339; Chem. Abstr. *98,* 166936 (1983).
20. Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K., v knize: *Collagen* (Nimni M.E., ed.), sv. III. *Biotechnology*, kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1988.
21. Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K.: J. Biomed. Mater. Res. *21*, 741 (1987).
22. Ramachandran G. N.: *Treatise of Collagen,* sv. I *Chemistry of Collagen*. Academic Press, New York 1967.
23. Veis A.: *The Macromolecular Chemistry of Gelatin.* Academic Press, New York 1964.
24. Weadock K., Olson R. M., Silver F. H.: Biomater. Med. Devices. Artif. Organs *11*, 293 (1984).
25. Miyata T., Taira T., Noishiki Y., v knize: *Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces* (Piskin E., ed.), str. 195. Elsevier Applied Science, London 1992.
26. Vizárová K., Bakoš D., Reháková M., Macho V.: Biomaterials *15*, 1082 (1994).
27. Richards F. M., Knowlews J. R.: J. Mol. Biol. *14*, 231 (1968).
28. Monsan P., Puzo G., Mazarquil J.: Biochimie *57*, 1281 (1975).
29. Kirkeby S., Moe D.: Acta Histochem. *79*, 115 (1986).
30. Cheung D. T., Nimni M. E.: Connec. Tissue Res. *10*, 187 (1982).
31. Keogh J. R.: US 5 821 343 (1998).
32. Kinoshita Y., Kuzuhara T., Kirigakubo M., Kobayashi M., Shimura K., Ikada Y.: Biomaterials *14*, 546 (1993).
33. Hirasawa S., Fujioka I., Miyata N., Yamashita H.: Biomed. Res. *18*, 149 (1997).
34. Yannas I. V., v knize: *Material Science and Technology: A Comprehensive Treatment* (Williams D. F., ed.), sv. 14 *Medical and Dental Materials*, str. 180. VCH, Weinheim 1992.
35. Koide M., Osaki K., Konishi J., Oyamada K., Katakura T., Takahashi A.: J. Biomed. Mater. Res. *27*, 79 (1993).
36. Shoshan S., Yaffe A., v knize: *Collagen* (Nimni M. E., ed.), sv. III Biotechnology, kap. 8. CRC Press, Boca Raton 1988.
37. Crigger M., Bogle G. C., Garrett S., Gantes B. G.: J. Periodontal *67*, 403 (1996).
38. Bakoš D.: Quark *10*, 14 (1996).
39. Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 82/02716; Chem. Abstr. *97,* 223005 (1982).

P. Peterková[a] and L. Lapčík, Jr.[b] *([a]Institute of Physical and Consumer Chemistry, Chemical Faculty, Technical University, Brno, [b]Institute of Physics and Materials Engineering, Technological Faculty, Zlin, Technical University at Brno):*
Collagen – Properties, Modifications and Applications

Chemical modifications for obtaining specific and the most efficient chemical, physical and material properties of the collagen-based matrices were reviewed. Possible chemical reactions of collagen with functional reagents (acylation, esterification, deamination and deguanidination) and polymerization reactions (aldehyde condensation, periodate oxidation) were discussed. Finally, several technological procedures for the surface immobilization of collagen on synthetic polymers were summarized.

CHEMICKÁ KOMUNIKACE HMYZU POHLEDEM ORGANICKÉHO CHEMIKA

Přednáška nositele ceny Alfreda Badera za rok 1998. Přednesena na konferenci v Liblicích[1]

MICHAL HOSKOVEC

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: hoskovec@uochb.cas.cz

Došlo dne 13.I.2000

Klíčová slova: chemická komunikace, semiochemikálie, feromony, obaleč východní, *Cydia molesta*, analogy feromonů

Obsah

1. Úvod
2. Cíl projektu
3. Testované sloučeniny
4. Stanovení biologické aktivity analogů feromonů
   4.1. Elektrofyziologické techniky
      4.1.1. EAG záznam
      4.1.2. ESG záznam
      4.1.3. Problém těkavosti sloučenin při EAG/ESG
   4.2. Testování vlivu analogů na chování motýlů (tzv. behaviorální techniky)
      4.2.1. Test v Petriho miskách (short-range behavior test; SRB test)
      4.2.2. Větrný tunel (long-range behavior test; LRB test)
5. Výsledky biologických testů a diskuse
   5.1. Dodecyl-chlorformiát (*II*)
   5.2. Laktonové analogy *III–V* (alkenolidy)
   5.3. Thiaanalogy *VI* a *VII*
   5.4. Dodecyl-acetát (*VIII*)
   5.5. Rozvětvené analogy *IX–XI*
6. Závěr

1. Úvod

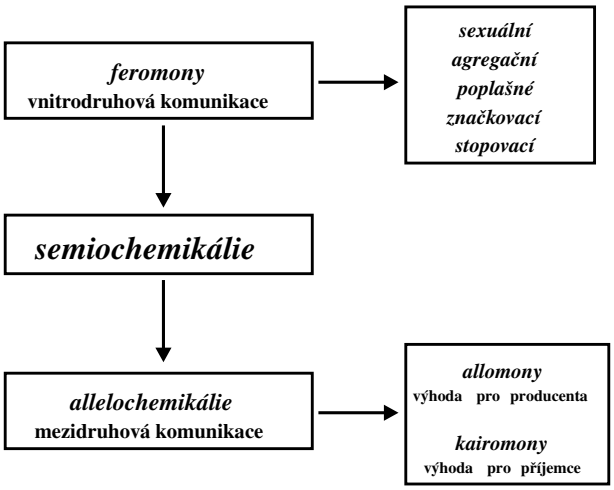
Výzkum chemické komunikace živých organismů patří v posledních 30 letech k bouřlivě se rozvíjejícím oblastem přírodních věd. Vznikl nový, multidisciplinární vědní obor – chemická ekologie. Studium chemicko-biologických vztahů v ekosystémech umožnilo komplexní pohled na celou strukturu vnitrodruhových a mezidruhových vztahů mezi živými organismy. Díky tomu se změnil náš pohled na přírodu jako takovou – dnes již víme, že vzájemné interakce valné většiny živočichů i rostlin jsou do značné míry ovlivňovány či dokonce přímo řízeny stopovým množstvím určitých, pro daný druh či situaci, specifických organických sloučenin. Naše současné znalosti ukazují na primární úlohu chemické komunikace u hmyzu (*Insecta*). Přístupnost čichového orgánu – tykadla, specifita čichových receptorů a možnost laboratorních chovů činí z této živočišné třídy unikátní model pro teoretické studium. Většina současných obecných poznatků o chemické komunikaci a čichovém vnímání je odvozena právě od modelových experimentů na hmyzu. Práce v této oblasti je důležitá i z praktického hlediska – znalost principu chemické komunikace určitého druhu hmyzu nám dává strategickou výhodu v možnosti modifikace jeho chování v náš prospěch (např. využití v integrované, ekologicky nezávadné ochraně rostlin a zemědělských produktů).

Z hlediska působení semiochemikálií (dělení viz obr. 1) – látek používaných živými organismy k chemickému přenosu informace – mají největší význam feromony (řecky: φερειν – přenos, ορμαν – vzruch) zajišťující vnitrodruhovou komunikaci[2-4]. Feromony jsou z hlediska chemické struktury množinou obsahující značné množství mnohdy i naprosto nesourodých strukturních typů (alifatické nenasycené sloučeniny, heterocykly, makrocykly, spiroketaly, terpeny atd.).

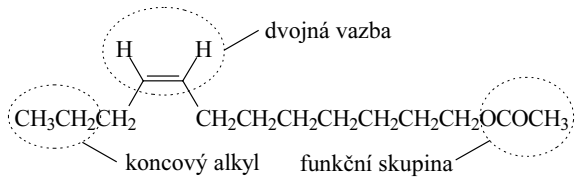
Kvantitativně i kvalitativně na nejvyšší úrovni jsou v současné době naše znalosti o sexuální chemické komunikaci u hmyzího řádu motýlů (*Lepidoptera*)[5]. Pro to jsou dva ryze praktické důvody: *1*) mnoho motýlů patří mezi významné zemědělské škůdce a tím je zajištěna společenská objednávka na příslušný výzkum, *2*) motýlí feromony mají relativně jednoduchou chemickou strukturu. Později se ukázalo, že motýli jsou díky již výše zmíněným výhodám velmi vhodným materiálem i pro základní výzkum v oblasti mechanismu čichového vnímání.

Chceme-li ovlivnit biochemický proces, jehož výsledkem je biologický efekt, měli bychom znát jeho mechanismus na různých úrovních biologického systému. V našem případě to znamená na molekulární úrovni objasnit povahu interakce feromonu s proteiny čichového receptoru, jejichž detailní funkce a struktura nejsou zatím zcela známy. Výše zmíněné interakce zahrnují např. vodíkové můstky, van der Waalsovy, elektrostatické, hydrofobní a hydrofilní mechanismy. V případě sexuálních feromonů motýlů (většinou jde o nízkomolekulární lineární mono/polyenické acetáty, alkoholy či aldehydy) je obecně přijímán tzv. tříbodový model[6], podle kterého molekula obsahuje tři farmakofory: 1. koncový alkyl; 2. dvojnou/dvojné vazby a 3. funkční skupinu (obr. 2). Klíčovou roli zde hraje geometrie dvojných vazeb – z možných izomerů je daným druhem rozpoznáván a využíván převážně jeden nebo specifická směs několika izomerů. V některých případech má „nepravý" izomer inhibiční účinky. Proto je syntéza feromonů striktně podřízena potřebě získat geometrické izomery o co nejvyšší čistotě.

Jedním z perspektivních způsobů uplatnění feromonů v praxi je tzv. metoda dezorientace[7-9] spočívající v narušení systému vnitrodruhové sexuální komunikace a tím i reprodukce druhu. Dezorientačního efektu lze v principu dosáhnout dvěma způsoby: použitím skutečného feromonu (jeho analogu) ve vysoké koncentraci (klasická dezorientace) nebo využitím tzv. reaktivních analogů[10,11] schopných buď blokovat (nejlépe nevratně) čichové receptory nebo působit jako inhibitory



Obr. 1. **Dělení semiochemikálií**. Poznámka: Allomonem je např. semiochemikálie emitovaná predátorem, sloužící jako návnada pro jeho kořist (výhoda pro producenta). Kairomonem je např. ovipoziční feromon motýla, „zneužitý" lumkem – parazitem k lokalizaci vajíček hostitele (výhoda pro příjemce)



Obr. 2. **Strukturní prvky („farmakofory") rozhodující o biologické aktivitě (*Z*)-8-dodecenyl-acetátu**

feromonových katabolických enzymů. V obou případech je výsledkem tzv. čichová slepota.

Při objasňování mechanismů chemické komunikace motýlů na molekulární úrovni a designu perspektivních analogů sexuálních feromonů je nutné řešit množství experimentálních i teoretických problémů zasahujících do oblasti organické a fyzikální chemie, entomologie, etologie, fyziologie či biostatistiky. Několik následujících stran textu si klade za cíl nastínit možné způsoby řešení uvedené problematiky na příkladu projektu „Potenciální bioracionální pesticidy na bázi analogů feromonů".

2. Cíl projektu

Cíl projektu, design nových chemických struktur, použitelných jako bioracionální insekticidy pro boj s motýlkem obalečem východním (*Cydia molesta*; celosvětově významný škůdce peckovin) měl i teoretický aspekt. Obaleč východní byl použit jako modelový druh hmyzu pro studium mechanismu čichového vnímání na úrovni receptorového systému.

3. Testované sloučeniny

Objektem našeho zájmu, hlavní složkou sexuálního feromonu obaleče východního, je (*Z*)-8-dodecenyl-acetát (*I*; dále *Z*8-12:Ac)[5,12]. Molekula *Z*8-12:Ac nabízí tři strukturní jednotky vhodné pro případnou modifikaci – koncový alkyl, *cis*-dvojnou vazbu a acetátovou funkci (obr. 2). Pokud se podíváme na struktury syntetizovaných analogů (schéma 1), můžeme je rozdělit do několika skupin. Do první skupiny reaktivních analogů (modifikovanou původní acetátovou skupinou) lze zařadit chlorformiát *II* a alkenolidy (laktony) *III–V*. Kromě předpokládané reaktivity[13] by analogy *II–V* díky bioizosterictě záměny[14] $CH_3 \rightarrow Cl$ a určité podobnosti mezi acetátovou a laktonovou funkcí mohly interagovat s receptorovými proteiny stejným způsobem jako feromon *I*. Druhá skupina obsahuje sirné bioizostery *VI* a *VII* (náhrada dvojné vazby skupinou $-CH_2S-$ resp. $-SCH_2-$)[15]. U třetí skupiny je pozměněno okolí dvojné vazby původního C-skeletu molekuly. Patří sem nasycený analog *VIII* a větvené vinyl/ethyliden analogy *IX–XI*. Návrh větvených analogů *IX–XI* byl inspirován prací[16] o inhibičních účincích vinylanalogu feromonu u motýla *Cryptophlebia leucotreta*. Popis syntézy látek *II–XI* je stericky příliš náročný a lze se s ním podrobně seznámit v literatuře[17-20].

4. Stanovení biologické aktivity analogů feromonů

4.1. Elektrofyziologické techniky

Mezi základní způsoby testovaní semiochemikálií u hmyzu patří v současnosti elektrofyziologické sledování aktivity na tykadlech lokalizovaných čichových receptorových buněk[21] (olfactory receptor cell – ORC). Jde o elektroantennografii (EAG), snímající sumaci změn potenciálů všech ORC na tykadle a elektrosenzilografii (ESG) monitorující změny potenciálu jediné ORC. Schéma typického zařízení pro měření EAG je znázorněno na obrázku 3. ESG aparatura je až na použití střídavého zesilovače prakticky identická, místo tykadla je v případě motýlů zapojena do měřícího obvodu jediná trichoidní senzila obsahující jednu ORC. Obě techniky byly využity pro stanovení biologické aktivity analogů hlavní složky sexuálního feromonu obaleče východního (*Cydia molesta*).

4.1.1. EAG záznam

Klíčovým parametrem získaným z EAG záznamu je amplituda změny potenciálů (řádu mV) po stimulaci (obr. 4). Ta je výslednicí efektivity semiochemikálie (tj. její schopnosti snižovat polarizaci ORC) a počtu aktivovaných receptorů. Pořízení EAG záznamu je méně náročné než práce s jedinou ORC v případě ESG[21]. Při stanovení aktivity testované semiochemikálie (v našem případě analogu feromonu) obvykle pořizujeme EAG záznam při různých koncentracích pro získání závislosti dávky a odezvy (dose-response). Ze sigmoidních dose-response křivek se běžně odečítají následující parametry: *1*) saturační odezva, *2*) odezva pro standardní dávku a *3*) dávka odpovídající 100 % nebo 75 % odezvě standardu

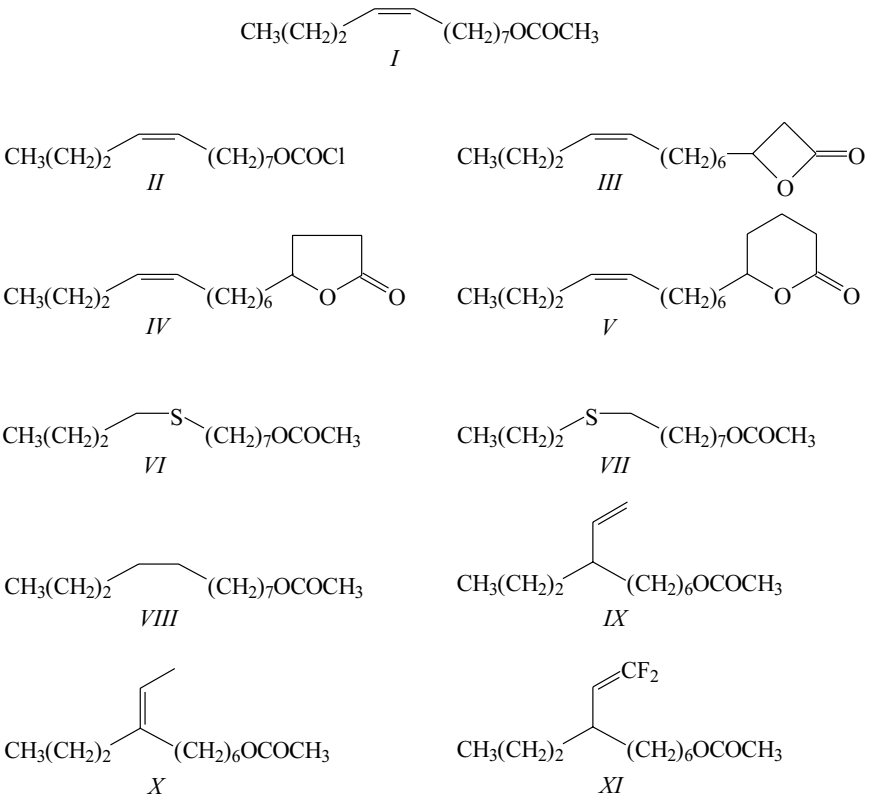
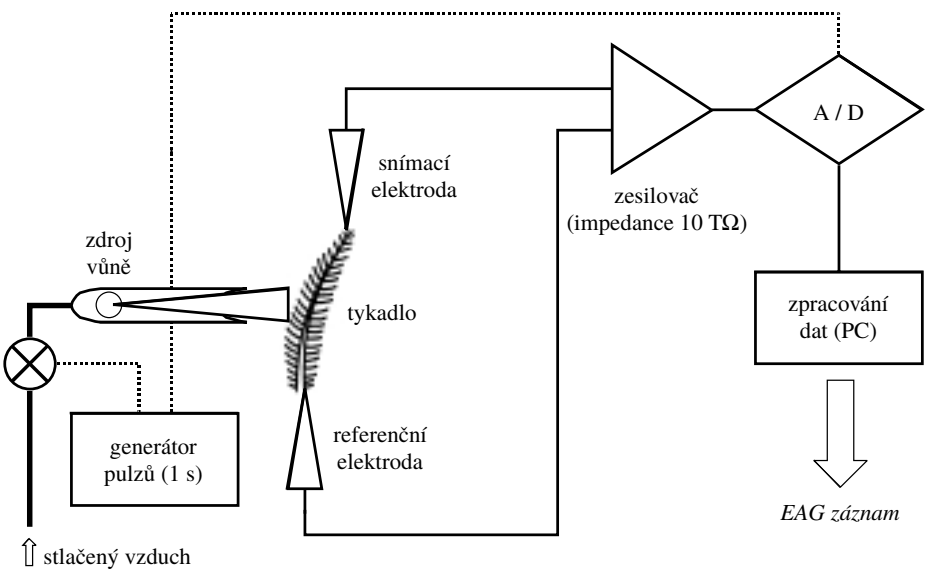
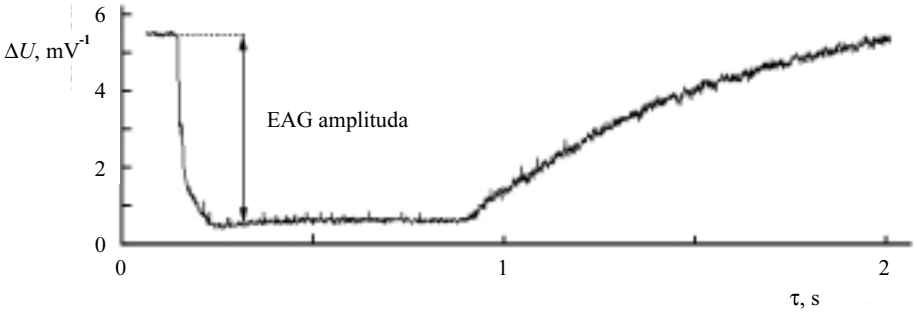


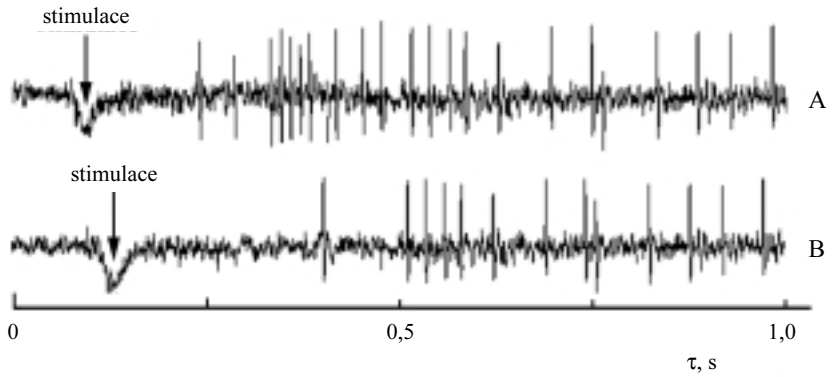
Schéma 1



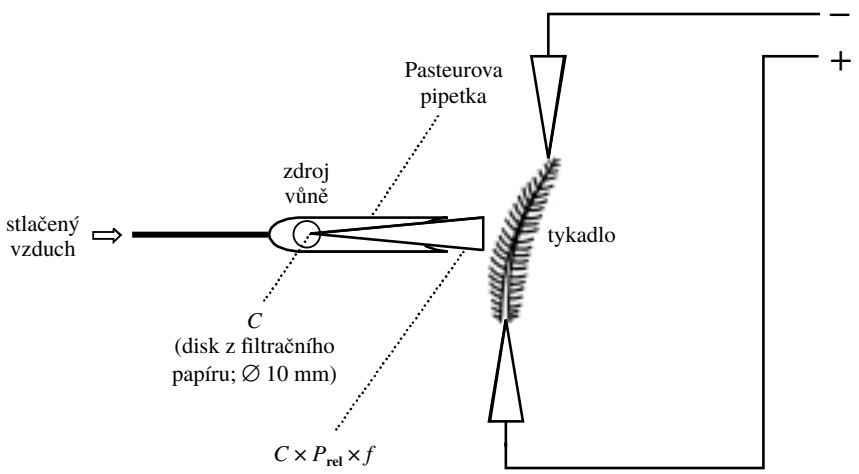
Obr. 3. **Blokové schéma standardního zařízení pro elektroantenografii (EAG)**



Obr. 4. **Příklad elektroantenogramu (reakce tykadla samce obaleče východního na *Z*8-12:Ac, *I*)**



Obr. 5. **Příklad elektrosenzilogramu (reakce ORC specifické pro *Z*8-12:Ac, *I* na: A) *Z*8-12:Ac; B) chlorformiátu *II*)**



Obr. 6. **Schematické znázornění problému rozdílné těkavosti testovaných látek při elektrofyziologickém experimentu**

(feromonu). Pro posuzování výsledků EAG měření je důležité si uvědomit fakt, že EAG odezva je odezvou všech ORC tykadla. V případě receptorového systému „naladěného“ na vícesložkový feromon pak většinou odpovídají všechny typy ORC (každá složka má vlastní typ ORC), každý typ jinou intenzitou.

4.1.2. ESG záznam

Elektrosenzilografie[21] nám umožňuje exaktně srovnat odpověď specializované ORC na „vlastní“ semiochemikálii (na kterou je naladěna) s odpovědí na libovolnou testovanou sloučeninu (v našem případě na analog feromonu). Pro vyhodnocení ESG záznamů (příklad na obr. 5) je nejdůležitější frekvence tzv. akčních potenciálů (spiků) po stimulaci. Hustota spiků po stimulaci je přímo úměrná biologické aktivitě testovaných semiochemikálií, jejich amplituda je stejná u méně i více aktivních sloučenin. Nejintenzivnější odpověď vykazuje ORC obvykle po stimulaci sloučeninou na jejíž identifikaci je „naladěna“ (např. sexuálního feromonu).

4.1.3. Problém těkavosti sloučenin při EAG/ESG

Amplituda EAG (či frekvence akčních potenciálů v případě ESG) je výslednicí efektivity semiochemikálie, tj. její schopnosti snižovat polarizaci ORC, a skutečné koncentraci sloučeniny, které na receptory působí. Tato koncentrace je přímo úměrná těkavosti testované sloučeniny. Při porovnávání elektrofyziologické aktivity série sloučenin jsou díky jejich rozdílné těkavosti (a tím odlišných tlaků nasycených par i při použití stejné dávky sloučenin pro elektrofyziologický experiment) získaná data používaná pro konstrukci dose--response křivek často velmi nepřesná a zavádějící (obr. 6). Při znalosti tlaku nasycených par testovaných sloučenin však lze uvedený problém snadno eliminovat korekcí na relativní těkavost vztaženou ke standardu. V našem případě je standardem feromon, *Z*8-12:Ac (*I*; jeho relativní těkavost $P_{REL} = P_T/P_R = 1$).

Pro samotné stanovení tlaků nasycených par (a tím i relativních těkavostí) feromonů[22-25] a jejich analogů jsme jako první použili plynově-chromatografickou (GC) metodu vyvinutou Jensenem a Schallem[26]. Na rozdíl od přímých technik[27,28] stanovení tlaků nasycených par při nízkých teplotách nevyžaduje velké množství sloučeniny, náročné přístrojové vybavení a je časově poměrně nenáročná. Metoda je založena na myšlence srovnání GC retenčních časů referenční a testované sloučeniny. Fyzikálně-chemické základy metody lze shrnout do tří jednoduchých rovnic[29]. Závislost tlaků nasycených par (*P*) dvou sloučenin při stejné teplotě lze vyjádřit pomocí rovnice

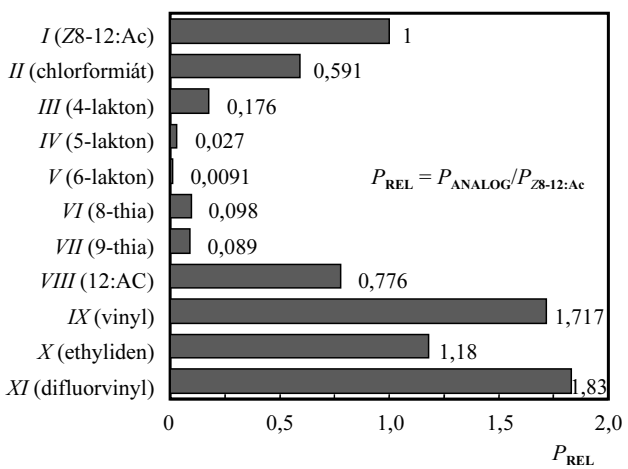
$$\ln P_T = (\Delta H_T/\Delta H_R) \ln P_R + c \qquad (1)$$

kde dolní indexy T a R popisují testovanou a referenční sloučeninu a ΔH je latentní výparné teplo. Tlaky par jsou také závislé na retenčních časech

$$\ln P_T = \ln P_R - \ln (\tau_T/\tau_R) \qquad (2)$$

kde τ jsou retenční časy. Kombinací a úpravou rovnic (*1*) a (*2*) získáme vztah (*3*)

$$\ln (\tau_T/\tau_R) = (1 - \Delta H_T/\Delta H_R) \ln P_R - c \qquad (3)$$



Obr. 7. **Relativní těkavosti P_{REL} *Z*8-12:Ac a jeho analogů**

V grafickém znázornění závislosti $\ln (\tau_T/\tau_R)$ proti $\ln P_R$ je pak směrnice $1 - \Delta H_T/\Delta H_R$ a úsek na ose – c. Směrnici i úsek získáme lineární regresí retenčních časů testované a referenční sloučeniny naměřených za různých teplot. Takto získané hodnoty mohou být po dosazení do rovnice (*1*) použity pro výpočet tlaku nasycených par testované sloučeniny při libovolné teplotě za předpokladu znalosti tlaku referenční sloučeniny za téže teploty.

Jako referenční sloučeniny byly pro stanovení tlaku *Z*8--12:Ac (*I*) a jeho analogů zvoleny vyšší *n*-alkany (C_{14}–C_{21}) u kterých jsou známy s dostatečnou přesností tlaky nasycených par v širokém rozmezí teplot. Kromě toho splňují i požadavek na „podobné" chromatografické chování (především polaritu) jako série testovaných sloučenin. Význam korekce na těkavost v případě analogů *Z*8-12:Ac (*I*) potvrzují výsledky stanovení (graf na obr. 7). Například laktonový analog *V* je více než 100× méně těkavý než feromon *I*, naopak větvené vinylanalogy *IX* a *XI* jsou téměř 2× těkavější.

4.2. Testování vlivu analogů na chování motýlů (tzv. behaviorální techniky)

Elektrofyziologické metody nám poskytují údaje o působení testovaných analogů sexuálního feromonu na úrovni feromonového receptorového systému. Pro odpověď na otázku, jak působí testované semiochemikálie na vlastní chování zkoumaných motýlů, je nutné použít některou z tzv. behaviorálních technik[30]. Mezi ně lze zařadit testy v Petriho miskách či ve větrném tunelu (ale též testy v polních podmínkách).

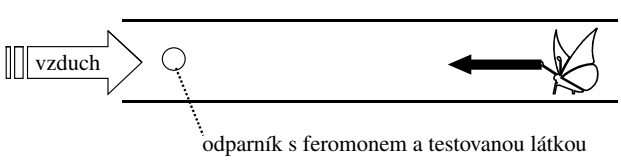
4.2.1. Test v Petriho miskách (short-range behavior test; SRB test)

Jeden z nejjednodušších behaviorálních testů je založen na sledování chování motýlího samečka umístěného v Petriho misce spolu s volající (tj. feromon emitující) samičkou v přítomnosti odparníku s testovanou látkou (100 ng analogu). Vyhodnocuje se úspěšnost kopulace ve srovnání s kontrolou (index K) bez analogu vyjádřená tzv. konfuzním koeficientem

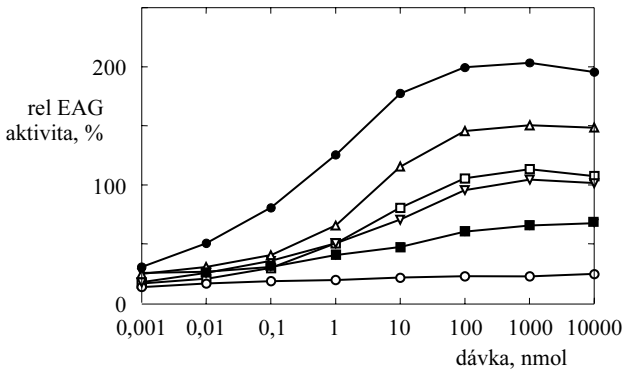
$$CC\ [\%] = (C_K/N_K - C_A/N_A) \times 100$$

4.2.2. Větrný tunel (long-range behavior test; LRB test)

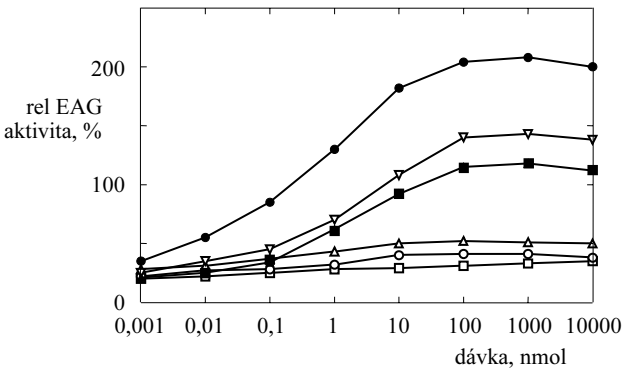
Větrný tunel z plexiskla o rozměrech 186×30×30 cm má systémem ventilátorů zajištěné laminární proudění zvlhčeného vzduchu (0,5 $m.s^{-1}$); řízenou teplotu, dobu a intenzitu osvětlení. Za přívodem proudu vzduchu se umísťuje odparník s testovanou semiochemikálií a na protilehlém konci tunelu se vypouští sameček motýla (obr. 8). Sledují se 4 fáze předkopulačního letového chování samečka – mávání křídly (fanning), vzlet (take off), orientovaný let (oriented flight) a dosednutí



Obr. 8. **Princip větrného tunelu (LRB test)**



Obr. 9. **Dose-response závislosti pro Z8-12:Ac a analogy s modifikovanou acetátovou skupinou**, ● *I* (Z8-12:Ac), Δ *II* (chlorformiát), ■ *III* (4-lakton), ∇ *IV* (5-lakton), ○ *V* (6-lakton), □ *VIII* (12:Ac)



Obr. 10. **Dose-response závislosti pro Z8-12:Ac a analogy s modifikací v místě *cis*-dvojné vazby**, ● *I* (Z8-12:Ac), ■ *VI* (8-thia), ∇ *VII* (9-thia), Δ *IX* (vinyl), ○ *X* (ethyliden), □ *XI* (difluorvinyl)

na odparník (touch/landing). Pro LRB testy na inhibiční účinky byly použity směsi přírodního feromonu (10 ng) se syntetizovanými analogy (100 ng).

5. Výsledky biologických testů a diskuse

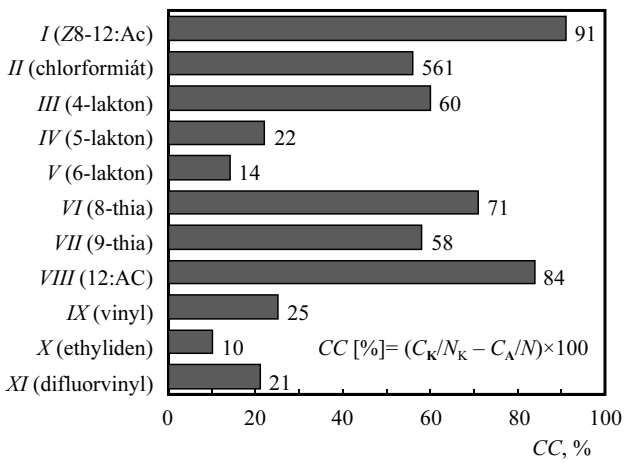
EAG aktivity syntetizovaných analogů jsou znázorněny jako dose-response křivky na obr. 9 a 10. Výsledky ESG testů (pořadí aktivity) se až na případ dodecyl-acetátu (*VIII*) v podstatě shodují s daty získanými EAG metodou. Konfuzní účinnosti testovaných sloučenin (SRB test) jsou srovnány v grafické formě na obr. 11. Pořadí inhibiční aktivity analogů v LRB testu je prakticky shodné. Celkové výsledky elektrofyziologických i behaviorálních testů jsou ve zjednodušené formě prezentovány v tabulce I.

5.1. Dodecyl-chlorformiát (*II*)

Tato sloučenina vykazuje nejvyšší elektrofyziologickou (EAG/ESG) aktivitu ze všech syntetizovaných analogů Z8--12:Ac (*I*). Výrazný je také inhibiční efekt po přidání k přírodnímu feromonu (LRB test) a konfuzní efekt při SRB testu. Samotný analog *II* dokáže ve větrném tunelu částečně nahradit feromon, neboť aktivuje první tři fáze předkopulačního letového chování samečka. Podle molekulárně-mechanického (dále MM; software HyperChem(tm) 2, výpočty minimální energie metodou MM+) modelování je molekula analogu *II* vysoce prostorově podobná molekule feromonu *I*. Analog *II* tedy dobře mimikuje Z8-12:Ac a navíc nelze vyloučit jeho reakci s receptorovými proteiny za tvorby karbamátové vazby (a tím zablokovat čichový transdukční mechanismus).

5.2. Laktonové analogy *III*–*V* (alkenolidy)

Analog *III* (pětičlenný lakton, Z10-tetradecen-3-olid) je elektrofyziologicky málo aktivní, ale má výrazný konfuzní efekt (SRB test) a slušné inhibiční účinky v tunelu. Sloučenina podle MM modelů nemimikuje Z8-12:Ac, za inhibiční účinky zodpovídá vysoká afinita 4-členného laktonu k nukleofilům. Z10-tetradecen-3-olid by tak mohl inhibovat feromon-katabolické enzymy alkylací či acylací jejich nukleofilních skupin.



Obr. 11. **Konfuzní koeficienty Z8-12:Ac a jeho analogů**

Tabulka I
Biologické aktivity analogů feromonu obaleče východního (*Cydia molesta*)

Analog/Metoda	EAG[a]	ESG[a]	SRB test[a]	LRB test[a]
II (chlorformiát)	+++	+++	+++	+++
III (4-členný lakton)	+	–	+++	++
IV (5-členný lakton)	++	+++	–	–
V (6-členný lakton)	–	–	–	–
VI (8-thia)	++	+++	+++	+++
VII (9-thia)	++	++	+++	++
VIII (nasycený acetát)	+++	–	++	–
IX (vinyl)	+	+	+	+
X (ethyliden)	–	–	–	–
XI (difluorvinyl)	–	–	–	–

[a] + + +: vysoká aktivita, + +: střední aktivita, +: nízká aktivita, –: neaktivní

Pětičlenný lakton (*IV*; Z11-pentadecen-4-olid) má relativně vysokou EAG/ESG aktivitu, ale minimální konfuzní a in-

hibiční účinky. Molekula analogu *IV* sice mimikuje *Z*8-12:Ac (MM model) ale jeho inhibiční aktivita je nízká. To lze vysvětlit podstatně menší afinitou 5-členného laktonického uskupení k nukleofilům (50–100× menší než u 4-členného laktonu III) (cit.[31]).

Šestičlenný lakton (*V*; *Z*12-hexadecen-5-olid) není biologicky aktivní, tj. nenapodobuje původní feromon a nemá ani inhibiční účinky. Důvodem je příliš velký zásah do geometrie původního Z8-12:Ac (*I*) v místě koncové acetátové skupiny (MM model) a předpokládaná nízká reaktivita 6-členného laktonového uskupení sloučeniny *V*.

5.3. Thiaanalogy *VI* a *VII*

Obě dvě sloučeniny mají vysokou elektrofyziologickou (EAG / ESG) aktivitu a též značný konfuzní efekt při SRB behaviorálním testu. Při směsných EAG experimentech (směsi s *Z*8-12:Ac v poměrech 1:10 a 1: 100) zvyšují odpověď tykadla o 50–70 %.

Podle MM modelů oba thiaanalogy dobře mimikují *Z*8--12:Ac a navíc jejich flexibilní molekuly pravděpodobně interagují i s receptory minoritních komponent sexuálního feromonu. Látky *VI* a *VII* mají konfuzní efekt srovnatelný s feromonem (díky desetinové těkavosti při 10-ti násobné dávce). Obě látky se chovají jako agonisté *Z*8-12:Ac, spíše modifikují než inhibují percepci feromonu.

5.4. Dodecyl-acetát (*VIII*)

Tento ester byl nově identifikován[32] ve feromonové směsi produkované samičkou obaleče východního. Nejde tedy o analog feromonu, ale o minoritní komponentu sexuálního feromonu. Proto sloučenina *VIII* vykazuje vysokou EAG odezvu celého tykadla a minimální ESG odezvu buněk specializovaných na hlavní složku *Z*8-12:Ac. To vše spolehlivě indikuje přítomnost doposud anatomicky nelokalizovaných, k identifikaci 12:Ac určených specifických receptorů, na samčím tykadle obaleče *Cydia molesta*.

5.5. Rozvětvené analogy *IX–XI*

Elektrofyziologická (EAG/ESG) aktivita vinylanalogu *IX* je velmi nízká a i jeho konfuzní efekt v LRB testu je nevýrazný. Při směsných EAG experimentech (směsi s *Z*8-12:Ac 1:10 a 1:100) snižuje odpověď tykadla cca o 20 %. Podle MM modelů analog *IX* nemimikuje *Z*8-12:Ac, tj. jeho slabé inhibiční účinky nejsou spojeny se schopností „napodobit“ původní molekulu hlavní složky feromonu. Analog *IX* je pravděpodobně schopen inhibovat EAG odpověď na úrovni tykadla (nutné další ověření).

Ethylidenanalog (*X*) a difluorvinylanalog (*XI*) jsou díky velkým zásahům do struktury molekuly *Z*8-12:Ac (MM modely) látky s velmi nízkou elektrofyziologickou i behaviorální aktivitou.

6. Závěr

Získané údaje o biologické aktivitě sloučenin *II–XI* nás opravňují konstatovat, že inhibiční vlastnosti analogů nejsou spojeny pouze s jejich schopností napodobit (mimikovat) původní molekulu *Z*8-12:Ac. Na základě provedených experimentů můžeme uvažovat o dvou odlišných hypotetických mechanismech působení syntetizovaných analogů: *1*) Zahlcení receptorového systému feromon mimikujícím analogem (thiaanalogy *VI* a *VII*, částečně chlorformiát *II*), *2*) Zablokování normálních transportních a enzymatických procesů v receptoru díky možné alkylaci či acylaci nukleofilních skupin receptorových proteinů a / nebo katabolických enzymů (chlorformiát *II* a 4-členný lakton *III*).

Perspektivní sloučeniny (*II*, *III*, *VI* a *VII*) budou podrobeny dalšímu intenzivnímu biochemickému a biologickému studiu. Z praktického hlediska si zaslouží zvláštní pozornost thiaanalogy *VI* a *VII*. Jednoduchá syntéza a vyšší environmentální stabilita ve srovnání s hlavní složkou feromonu (*Z*8-12:Ac) jsou významnými aktivy obou analogů pro jejich potenciální využití[9,33,34] v integrované ochraně sadů před obalečem východním.

Řešení uvedeného komplexního projektu pro nás znamenalo nutnost poprvé spojit „síly“ nejenom v oblasti organické syntézy a fyziologie hmyzu, ale řešit i otázky fyzikálně chemické (těkavosti semiochemikálií) či molekulárně-machanické a etologické (design behaviorálních testů). Kromě „praktických“ výstupů (nové biologicky aktivní analogy semiochemikálií) vidím hlavní význam tohoto projektu ve vypracování obecně použitelného interdisciplinárního modelu řešení podobných problémů vztahů chemická struktura – biologická aktivita v oblasti chemické ekologie.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu č. DHR--5600-G-00-1051-00, Program in Science and Technology Cooperation, agentury USAID (United States Agency for International Development).

LITERATURA

1. Hoskovec M.: Chem. Listy *92*, 941 (1998).
2. Baker R., Herbert R. H.: Nat. Prod. Reports *1984*, 299.
3. *Techniques in Pheromone Research* (Hummer H. E., Miller T. A., ed.). Springer, New York 1984.
4. *CRC Handbook of Natural Pesticides* (Morgan, E. D., Mandava, ed.), sv. VI. CRC Press, Boca Raton 1988.
5. Arn H., Tóth M., v databázi: *List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants* (Arn H., Tóth M., Priesner E., ed.). Internetová databáze Pherolist: http://nysaes.cornell.edu/pheronet/.
6. Hoskovec M., Kalinová B., Konečný K., Koutek B., Vrkoč J.: J. Chem. Ecol. *19*, 735 (1993).
7. Rice R. E., Kirsch P., v knize: *Applications of Pheromones and Other Attractants* (Ridgway R. L., Silverstein R. M., Inscoe M. N., ed.), kap. 13. Marcel Dekker, New York 1990.
8. Voght H., Schropp A., Neumann U., Eichhorn K. W.: J. Appl. Entomol. *115*, 217 (1993).
9. Cardé R. T., Minks P. M.: Annu. Rev. Entomol. *40*, 559 (1995).
10. Prestwich G. D., Carvalho J. F., Ding Y. S., Hendricks D. E.: Experientia *42*, 964 (1986).
11. Parilla A., Guerrero A.: Chem. Senses *19*, 185 (1994).
12. Cardé A. M., Baker T. C., Cardé R. T.: J. Chem. Ecol. *5*, 423 (1979).
13. Mayer R. J., Louis-Flamberg P., Elliott J. D., Fischer M.,

Leber J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *169*, 610 (1990).
14. Silvermann R. B.: *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, kap. 2. Academic, San Diego 1992.
15. Camps F., Gasol V., Guerrero A.: J. Chem. Ecol. *16*, 1155 (1990).
16. Burger B. V., Le Roux M., Mackenroth W. M., Spies H. S., Hofmeyr J. H.: Tetrahedron Lett. 31, 5771 (1990).
17. Hoskovec M., Šaman D., Koutek, B.: Collect. Czech. Chem. Commun. *59*, 1211 (1994).
18. Hoskovec M., Koutek B., Lazar J., Kalinová B., Brožová E., Streinz L., Vrkoč, J: Helv. Chim. Acta *77*, 1281 (1994).
19. Hoskovec M., Hovorka O., Kalinová B., Koutek B., Streinz L., Svatoš A., Šebek P., Šaman D., Vrkoč J.: Bioorg. Med. Chem. *4*, 479 (1996).
20. Hoskovec M., Hovorka O., Kalinová B., Koutek B., Svatoš A., Vlček K., Vrkoč J: Collect. Czech. Chem. Commun. *63*, 1031 (1998).
21. Bjostad L. B., v knize: *Methods in Chemical Ecology, Chemical Methods* (Millar J. G., Haynes K. F., ed.), sv. 1, kap. 9. Kluwer Academic Publishers, Norwell 1998.
22. Koutek B., Hoskovec M., Konečný K., Vrkoč J.: J. Chromatogr. *626*, 215 (1992).
23. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Feltl L.: J. Chromatogr. A *679*, 307 (1994).
24. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Feltl L.: J. Chromatogr. A *719*, 391 (1996).
25. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Feltl L.: J. Chromatogr. A *759*, 93 (1997).
26. Jensen D. J., Schall E. D.: J. Agr. Food Chem. *14*, 123 (1966).
27. Murray J. J., Pottie R. F., Pupp C.: Can. J. Chem. 52, 275 (1983).
28. Spencer W. F., Cliath M. M.: Residue Rev. 85, 57 (1983).
29. Hamilton D. J.: J. Chromatogr. *195*, 75 (1980).
30. Hare J. D., v knize: *Methods in Chemical Ecology, Bioassay Methods* (Millar J. G., Haynes K. F., ed.), sv. 2, kap. 5. Kluwer Academic Publishers, Norwell 1998.
31. Hemminki K.: Chem. Biol. Interact. *34*, 323 (1981).
32. Lacey M. J., Sanders C. J.: J. Chem. Ecol. *18*, 1421 (1992).
33. Bartell R. J.: Physiol. Entomol. *7*, 353 (1982).
34. Rice R. E., Kirsch P., v knize: *Behaviour-Modifying Chemicals for Insect Management. Applications of Pheromones and Other Attractants* (Ridgway R. L., Silverstein R. M., Inscoe M. N., ed.), kap. 13. Marcel Dekker, New York 1990.

M. Hoskovec *(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):*
Insect Chemical Communication from the Viewpoint of the Organic Chemist

The multiscience complexity of the research in the field of the insect chemical communication is demonstrated on the project Biorational Pesticides Based on Pheromone Analogues. The project dealt with the design, synthesis and structure – biological activity studies of sex pheromone analogues of some important insect pests, such as the oriental fruit moth (*Cydia molesta*). Ten new analogues of (*Z*)-dec-8-en-1-yl acetate (*I*) with the modified acetate group (*II–V*) or alkene moiety (*VI–XI*) were tested for their biological activity by electroantennography (EAG), electrosensillography (ESG), short-range sexual stimulation and activation in the flight tunnel. All the structure modifications resulted in compounds whose electrophysiological activities were lower than that of *I* following the order *I* > *II* > *VII* > *IV* > *VIII* = *IV* = *VI* >> *III* >>> *V* = *IX* = *X* = *XI*. In behaviour experiments, some of the synthesised compounds were found to generally reduce the ability of males to find a pheromone source. The highest inhibitory effect was observed for chloroformate *II*, the four-membered lactone *III* and the thia analogues *VI* and *VII*. The results support the view that inhibitory properties of the analogues should not be entirely associated with their pheromone-mimicking capabilities.





AUTORSKÝ REJSTŘÍK

Ardila, Maria Cristina	168
Barth, Tomislav	57
Bořek-Dohalská, Lucie	164
Červený, Libor	119
Doležal, Pavel	74
Dostál, Jiří	135
Farsa, Oldřich	74
Frei, Eva	87, 160
Heyrovský, Michael	109
Hodek, Petr	87
Holzmannová, Věra	9
Hoskovec, Michal	206
Hrabálek, Alexandr	74
Hudeček, Jiří	87
Huml, Karel	57
Jahodář, Luděk	102, 128
Janeba, Zlatko	181
Jegorov, Alexandr	20
Kasafírek, Evžen	45
Klečáková, Jana	102
Klejdus, Bořivoj	96
Krebs, Aleš	74
Kubáň, Vlastimil	96
Lapčík, Jr., Lubomír	24, 197
Lesová, Katarína	141, 148
Mašek, Ivan	24
Mikulášková, Barbora	24
Patočka, Jiří	128, 168
Peterková, Petra	197
Přistoupil, Tomáš Ivan	109
Přistoupilová, Kamila	109
Rosenberg, Michal	148
Schmeiser, Heinz H.	160
Slanina, Jiří	154
Slavík, Jiří	135
Slugeň, Dušan	148
Soucek, Radko	1
Stiborová, Marie	87, 160, 164
Straka, Pavel	172
Šklubalová, Zdenka	74
Šturdíková, Mária	141, 148
Tomandl, Josef	85
Urbanová, Klára	33
Valterová, Irena	33
Vázquez, Mario Víctor	168
Vinšová, Jarmila	45



